

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

23

06/04/04

Determinação de filtros solares em cosméticos  
empregando a eletroforese capilar como alternativa à  
cromatografia líquida de alta eficiência

Cristina Saito

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup> Titular Dra. Érika Rosa Maria  
Kedor- Hackmann

São Paulo  
2004



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

Saito, Cristina  
S158d Determinação de filtros solares em cosméticos empregando a eletroforese capilar como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência / Cristina Saito. -- São Paulo, 2004. 200p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria

1. Filtro solar : Cosméticos : Tecnologia 2. Eletroforese capilar : Química analítica 3. Cromatografia líquida de alta eficiência : Química analítica I. T. II. Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria, orientador.

668.55 CDD

**Cristina Saito**

**Determinação de filtros solares em cosméticos empregando a eletroforese capilar como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência**

**Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Prof<sup>a</sup> Titular Dr<sup>a</sup> Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann  
orientadora/presidente**

\_\_\_\_\_  
1º. examinador

\_\_\_\_\_  
2º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

DEDALUS - Acervo - CQ



30100006006

Comissão Julgadora

Proposição para abertura de grupo de Materiais

17919-F  
Saito, Cristina

de

São Paulo

*A Deus que ilumina meu caminho,  
proporcionando sabedoria, paciência e perseverança  
para a realização de meus objetivos.*

*A Mauro, meu marido e grande  
amigo, que com seu amor, carinho, paciência e  
dedicação incentiva-me em todos os momentos.*

*Aos meus queridos pais, Sebastião e  
Yolanda, pelo amor, carinho e apoio.*

*A minha querida irmã, Roseli, pelo  
carinho e estímulo.*

*À Profa. Dra. Érika R. M.  
Redor-Hackmann, pela orientação, compreensão,  
incentivo e amizade.*

# Agradecimentos

À Dra. Meire Y. Fushimi e Dra. Sueli Higa (Laboratórios Stiefel – R&D Intl Brasil) pela amizade e incentivo dado à pesquisa e desenvolvimento de produtos inovadores na área de dermatologia.

À Profa. Dra. Marina F.M. Tavares, pela amizade, apoio e orientação.

Aos amigos dos Laboratórios Stiefel, pela amizade e estímulo.

À secretária Elizabeth, pela disposição e auxílio valiosos.

Aos secretários, Jorge, Benê e Elaine pela atenção, competência e simpatia.

Às bibliotecárias Adriane e Leila, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos companheiros: Leila, Ana Luiza, Ah Hyon e Roberto, Ixis, Andrea Peraro, pela amizade e apoio.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1-INTRODUÇÃO .....  | 1  |
| 2-REVISÃO DA LITERATURA .....   | 3  |
| 2.1- EFEITOS FISIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....                           | 3  |
| 2.2- BRONZEAMENTO, QUEIMADURA SOLAR, FOTOENVELHECIMENTO E<br>CÂNCER DE PELE ..... | 6  |
| 2.2.1- Bronzeamento .....   | 6  |
| 2.2.2- Queimadura Solar .....   | 8  |
| 2.2.3- Fotoenvelhecimento .....   | 9  |
| 2.2.4- Câncer de Pele.....  | 10 |
| 2.3- FILTROS SOLARES .....  | 11 |
| 2.4- REGULAMENTAÇÕES DE FILTROS SOLARES.....                                      | 14 |
| 2.5- FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR .....  | 17 |
| 2.6- ELETROFORESE CAPILAR .....   | 19 |
| 2.7- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....                               | 24 |
| 2.8- VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO.....   | 28 |
| 2.9- MÉTODOS DE ANÁLISE DE FILTROS SOLARES.....                                   | 31 |

|  |    |
|--|----|
| 3-OBJETIVOS .....  | 36 |
| 4-PLANEJAMENTO .....   | 37 |
| 5-MATERIAL .....   | 39 |
| 5.1- SOLVENTES, REAGENTES E TAMPÕES .....                    | 39 |
| 5.2- FILTROS QUÍMICOS EMPREGADOS COMO PADRÃO .....           | 41 |
| 5.2.1- Ácido 2-Fenilbenzimidazol 5-Sulfônico .....           | 41 |
| 5.2.2- Benzofenona-4 .....                                   | 43 |
| 5.3- AMOSTRAS .....  | 45 |
| 5.4- EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS .....                          | 47 |
| 6-MÉTODOS .....  | 48 |
| 6.1- IDENTIFICAÇÃO DOS FILTROS SOLARES .....                 | 48 |
| 6.1.1- Determinação da Solubilidade .....                    | 48 |
| 6.1.2- Espectro de Absorbância no Ultravioleta .....         | 48 |
| 6.2- MÉTODOS ANALÍTICOS .....                                | 50 |
| 6.2.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ..... | 50 |
| 6.2.1.A. Sistema 1 .....                                     | 50 |
| 6.2.1.B. Sistema 2 .....                                     | 51 |
| 6.2.2- Eletroforese Capilar .....                            | 54 |
| 6.2.2.A. Sistema 1 .....                                     | 54 |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.2.2.B. Sistema 2 .....   | 54        |
| 6.2.2.C. Sistema 3 .....   | 54        |
| <b>6.3- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA SELECIONADA .....</b>   | <b>57</b> |
| 6.3.1- Determinação de Ácido 2-Fenilbenzimidazol 5-Sulfônico e Benzofenona-4 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ..... | 57        |
| 6.3.1.1- Padronização do Método .....  | 57        |
| 6.3.1.2- Construção da Curva de Calibração .....   | 57        |
| 6.3.1.3- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....  | 59        |
| 6.3.1.4- Aplicação do Método Padronizado às amostras Comerciais e Simuladas.....   | 60        |
| 6.3.2- Determinação de Ácido 2-Fenilbenzimidazol 5-Sulfônico e Benzofenona-4 por Eletroforese Capilar.....                             | 69        |
| 6.3.2.1- Padronização do Método .....  | 69        |
| 6.3.2.2- Construção da Curva de Calibração .....   | 69        |
| 6.3.2.3- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....  | 71        |
| 6.3.2.4- Aplicação do Método Padronizado às Amostras Comerciais e Simuladas.....   | 72        |
| <b>7- RESULTADOS.....</b>  | <b>81</b> |
| 7.1- IDENTIFICAÇÃO.....  | 81        |
| 7.1.1- Determinação da Solubilidade .....  | 81        |
| 7.1.2- Espectro de Absorção no Ultravioleta.....   | 81        |
| <b>7.2- MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>   | <b>83</b> |

|  |     |
|--|-----|
| 7.2.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....  | 83  |
| 7.2.1.1- Estudos Preliminares.....   | 83  |
| 7.2.1.2- Validação da Metodologia Analítica Seleccionada.....  | 87  |
| 7.2.2- Eletroforese Capilar.....   | 122 |
| 7.2.2.1- Estudos Preliminares.....   | 122 |
| 7.2.2.2- Validação da Metodologia Analítica Seleccionada.....  | 125 |
| <br>   |     |
| 8- COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E ELETROFORESE CAPILAR POR ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 162 |
| <br>   |     |
| 8.1- COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO DOS DOIS MÉTODOS.....  | 162 |
| <br>   |     |
| 8.2- COMPARAÇÃO DA PRECISÃO DOS DOIS MÉTODOS.....  | 164 |
| <br>   |     |
| 8.3- RESULTADOS OBTIDOS NA COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO DOS MÉTODOS.....  | 165 |
| <br>   |     |
| 9- DISCUSSÃO.....  | 169 |
| <br>   |     |
| 9.1- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....  | 170 |
| 9.1.1- Estudos Preliminares.....   | 170 |
| 9.1.2- Validação do Método Analítico Seleccionado.....   | 171 |
| 9.1.2.1- Curva de Calibração (Linearidade).....  | 171 |
| 9.1.2.2- Limite de Detecção e Limite de Quantificação (Sensibilidade).....   | 171 |
| 9.1.2.3- Pesquisa de Interferentes na Amostra Comercial (Especificidade). 172  |     |
| 9.1.2.4- Aplicação do Método Validado às Amostras Comercial e Simuladas (Precisão).....  | 173 |

|   |            |
|---|------------|
| 9.1.2.5- Teste de Recuperação (Exatidão) .....  | 173        |
| <b>9.2- ELETROFORESE CAPILAR .....</b>  | <b>174</b> |
| 9.2.1- Estudos Preliminares.....  | 174        |
| 9.2.2- Validação do Método Analítico Selecionado.....   | 175        |
| 9.2.2.1- Curva de Calibração (Linearidade) .....  | 175        |
| 9.2.2.2- Limite de Detecção e Limite de Quantificação (Sensibilidade).....  | 175        |
| 9.2.2.3- Pesquisa de Interferentes na Amostra Comercial (Especificidade) .  | 176        |
| 9.2.2.4- Aplicação do Método Validado às Amostras Comercial e Simuladas<br>(Precisão) .....   | 177        |
| 9.2.2.5- Teste de Recuperação (Exatidão) .....  | 177        |
| <b>9.3- COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E<br/>ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO DE FILTROS SOLARES<br/>.....</b> | <b>178</b> |
| 9.3.1- Comparação da Exatidão e Precisão.....   | 178        |
| <b>10- CONCLUSÕES .....</b>   | <b>179</b> |
| <b>11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>181</b> |

## **ANEXOS**

**Trabalhos publicados e apresentados em congressos**

## RESUMO

O crescimento do mercado de filtros solares mostra o aumento da preocupação pública com os efeitos nocivos relacionados à radiação ultravioleta (UV). O desenvolvimento de filtros solares cada vez mais eficazes tem ganhado importância. Ter procedimentos analíticos específicos e confiáveis para identificar e determinar a concentração de filtros solares desempenham um importante papel no desenvolvimento de tais produtos. Um método para a determinação de filtros solares usando eletroforese capilar (CE) é apresentado neste trabalho, como uma alternativa a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os filtros solares estudados são ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 em formulação comercial em gel. O método de CE envolve um capilar de sílica fundida com 75mm d.i. e um comprimento total de 100cm (45cm ao detector) com uma solução tampão contendo tetraborato de sódio 10mM (pH 9,2). A tensão aplicada foi 29kV e empregou-se benzoato de sódio (100mg/mL) como padrão interno. A detecção foi realizada por absorção ultravioleta a 217nm.

Um método de CLAE foi desenvolvido para ser comparado com o método de CE. O método cromatográfico foi realizado usando fase estacionária C18 e fase móvel isocrática de tampão fosfato-acetonitrila-metanol (58:5:37). O fluxo foi de 0,5mL/min e as medidas de UV a 258nm e 217nm.

Os métodos de CLAE e CE mostraram-se precisos, exatos, específicos, lineares e economicamente viáveis para serem empregados em preparações farmacêuticas e laboratórios de Controle de Qualidade.

Entre as vantagens que o CE apresenta sobre o CLAE são maior rapidez no tempo de análise e baixo consumo de reagentes, fazendo com que seja mais econômico e amigável ao meio ambiente, devido a menor produção de resíduo.

## ABSTRACT

The growth of the sunscreen market shows increasing public awareness of the hazardous effects related to ultraviolet (UV) radiation. The development of newer, more effective sunscreens has been gaining importance. Having specific and reliable analytical procedures to identify and determine sunscreen concentration plays an important role in the development of such products. A method for the determination of sunscreens using capillary electrophoresis (CE) is presented in this work, as an alternative to high performance liquid chromatography (HPLC). The sunscreens studied are 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid and benzophenone-4 in a commercial gel formulation. The CE method involves an uncoated silica capillary with 75µm i.d. and a total length of 100cm (45cm to the detector) with a buffer solution containing 10mM sodium tetraborate (pH 9.2). The applied voltage was 29kV and sodium benzoate (100mg/mL) was used as internal standard (i.s.). The detection was achieved by ultraviolet (UV) absorption at 217nm.

A HPLC method was developed in order to be compared with the CE method. The chromatographic method was performed using a C18 stationary phase and an isocratic mobile phase of phosphate buffer-acetonitrile-methanol (58:5:37). The flow rate was 0.5mL/min and UV measurements were carried out at 258nm and 217nm.

The CE and HPLC methods were shown to be precise, accurate, specific, linear and economically feasible to be used in pharmaceutical preparation and Quality Control laboratories.

Among the advantages CE presents over HPLC are faster analysis time and low consumption of reagents, making it more economical and environment-friendly, due to lower production of residue.

# 1-INTRODUÇÃO

No início do século XX, a pele clara era considerada sinal de status e a exposição do corpo a luz solar era evitada. A cor da pele separava as classes sociais: dominante e mão-de-obra. Quanto mais clara a pele de uma pessoa mais elevada era sua posição social <sup>97</sup>.

Com a evolução da sociedade, o número de trabalhadores confinados em escritórios aumentou, o que proporcionou a menor importância de se possuir a pele clara.

Na década de 20, tendo como influência Coco Chanel, os ricos mudaram essa tendência, adotando como ideal o corpo bronzeado. Desde então, o banho de sol foi incorporado à sociedade contemporânea. Após a Segunda Guerra Mundial, o tempo disponível para lazer, esportes e viagens tornou o corpo bronzeado sinal de riqueza e bem-estar físico e mental <sup>97</sup>.

Contudo, na década de 70 e 80, verificou-se que a radiação solar não era tão benéfica como se pensava. A incidência de melanoma maligno aumentou 500% de 1950 a 1985 <sup>97</sup>.

Estudos sobre a excessiva exposição a radiação solar e os efeitos da radiação ultravioleta sobre a pele foram aprofundados e associados a diversos distúrbios como fotoenvelhecimento e câncer de pele <sup>73, 81, 102</sup>.

O estudo do fotoenvelhecimento da pele tem ganho destaque nos últimos anos, com a crescente demanda do mercado consumidor por produtos que protejam a pele contra os efeitos nocivos do ambiente. Este é causado pela radiação ultravioleta, proveniente das radiações solares e também de fontes

artificiais, que provocam alterações biológicas e fisiológicas à pele, aumentando a incidência de câncer de pele <sup>81, 73, 102</sup>.

A proteção contra os efeitos provocados pela radiação ultravioleta pode ser conseguida através do uso de produtos cosméticos com filtros solares. A venda desses produtos vem aumentando, segundo FUKUDA e TAKATA <sup>36</sup>.

Os filtros solares são divididos em duas categorias, os absorventes químicos e os bloqueadores físicos. Os absorventes químicos promovem a absorção da luz em determinados comprimento de onda, evitando os danos da radiação à pele. Os bloqueadores físicos, por sua vez, atuam como uma barreira sobre a pele, refletindo e dispersando os raios ultravioletas e luz visível. Incorporados a produtos cosméticos, os filtros solares proporcionam fotoproteção a pele contra os efeitos danosos proporcionados pela radiação ultravioleta <sup>24, 54</sup>.

Portanto, é de grande importância o estudo de filtros solares, bem como assegurar a qualidade de produtos cosméticos que os contenham desenvolvendo metodologias de identificação e quantificação de filtros solares.

## 2-REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1- EFEITOS FISIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A radiação ultravioleta é parte do espectro de ondas eletromagnéticas. Constitui uma das radiações nocivas para a pele devido a seu alto nível de energia. A radiação ultravioleta pode ser dividida em: UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (100-290nm) <sup>30, 55, 81, 85</sup>. A representação da radiação ultravioleta num espectro eletromagnético encontra-se na **Figura 1**.

**Radiação Ultravioleta A (320-400nm):** Subdivida em UVA I (340-400nm) – Longo e UVA II (320-340nm) – Curto. Consiste na radiação ultravioleta com maior comprimento de onda e menos energética quando comparado com UVB e UVC. Contudo penetra mais profundamente as camadas da pele, alcançando a derme, produzindo danos em membranas, proteínas e DNA através de processos oxidativos, ocasionando danos ao colágeno e fibras elásticas (Representação esquemática na **Figura 2**). Estimula o melanócito a produzir mais melanina como um mecanismo de defesa à agressão causada pela radiação ultravioleta, produzindo o bronzeamento <sup>54, 72</sup>. Efeitos crônicos ao UVA proporciona efeitos como fotoenvelhecimento, fotocarcinogênese e fotossensibilidade (erupção polimórfica, lupus eritematoso, urticária solar, dermatite actínica, xeroderma pigmentoso <sup>62, 67, 80, 113</sup>) são promovidos pelas lesões causadas na derme <sup>69, 73, 76, 77, 99, 100, 102, 106, 119</sup>. Penetra através de vidro e material plástico <sup>26, 41</sup>.

**Radiação Ultravioleta B (290-320nm):** Onda eletromagnética de alta energia, interage com a epiderme sendo menos invasiva na derme do que a UVA. Efeitos devido a exposição aguda incluem: eritema tardio, inflamação, hiperplasia. Enquanto os da exposição crônica incluem: fotoenvelhecimento, imunossupressão e câncer de pele <sup>63, 66, 78, 85, 102, 119, 124</sup>. A catarata também pode ser desenvolvida por exposições a radiação ultravioleta <sup>112</sup>. A atuação da radiação

UVB é mais intensa entre 10:00 horas às 14:00 horas durante o dia e durante o ano, nos meses de inverno é menos intensa. É absorvida por objetos de vidro e de plástico <sup>26, 41, 72, 95, 101</sup>. Em relação a posição geográfica da Terra, a radiação ultravioleta é mais intensa próxima a linha do Equador <sup>26, 41</sup>.

**Radiação Ultravioleta C (100-290nm):** É praticamente absorvida pela camada de ozônio da atmosfera. Possui alta energia, sendo extremamente eritematígeno, mutagênico e carcinogênico <sup>67, 77, 81, 112</sup>. A Agência de Proteção Ambiental dos EUA estimou que a cada 1% de decréscimo da camada de ozônio, corresponde a um aumento de 1% a 2% na mortalidade causada por melanoma

56

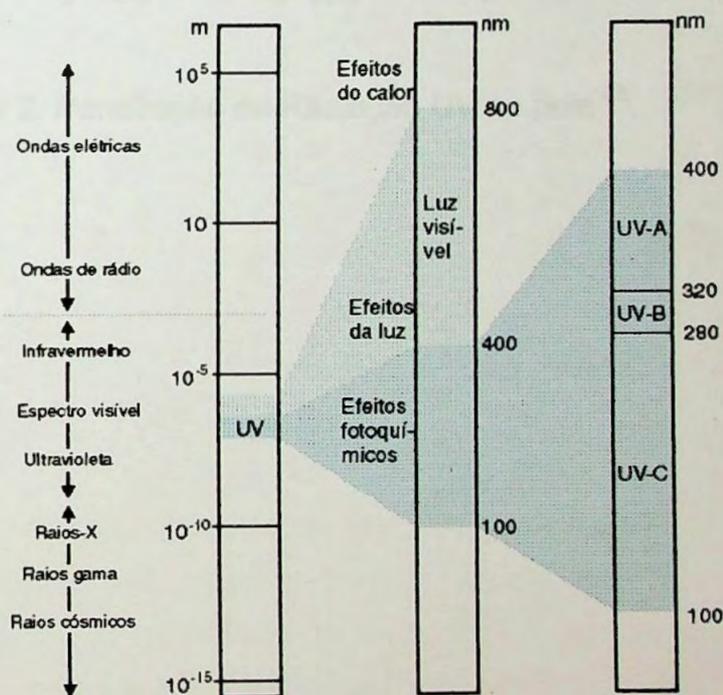


Figura 1. Representação da radiação UV num espectro eletromagnético <sup>17</sup>

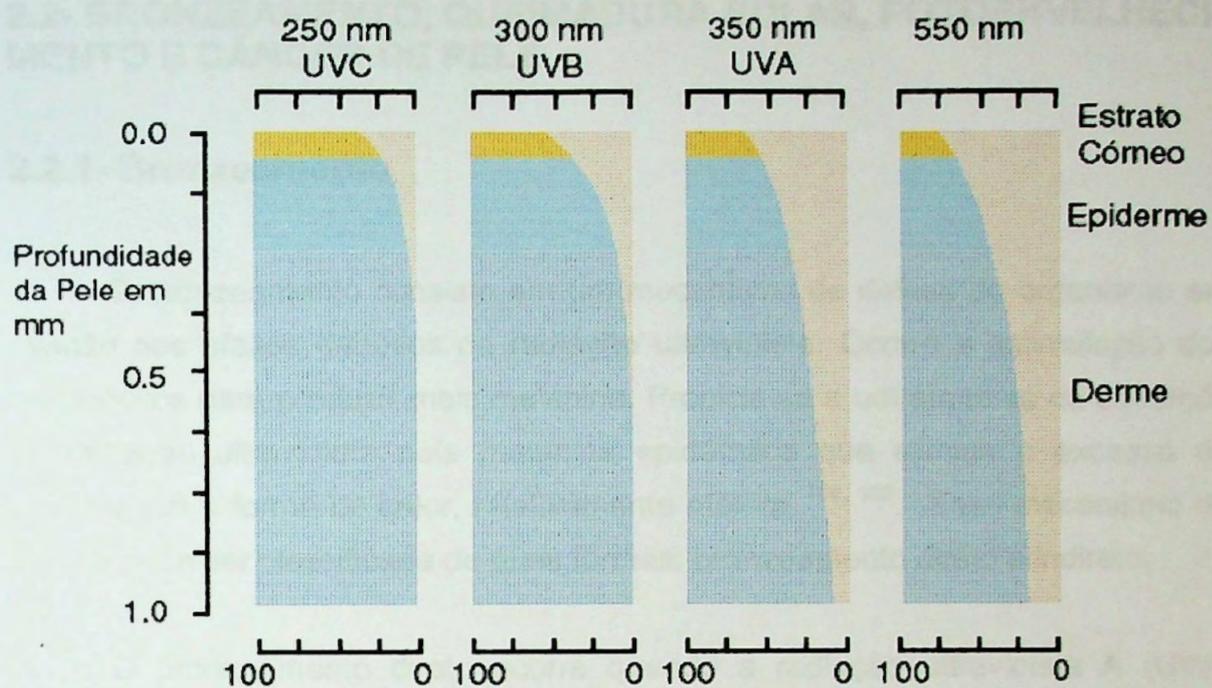


Figura 2. Penetração da Radiação UV na pele <sup>68</sup>

## 2.2- BRONZEAMENTO, QUEIMADURA SOLAR, FOTOENVELHECIMENTO E CÂNCER DE PELE

### 2.2.1- Bronzeamento

O bronzeamento consiste em um mecanismo de defesa do organismo em relação aos efeitos danosos da radiação ultravioleta. Ocorre a estimulação dos melanócitos para produzir mais melanina. Propicia-se a um aumento da absorção da radiação ultravioleta pela melanina epidérmica que elimina o excesso de energia sob a forma de calor, relativamente atóxica <sup>100, 102</sup>. Esse mecanismo de defesa pode ser classificada de duas formas: bronzeamento direto e indireto.

O bronzeamento direto ocorre quando a radiação ultravioleta A (UVA) sensibiliza os grânulos de melanócitos que se encontram na camada basal da derme. Há a formação da tirosinase, sintetizada pelo retículo endoplasmático rugoso. Nos melanossomas, a tirosinase proporciona a catalisação da tirosina transformando-se em DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) e posteriormente em dopaquinona. A partir da dopaquinona, a formação de melanina pode seguir duas rotas, ou formando a leucodopacroma que conduz a formação de eumelanina (pigmentação marrom ou negra) ou reagindo com a cisteína, formando a feomelanina (pigmentação vermelha ou amarela) <sup>82, 96</sup>.

O pigmento formado se dirige às camadas mais externas da pele e durante este percurso, nos indivíduos com pele de cor clara do fototipo céltico, os melanossomas se desintegram. Enquanto que nos indivíduos de pele negra, o pigmento está presente nas camadas superficiais da pele <sup>68, 77, 102, 119</sup>. A formação biológica da eumelanina e da feomelanina encontra-se esquematizada na **Figura 3**.

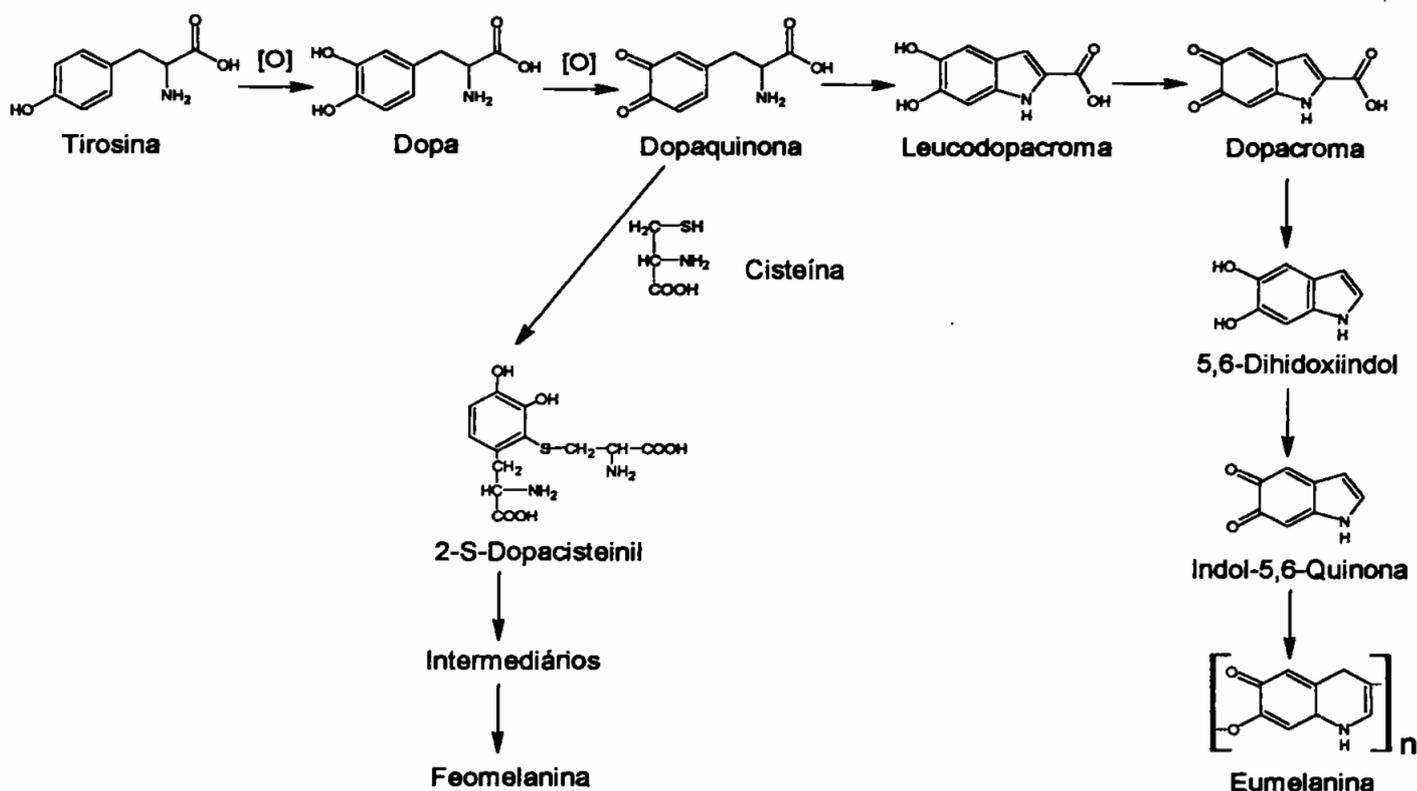


Figura 3. Formação da eumelanina e da feomelanina

Desta forma, os indivíduos com eumelanina (cor da pele branca, amarelada, morena e preta) se bronzeiam a serem irradiados pela radiação ultravioleta, o que não ocorre aos indivíduos com feomelanina (cor da pele ruiva, castanha-avermelhada).

O bronzeamento indireto é induzido pela radiação UVB. O ácido timonucléico do núcleo do melanócito é lesionado por reações fotoquímicas desencadeadas pela radiação UVB, promovendo a liberação de melanina da camada basal da derme para a epiderme. Comparando-se a duração entre os bronzeamentos, o indireto é mais prolongado do que o direto <sup>76, 68</sup>.

## 2.2.2- Queimadura Solar

A queimadura solar consiste em uma reação inflamatória quando a radiação ultravioleta B (UVB) penetra na epiderme da pele. Ocorrem reações de danos diretos e indiretos nas células por reações fotoquímicas e geração de radicais livres de oxigênio. Em consequência, danos no DNA e ativação do sistema inflamatório envolvendo as prostaglandinas resultam em vasodilatação e edema <sup>3, 38, 44, 87</sup>.

Estudos estão sendo realizados sobre a existência de relação entre queimaduras solares repetitivas e aumento no risco de melanoma <sup>121, 123</sup>.

A sensibilidade a queimadura solar depende de dois fatores: o fator genético, que determina a produção e distribuição da melanina, e a quantidade de radiação ultravioleta incidindo na pele. Em relação aos fatores genéticos, a pele pode ser classificada em seis fototipos, que variam de pessoas que sempre se queimam e nunca se bronzeiam, a pessoas que nunca se queimam e que são profundamente pigmentados. O Quadro 1 detalha os diferentes fototipos de pele e suas consequências a exposição solar <sup>33, 123</sup>.

**Quadro 1. Fototipos de pele e conseqüências a exposição solar** <sup>33, 123</sup>

| Fototipos de pele |   | Conseqüências a Exposição Solar                                 |
|-------------------|---|---|
| I                 | Pele clara, olhos azuis, sardentos  | Sempre se queimam e nunca se bronzeiam                          |
| II                | Pele clara, olhos azuis, verdes ou castanhos claros, cabelos louros ou ruivos | Sempre se queimam e, às vezes, se bronzeiam                     |
| III               | A média das pessoas brancas normais   | Queimam-se moderadamente e bronzeiam-se gradual e uniformemente |
| IV                | Pele clara ou morena, cabelos castanhos escuros e olhos escuros               | Queimam-se muito pouco, bronzeiam-se bastante                   |
| V                 | Pessoas morenas   | Raramente se queimam, bronzeiam-se muito                        |
| VI                | Negros  | Nunca se queimam, profundamente pigmentados                     |

### 2.2.3- Fotoenvelhecimento

Uma das principais fontes do fotoenvelhecimento da pele é causada pela radiação ultravioleta A (UVA) do Sol que penetra mais profundamente na pele. Esse envelhecimento prematuro da pele provoca o surgimento de rugas, alterações na pigmentação e perda de elasticidade, associado ao crescimento anormal de fibras de elastina e diminuição de colágeno na derme <sup>64, 102, 112</sup>.

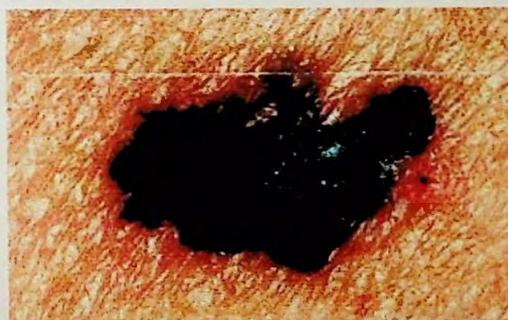
Devido fotoenvelhecimento ser um processo acumulativo de danos a pele, o uso de protetores solares diariamente, torna-se imprescindível. Milhões de dólares, são investidos todos os anos, pelas indústrias cosméticas, para o desenvolvimento de novos produtos que combatam esse processo. Sendo que ácidos retinóicos e anti-oxidantes podem ser usados para controlar o processo de formação de radicais livres no fotoenvelhecimento <sup>60, 83</sup>.

## 2.2.4- Câncer de Pele

Repetidas e prolongadas exposições a radiação ultravioleta na faixa de 290nm a 320nm (UVB) pode representar um dos principais fatores para o desenvolvimento do câncer de pele (crescimento anormal das células). Esse tipo de radiação está presente em fontes artificiais e naturais, como a luz solar <sup>64, 90, 101</sup>.

Há três tipos de câncer de pele: carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas e melanoma cutâneo. O carcinoma de células basais e o carcinoma de células escamosas representam o câncer de pele não-melanômico que são transformações malignas dos queratinócitos. O melanoma cutâneo resulta das transformações anormais dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina <sup>12, 101</sup>. A **Figura 4**, ilustra um câncer de pele <sup>59</sup>.

Devido aos efeitos cumulativos da radiação ultravioleta, após os 40 anos de idade aumenta-se a incidência de manchas, rugas e câncer de pele <sup>101, 102</sup>. Nas últimas três décadas, o melanoma representou a segunda maior incidência de câncer, com uma das maiores taxas de mortalidade <sup>107</sup>.



**Figura 4.** Câncer de pele <sup>59</sup>

Recomenda-se o uso de filtros solares com fator de proteção (FPS) 15 diariamente. Aplicado corretamente na infância e na adolescência, pode-se reduzir a incidência de câncer de pele em 78% <sup>16, 48, 104</sup>.

Para reduzir a exposição a radiação ultravioleta em 65% deve-se evitar os raios solares entre as 10:00 horas às 14:00 horas <sup>16</sup>. Aconselha-se o uso de chapéus, camisetas, guarda-sol e protetores solares diariamente.

## 2.3- FILTROS SOLARES

As substâncias químicas com capacidade de proteger a pele contra os efeitos lesivos da radiação ultravioleta por absorção ou reflexão/ dispersão são chamados de filtros solares <sup>74, 100</sup>.

A introdução dos filtros solares foi na década de 20, quando se verificou que os efeitos da queimadura proveniente do sol eram reduzidos com salicilato <sup>74</sup>. Em 1928, os Estados Unidos da América desenvolveram uma emulsão comercial contendo como filtros solares salicilato de benzila e cinamato de benzila <sup>2</sup>. Outros filtros solares foram introduzidos no mercado desde então. Compostos minerais como óxido de zinco e dióxido de titânio foram primeiramente empregados em produtos cosméticos como pó, base, sombra para olhos e lápis de maquiagem, sendo que em 1952, o dióxido de titânio foi descrito com propriedades de filtro solar <sup>96</sup>.

A conscientização das pessoas da necessidade do uso de filtros solares para evitar os efeitos maléficos da radiação ultravioleta, vem aumentando com o decorrer dos anos. Estudos comprovam que o uso de filtros solares promove a diminuição de rugas e do fotoenvelhecimento <sup>10, 35, 102, 112</sup>. Quando usado

corretamente, contribui para a diminuição da incidência de câncer de pele induzido pela radiação ultravioleta em 200 vezes <sup>91</sup>.

Atualmente, vários produtos cosméticos e farmacêuticos contêm filtros solares em suas formulações, tais como xampus, condicionadores, géis e cremes para a pele, batons etc.

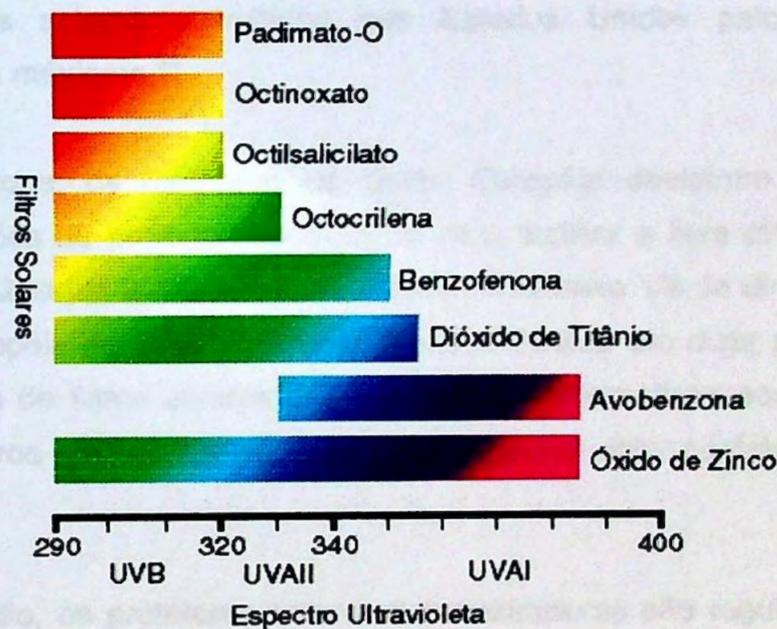
Os filtros solares são divididos em duas categorias: absorventes químicos e bloqueadores físicos.

**Absorventes Químicos:** São substâncias translúcidas que promovem a absorção da radiação ultravioleta transformando-a em uma onda eletromagnética com maior comprimento de onda, portanto menos energética. São usualmente compostos aromáticos com grupos cromóforos amina, metoxila ou carboxila em posições orto ou para do anel aromático <sup>94, 95</sup>. Quando a radiação ultravioleta atinge um elétron do composto, este fica em um nível de energia maior ou em estado excitado. Para voltar ao estado inicial, o composto emite a energia absorvida sob forma de radiação infravermelha (calor), com maior comprimento de onda e menos energética devido a ressonância do anel aromático <sup>94, 103</sup>. Dependendo da faixa de absorção, os absorventes químicos são classificados como: absorventes UVA (avobenzonas, antranilatos e benzofenona), UVB (cinamatos, salicilatos e ésteres do ácido p-aminobenzóico) ou UVA/UVB (benzofenonas) quando abrange uma larga faixa de comprimento de onda <sup>11, 24, 25, 39, 54, 62, 75, 79, 105</sup>.

**Bloqueadores Físicos:** Agem como barreira, refletindo ou dispersando a radiação ultravioleta <sup>75, 94, 100, 105</sup>. Devido ao desenvolvimento tecnológico, os bloqueadores físicos sob a forma micronizada possibilitam que a luz visível não seja refletida. Portanto, formam um filme aparentemente transparente sobre a pele, sendo ainda capazes de dispersar a radiação. São compostos, geralmente

inorgânicos e incluem: óxido de zinco, dióxido de titânio, caulim, petrolato vermelho <sup>24, 39, 54, 74, 94, 95, 100, 105</sup>.

Para a obtenção de produtos com fotoproteção adequada, torna-se necessário a junção de dois ou mais filtros solares associados, sendo interessante abranger um maior espectro de absorção possível. A **Figura 5** mostra o espectro de absorção de alguns filtros solares.



**Figura 5. Espectro de Absorção de filtros solares <sup>24</sup>**

## 2.4- REGULAMENTAÇÕES DE FILTROS SOLARES

Com o uso generalizado de filtros solares em produtos cosméticos, tomou-se inevitável o surgimento de uma regulamentação para definir os que realmente sejam eficazes e seguros, bem como as metodologias para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS). A primeira regulamentação provisória foi publicada em 1978 pelo FDA (Food and Drug Administration) e a partir disso, outros países também aderiram a regulamentar os filtros solares. O **Quadro 2** descreve a atual lista de filtros solares permitidos nos Estados Unidos pelo FDA e suas concentrações máximas <sup>34</sup>.

Na Europa, os membros da União Européia decidiram harmonizar as regulamentações de produtos cosméticos para facilitar a livre circulação desses produtos. O **Quadro 2** descreve um resumo do Anexo VII da diretiva 76/768/EC da União Européia de 1999. O Anexo VII está dividida em duas partes: Parte I - contém a lista de filtros solares que os produtos cosméticos podem conter e a Parte 2, os filtros solares que provisoriamente podem estar contidos nos produtos cosméticos <sup>31</sup>.

No Japão, os protetores solares e bronzeadores são regulados pelo CLS (The Comprehensive Licensing Standards) e JSCI (Japanese Standards of Cosmetic Ingredients). Várias concentrações são estipuladas para um mesmo filtro solar dependendo do produto a ser incorporado, o **Quadro 2** apresenta os filtros solares permitidos pelo CLS do Japão de 1994 e suas concentrações máximas <sup>49</sup>.

No Brasil, o anexo IV da **Resolução 79** de 28 de agosto de 2000 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) <sup>4</sup> lista os filtros solares permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, como resumido no **Quadro 2**, com suas concentrações máximas permitidas.

**Quadro 2. Filtros Solares e suas respectivas concentrações máximas (%) para os Estados Unidos, Japão, União Européia e Brasil**

| Filtros Solares  | Concentração Máxima Permitida (g/100g) |                     |                  |                     |
|--|--|---------------------|------------------|---------------------|
|  | EUA <sup>34</sup>                      | Japão <sup>48</sup> | UE <sup>31</sup> | Brasil <sup>4</sup> |
| 1,3 Pentanodiona 1-(3,4 dimetoxi-fenil) 4,4-dimetil                  | —                                      | 7                   | —                | —                   |
| Propionato 2-etil-hexil dimetoxi-benzilideno dioximidazolidina       | —                                      | 3                   | —                | —                   |
| 3-Benzilideno-cânfora  | —                                      | —                   | 2                | 6                   |
| 3-(4-Metil-benzilideno)-cânfora                                      | —                                      | —                   | 4                | 6                   |
| Amil dimetil PABA  | —                                      | 10                  | —                | —                   |
| Benzofenona-1  | —                                      | 10                  | —                | —                   |
| Benzofenona-2  | —                                      | 10                  | —                | 10                  |
| Benzofenona-3  | 6                                      | 5                   | 10               | 10                  |
| Benzofenona-4  | 10                                     | 10                  | 5*               | 10*                 |
| Benzofenona-5  | —                                      | 10                  | —                | —                   |
| Benzofenona-6  | —                                      | 10                  | —                | —                   |
| Benzofenona-8  | 3                                      | —                   | —                | 3                   |
| Benzofenona-9  | —                                      | 10                  | —                | —                   |
| Ácido benzilideno cânfora sulfônico                                  | —                                      | —                   | 6                | 6                   |
| Butil-metoxi-dibenzoil-metano  | 3                                      | 10                  | 5                | 5                   |
| Metil sulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-ilidenemetil) anilina | —                                      | —                   | 6                | 6                   |
| Cinoxato   | 3                                      | 5                   | —                | 3                   |
| 4-Metoxicinamato de dietanolamina                                    | —                                      | —                   | —                | 10                  |
| Dietil-hexil butamido triazona                                       | —                                      | —                   | 10               | —                   |
| Diisopropil metil cinamato   | —                                      | 10                  | —                | —                   |
| Dimeticodietil benzalmalonato  | —                                      | —                   | 10               | —                   |
| Drometrisol Trisiloxano  | —                                      | —                   | 15               | —                   |
| Etil-hexil-dihidroxi-propil PABA                                     | —                                      | —                   | —                | 5                   |
| Etil-hexil-dimetil PABA  | 8                                      | 10                  | 8*               | 8                   |
| 4-Metoxicinamato de 2-etil-hexila                                    | 7,5                                    | 20                  | 10               | 10                  |
| Salicilato de 2-etil-hexila  | 5                                      | 10                  | 5                | 5                   |

|  |                 |    |                |                |
|--|-----------------|----|----------------|----------------|
| Etil-hexil triazona                          | —               | 3  | 5              | 5              |
| Ácido Ferúlico                               | —               | 10 | —              | —              |
| Gliceril PABA                                | —               | 4  | —              | 3              |
| Homosalato                                   | 15              | 10 | 10             | 15             |
| 4-Metoxicinamato de Isoamila                 | —               | —  | 10             | —              |
| Metoxicinamato de Isopropila                 | —               | 10 | —              | 10             |
| Antranilato de metila                        | 5               | —  | —              | 5              |
| Octocrileno                                  | 10              | 10 | 10             | 10             |
| PABA   | 15 <sup>a</sup> | 4  | 5              | 15             |
| PEG-25 PABA                                  | —               | —  | 10             | 10             |
| Ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico        | 4               | 3  | 8              | 8 <sup>a</sup> |
| Poliacrilamido-metil benzilideno cânfora     | —               | —  | 6              | 6              |
| Salicilato de trietanolamina                 | 12              | —  | —              | 12             |
| Ácido de Tereftalilideno dicânfora sulfônico | —               | 10 | 10             | 10             |
| Dióxido de titânio                           | 25              | SL | 25             | 25             |
| Óxido de zinco                               | 25              | SL | SL             | SL             |
| Salicilato de 4-isopropil benzila            | —               | —  | 4 <sup>*</sup> | 4              |
| Trioleato de digaloíla                       | —               | —  | —              | 5              |
| Vaselina vermelha                            | —               | —  | —              | SL             |

SL = Sem limite, \* = Permitido até 30.06.1999 (EU), <sup>a</sup> = Expresso como ácido

## 2.5- FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR

O fator de proteção solar (FPS) determina o grau de proteção que um produto cosmético fornece a pele contra os efeitos eritematógenos da radiação ultravioleta. Devido a esse fato, o FPS indica a proteção apenas contra a radiação UV-B, sendo a proteção UV-A um experimento mais complexo que ainda não está padronizado <sup>42, 86</sup>.

A primeira determinação do FPS *in vivo* foi realizado por R. Schulze, em 1956 <sup>86</sup>. Adotando a dose eritematógena mínima (DEM) como referencial, relacionou o tempo necessário para o aparecimento de eritema em uma pele com protetor solar, ao tempo necessário de aparecimento de eritema em uma pele desprotegida <sup>9, 86, 88</sup>. O FPS é calculado pela Equação 1.

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEM com proteção}}{\text{DEM sem proteção}} \quad \text{Eq. 1}$$

Pode-se determinar o fator de proteção (FPS) de um produto cosmético por testes *in vivo* <sup>9, 21, 43, 83</sup> ou *in vitro* <sup>7, 27, 28, 29, 65</sup>.

O FPS *in vivo* é realizado em voluntários (10 a 20 indivíduos), aplicando-se 2g de protetor solar na área de pele delimitada. Avalia-se a relação entre tempo e formação de eritema na pele protegida e não protegida por filtro solar <sup>21</sup>.

Devido ao alto custo dos testes *in vivo*, foram desenvolvidos métodos mais baratos, rápidos e práticos, que consistem nos testes de FPS *in vitro*. Mansur <sup>65</sup> descreveu o método espectrofotométrico, que consistia na diluição dos filtros solares e determinação das absorvâncias nos seguintes comprimentos de onda ( $\lambda$ ): 290nm, 295nm, 300nm, 305nm, 310nm, 315nm e 320nm. Cada absorvância obtida será multiplicada ao seu respectivo efeito eritemogênico e intensidade do

sol. No Quadro 3, encontram-se os EE (Efeito eritemogênico) x I (Intensidade da radiação) normalizados para cada comprimento de onda.

**Quadro 3.** Ponderação empregada no cálculo do FPS

| Comprimento de onda ( $\lambda$ )<br>(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                    |

O FPS espectrofotométrico pode ser calculado empregando a Equação 2:

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad \text{Eq. 2}$$

**Onde:**

FC = Fator de correção (= 10)

EE ( $\lambda$ ) = Efeito eritemogênico da radiação em cada comprimento de onda

I ( $\lambda$ ) = Intensidade da radiação em cada comprimento de onda

Abs = Absorbância obtida em cada comprimento de onda

O método de Mansur é empregado em muitos laboratório de Controle de Qualidade para a determinação de FPS, devido ser prático e rápido. Mais ainda, não substitui completamente o teste *in vivo*.

Com o intuito de realizar um teste *in vitro* mais compatível com o sistema biológico, foram empregados substratos como resinas plásticas, silicone <sup>27, 28</sup> e colágeno sintético hidratado <sup>29</sup> para simularem a pele humana. O protetor solar é aplicado sobre o substrato (1mg de produto por cm<sup>2</sup>) e irradiado com um simulador solar (radiação ultravioleta entre 290 a 400nm) e submetido a análise espectrofotométrica empregando analisador equipado com medidor de transmitância "Labsphere UV-1000S" <sup>29</sup>.

## 2.6- ELETROFORESE CAPILAR

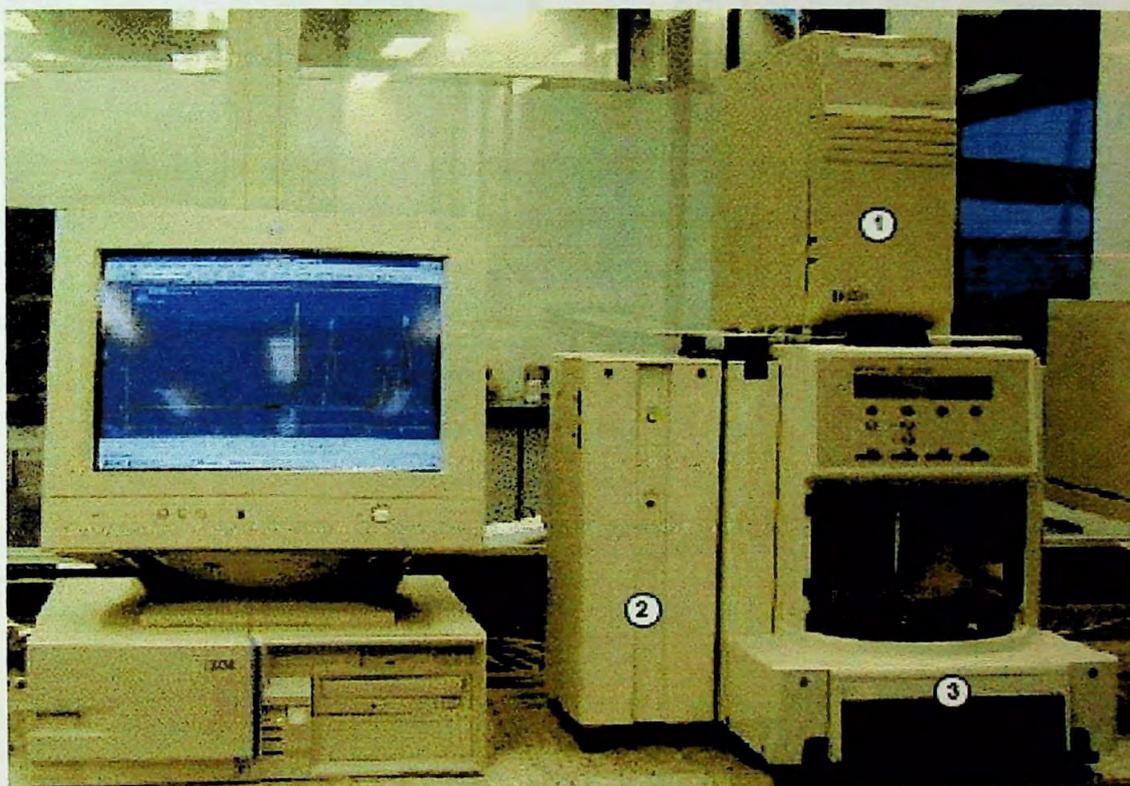
A eletroforese capilar é uma técnica analítica que oferece separação rápida, de baixo custo e de alta eficiência. As áreas de aplicação variam desde análises de íons inorgânicos e orgânicos simples, compostos quirais até complexas macromoléculas tais como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos. Aplicações para a análise de medicamentos são descritos em literatura <sup>92</sup>.

A eletroforese capilar é definida como o transporte de compostos eletricamente carregados em soluções sobre a influência de um campo elétrico num capilar <sup>110</sup>.

A eletroforese foi introduzida por Tiselius, no início da década de 30, tendo recebido o Prêmio Nobel em 1948 pela separação parcial de algumas proteínas do soro sanguíneo <sup>110</sup>.

Somente em 1981, com a introdução de capilar de diâmetro interno menor que 100µm, que a eletroforese demonstrou ser capaz de atuar como uma técnica analítica moderna de uso rotineiro, possibilitando separações de alta eficiência com suficiente dissipação do calor, mesmo empregando alta tensão <sup>83</sup>.

Em relação a instrumentação necessária para uma análise em eletroforese capilar tem-se: capilar de diâmetro interno entre 25 a 100 $\mu$ m acoplado a um detector (UV, UV-Visível, fluorescência, espectrofotometria de massa, etc.), fornecedor de alta tensão, sistema de introdução de amostra (amostrador automático) e um computador para a análise dos dados obtidos (Figura 6).



1. Detector UV
2. Fonte de Alta Tensão
3. Amostrador Automático

**Figura 6. Eletroforese Capilar e seus componentes**

A introdução da amostra em eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia capilar eletrocinética micelar, pode ser realizada por injeção hidrodinâmica e eletrocinética. Comparando-se as injeções, a hidrodinâmica é mais constante e independente da mobilidade do soluto <sup>58, 120</sup>.

Há vários modos de separação, a **eletroforese capilar de zona** (de solução livre, micelar e gel), a **focalização isoelétrica capilar**, a **isotacoforese capilar**.

A eletroforese capilar de solução livre (FSCE – free solution capillary electrophoresis ou CZE – capillary zone electrophoresis) é um dos modos de separação eletroforético mais empregado devido sua facilidade de implementação e otimização das condições experimentais <sup>58, 120</sup>. Em FSCE o tubo capilar é preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes.

O processo de separação de compostos depende de vários fatores como: fluxo eletroosmótico, mobilidade eletroosmótica e mobilidade eletroforética.

O fluxo eletroosmótico (EOF) é causado pela carga da superfície interna do capilar de sílica fundida adquirida quando este é preenchido por solução tampão <sup>58, 92, 120</sup>.

A velocidade do fluxo eletroosmótico,  $v_{EOF}$ , pode ser calculada pela Equação 3:

$$v_{EOF} = \xi \zeta E / 4\pi\eta \quad \text{Eq.3}$$

Onde:

$\xi$  = constante dielétrica do tampão

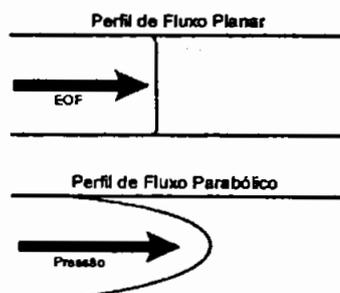
$\zeta$  = potencial zeta (carga na superfície do capilar)

$E$  = tensão aplicada em volts/cm

$\eta$  = viscosidade do tampão

A partir das paredes do capilar, o fluxo eletroosmótico (EOF) origina um perfil de fluxo planar, que contribui significativamente para a elevada eficiência dos picos obtidos. Esse perfil contrasta com o encontrado em cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE), que resulta um perfil parabólico (Figura 7) devido a alta pressão do sistema <sup>92</sup>.



**Figura 7.** Tipos de perfis de fluxo: Planar em sistemas de Eletroforese Capilar e Parabólico em CLAE

A mobilidade eletrosmótica é dependente das características do tampão (pH, concentração, constante dielétrica, viscosidade), sendo independente da tensão aplicada <sup>58, 92, 120</sup>.

A mobilidade eletrosmótica,  $\mu_{EOF}$ , do tampão é dada pela Equação 4:

$$\mu_{EOF} = \xi \zeta / 4\pi\eta \quad \text{Eq.4}$$

A mobilidade eletroforética é conseguida pelas diferentes velocidades de migração dos solutos no tampão, sendo dependente da tensão <sup>58, 92, 120</sup>.

A mobilidade eletroforética é dada pela Equação 5:

$$\mu_{EP} = Q / 6\pi\eta r \quad \text{Eq.5}$$

Onde:

$\mu_{EP}$  = mobilidade eletroforética

$Q$  = carga do soluto ionizado

$\eta$  = viscosidade do tampão

$r$  = raio do íon

A cromatografia capilar eletrocinética micelar é empregada para separar compostos neutros. Agentes tensoativos iônicos são adicionados ao eletrólito para a formação de micelas (moléculas agregadas de tensoativos que são compostos com propriedades anfífilas, contendo regiões hidrofílica e hidrofóbica na mesma estrutura). A separação de compostos neutros é resultante da partição equilibrada entre as micelas (fase pseudo estacionária) e a fase eletrólita aquosa <sup>58, 120</sup>.

A eletroforese capilar em gel é empregada para a separação de compostos iônicos e com alta massa molecular, biomoléculas como DNA <sup>58, 111, 120</sup>.

A focalização isoeétrica é limitada para a separação de compostos anfotéricos (compostos com grupos funcionais com caráter ácido e básico – por exemplo, proteínas). Os compostos são separados não devido a suas mobilidades como ocorre nos outros modos eletroforéticos, mas devido as diferenças de pontos isoeletricos ( $pI$ ) <sup>61</sup>.

A isotacoforese capilar é uma técnica de separação pouco empregada nos laboratórios industriais. Consiste no processo de separação por meio de um sistema eletrólito heterogêneo. Os compostos são separados quando a amostra é introduzida entre um sistema tampão descontínuo, constituído de um eletrólito líder e um eletrólito terminador <sup>58, 110, 111, 120</sup>.

## 2.7- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia consiste na separação de componentes em uma mistura, empregando a diferença de afinidade dos compostos, em relação a fase estacionária (sólido ou líquida) e fase móvel (líquida ou gás) <sup>52</sup>.

Historicamente, antes da década de 70 a cromatografia líquida se resumia a métodos qualitativos como a cromatografia em papel e camada delgada. Durante a década de 70, iniciou-se o emprego de pressão na cromatografia líquida para a diminuição do tempo de análise. Essa técnica precisava ser aperfeiçoada devido apresentar muita variação no fluxo (mL/min). Em meados de 70, são desenvolvidos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), colunas empacotadas acopladas aos detectores <sup>52</sup>. Da década de 80 até hoje, a CLAE é empregada para separação, purificação, identificação e quantificação de compostos <sup>109</sup>.

A cromatografia líquida de alta eficiência é usada em vários campos científicos (biotecnologia, biomedicina, bioquímica) e indústrias (farmacêutica, cosmética, de alimento) <sup>1</sup>.

A instrumentação básica para uma análise em CLAE consiste: bomba pneumática, injetor, coluna cromatográfica, detector, registrador e analisador de dados (computador) (Figura 8).

A bomba pneumática proporciona a mistura da fase móvel. Dependendo da separação pretendida no método analítico, pode-se ter uma fase móvel polar ou apolar. Trabalhando-se com a mesma proporção de fase móvel durante toda uma análise tem-se uma fase com eluição isocrática. Ao ocorrer variação na proporção da fase móvel, ao longo da análise, tem-se uma eluição de gradiente. O gradiente é empregado para a separação de que envolve um grande número de compostos.

Durante todas as análises, é recomendável o uso de reagentes grau cromatográfico, para evitar interferências.

A injeção dos compostos na CLAE pode ser empregando uma seringa de injeção ou de uma válvula de amostragem <sup>109</sup>.

A coluna consiste na fase chamada "estacionária", a eficiência da separação entre os compostos depende do coeficiente de partição do soluto entre a fase móvel e coluna cromatográfica <sup>1, 92, 109</sup>. A coluna mais comum é a empacotada com sílica (polar). Para a análise de compostos com polaridade moderada como fármacos, cosméticos e pesticidas, desenvolveu-se uma coluna apolar com 18 carbonos (C18), chamada de fase reversa. A primeira coluna de fase reversa foi introduzida em 1949, por Martin <sup>32</sup>. Atualmente, há vários tipos de empacotamento: amina, 8 carbonos (C8), C18 end-capped.

Para prolongar a vida útil da coluna cromatográfica emprega-se a "pré-coluna" que consiste em uma coluna menor colocada entre o injetor e a coluna cromatográfica. Evita-se perda de eficiência devido a presença de material particulado ou de substâncias provenientes da amostras que podem ficar fortemente adsorvidos na fase estacionária da coluna <sup>23</sup>.

O detector emite as respostas do compostos eluidos da coluna cromatográfica em forma de sinais (picos). Há vários tipos de detectores: absorção ultravioleta/visível, fluorescência, condutimétrica, espectroscopia de massa, índice de refração <sup>1, 23, 109</sup>.



1. Degaseificador
2. Bomba quaternária
3. Amostrador automático
4. Controlador de temperatura / coluna cromatográfica
5. Detector UV/visível

**Figura 8.** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e seus componentes

Visa-se na CLAE a maior eficiência, seletividade, sensibilidade e resolução entre os compostos analisados <sup>23, 52</sup>.

A eficiência cromatográfica de dois ou mais compostos depende das velocidades relativas de eluição dos mesmos, dependentes do coeficiente de partição de cada composto entre a fase estacionária e a fase móvel <sup>52</sup>.

A seletividade produz resposta para uma variedade de compostos que podem ser distinguidos em uma separação cromatográfica. A sensibilidade consiste na menor quantidade detectável do composto analisado, sendo dependente do detector empregado. A resolução consiste na separação entre os compostos, de forma que a determinação quantitativa possa ser realizada <sup>1, 23, 52, 109</sup>.

O fator de capacidade é um parâmetro que descreve a velocidade de migração do soluto sobre a coluna cromatográfica <sup>52</sup>, pode ser calculado pela Equação 6.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad \text{Eq.6}$$

Onde:

$k'$  = Fator de capacidade

$t_R$  = Tempo de retenção do composto analisado

$t_0$  = Tempo de um composto que não é retido na coluna cromatográfica

O tempo de retenção consiste no tempo necessário para que o máximo de um composto alcance o detector, após eluição em uma coluna cromatográfica <sup>52</sup>.

## 2.8- VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação faz parte da evolução do conceito de qualidade, onde a prevenção tomou-se primordial e economicamente mais viável dentro da realidade cada vez mais competitiva.

Atualmente a validação constitui-se em uma das principais ferramentas da Garantia da Qualidade <sup>71</sup> aprimorando conceitos de Monitoramento de Processo e Controle de Qualidade.

A validação de um método analítico pode ser definido como o processo que fornece uma evidência documentada, através de estudos de laboratório, de que realiza aquilo para o qual é indicado a fazer. O desempenho é expresso em termos de características analíticas <sup>117</sup>.

Como foi mencionado acima há várias vantagens quando se realiza a validação, como: reprodutibilidade analítica, repetibilidade dos resultados, redução de custos, evidências documentadas e qualidade assegurada do produto final. Deve-se ressaltar que a Validação de Método Analítico faz parte integrante do sistema de controle de qualidade e é requisitado pelas Boas e Atuais Práticas de Fabricação <sup>40</sup>.

Os requisitos necessários antes e durante a validação de um método analítico podem ser citados como: definição de um plano de validação, qualificação da instrumentação, treinamento do operador, calibração de vidrarias, Procedimento Operacional Padrão (POP) de execução do método e relatório de validação <sup>57</sup>.

Para a validação de um método analítico os seguintes parâmetros analíticos devem ser avaliados como: exatidão, precisão, linearidade, limite de

detecção, limite de quantificação, especificidade, robustez, resistência, estabilidade da solução e adequabilidade do sistema.

A exatidão descreve o grau de concordância dos resultados do teste ao valor verdadeiro. Adicionam-se quantidades conhecidas do composto de interesse ao placebo e avalia-se a % de recuperação <sup>5, 46, 47, 80, 81, 108, 114, 115</sup>.

A precisão é a avaliação da dispersão dos resultados obtidos de múltipla amostragem de uma mesma amostra homogênea <sup>46, 47, 80, 81, 108, 114, 115</sup>. A precisão é considerada em 3 níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade <sup>46, 47</sup>.

A linearidade é a habilidade do método, dentro de uma certa faixa, de obter resultados que são diretamente proporcionais a concentração do composto estudado. Recomenda-se o mínimo de 5 concentrações do composto estudado na presença e ausência de placebo, com coeficiente de correlação maior que 0,999 <sup>13, 47</sup>.

O Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) são usualmente empregados em validação de método para a determinação de impurezas ou produtos de degradação por se apresentarem em baixas concentrações em um produto. O limite de detecção é definido como a menor quantidade do composto estudo que é detectado e o limite de quantificação é a menor quantidade que pode ser quantificado com precisão e exatidão <sup>15, 45, 46, 47, 117</sup>.

A especificidade é a capacidade de avaliar de forma inequívoca o composto de estudo na presença de outros componentes da formulação (matriz, impurezas, degradantes) <sup>13</sup>.

A robustez é a capacidade do método de permanecer inalterado por pequenas e deliberadas variações de parâmetros analíticos <sup>46, 47</sup>.

A resistência é a medida de reprodutibilidade dos resultados sob variação em condições normalmente esperadas de laboratório a laboratório, de analista a analista <sup>117</sup>.

O teste de adequabilidade do sistema consiste na verificação do sistema como um todo (equipamento, amostra, operações analíticas, componentes eletrônicos) para garantir seu desempenho antes e durante a análise de uma amostra <sup>117</sup>.

O FDA disponibiliza na Internet, o "Procedimento analítico e validação de métodos" provisório que ainda não foi implementado. Esta última versão de 2000 demonstra uma interação entre FDA e ICH para sua elaboração e o aprimoramento da diretriz adicionando um "pacote de validação de método" <sup>14, 114</sup> que resume o mínimo que um validação de método analítico necessita estar estudando.

## 2.9- MÉTODOS DE ANÁLISE DE FILTROS SOLARES

A avaliação da eficácia de um protetor solar pode ser determinada por métodos *in vivo* e *in vitro* <sup>89</sup>.

Os métodos *in vivo* são os mais aceitos pelos órgãos regulatórios como FDA e COLIPA devido representar a eficiência do filtro solar no sistema biológico (pele) <sup>86</sup>. Contudo são métodos de alto custos e não práticos. Para a análise de Controle de Qualidade de produtos que contenham filtros solares recomenda-se o uso de métodos *in vitro*, por serem mais baratos, práticos e rápidos <sup>29</sup>.

Os métodos *in vitro* empregados para a quantificação de filtros solares para assegurar a qualidade dos produtos cosméticos são a espectrofotometria e a cromatografia (de camada delgada ou a CLAE).

DIFFEY e colaboradores <sup>27</sup> verificaram o FPS *in vitro* de formulações cosméticas comerciais com diferentes filtros solares, concentrações e associações. Entre os produtos comerciais analisados, encontra-se uma associação entre benzofenona-4 e octilmetoxicinamato, e outra de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 2-fenil-5-metilbenzoxazol. Foram realizadas avaliações de FPS, aplicando os produtos sobre um substrato (Transpore™), para simular a pele humana. Posteriormente, as amostras foram irradiadas com radiação ultravioleta e a avaliação foi determinado por espectroscopia de transmissão.

DIFFEY e TANNER <sup>29</sup> publicaram em 2000 a avaliação da eficácia, por método *in vitro*, em protetores solares empregando como substrato colágeno sintético hidratado. Entre os 59 produtos comerciais, 3 continham a associação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e octilmetoxicinamato. A transmitância foi determinado para cada amostra exposta a radiação ultravioleta para a avaliação da eficácia do protetor solar.

WESTERHOF e KAMMEYER <sup>122</sup> avaliaram a estabilidade de vários filtros solares, dentre eles, benzofenona-4 e ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico em 16 produtos comerciais. Empregaram a cromatografia de camada delgada para verificar o aparecimento de degradantes após a irradiação ultravioleta dos produtos cosméticos estudados.

MICHAUD e SOTO <sup>70</sup> empregaram a espectrofotometria derivada para a avaliação de protetores solares contendo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 2-etil-hexil-metoxicinamato de octila, usando como solvente propilenoglicol. Analisaram os mesmo filtros por CLAE, usando coluna de fase reversa LiChrosorb<sup>®</sup> RP18, detecção a 313nm, fase móvel contendo metanol e água na proporção (90:10, v/v) e fluxo de 1,0mL/min.

POTARD e colaboradores <sup>84</sup> empregaram a CLAE para o estudo *in vitro* da penetração percutânea de 5 filtros solares (octocrileno, octiltriazona, benzofenona-3, benzofenona-4 e octilmetoxicinamato). Para a análise de benzofenona-4 foram descritos as seguintes condições cromatográficas: Coluna de fase reversa Novapack<sup>®</sup> C18 (dimensões: 150 x 3,9mm com tamanho de partícula de 4 $\mu$ m), pré-coluna Novapack<sup>®</sup> C18 (dimensões: 10 x 3,9mm com tamanho de partícula de 4 $\mu$ m), detector UV a 285nm, fase móvel constituída por metanol e água (60:40, v/v) e o solvente de diluição das amostras foi metanol e água (25:75, v/v). O método descrito foi validado, obtendo-se repetibilidade de 2,5% e recuperação de 97% para benzofenona-4.

COUTEAU e CULLEL <sup>22</sup> descreveram um método para quantificar a absorção de benzofenona-4 e PEG-25 em seres humanos. Foram realizados experimentos com os filtros solares diluídos em água e contidos em emulsões. Após a aplicação dos filtros solares numa área delimitada de pele de 4 cm<sup>2</sup> em voluntários sadios de 22 a 34 anos, verificou-se a recuperação dos filtros solares,

por meio da extração de fitas adesivas adequadas aplicadas na região do teste. Os filtros solares extraídos das fitas adesivas foram analisados por CLAE, usando coluna cromatográfica Nucleosil C8 (dimensões: 250 x 4mm), gradiente na fase móvel de metanol e água a 1% de ácido acético, a porcentagem de metanol aumenta de 80 a 100% em 10 min e fluxo de 1,0mL/min <sup>118</sup>.

BERNHARDT e colaboradores <sup>8</sup> verificaram a proteção dos cabelos com o uso de filtros solares. Benzofenona-4, ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico, benzofenona-3 e octil dimetil PABA foram aplicados sob a forma de spray e loção aos cabelos, irradiados com radiação ultravioleta e analisados por espectrofotometria UV (determinação da % de filtros remanescentes).

AZEVEDO e VIANAJR <sup>6</sup> determinaram ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 por espectrofotometria derivada, empregando solventes como trietanolamina e etanol 95%. A validação do método resultou boa linearidade, percentual de recuperação entre 97,28 a 103,71% e coeficiente de variação entre 0,55 a 1,12%.

RASTOGI e JENSEN <sup>89</sup> desenvolveram um método de identificação de 20 filtros solares, dentre eles, benzofenona-4 e ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico empregando CLAE. As condições cromatográficas foram: coluna de fase reversa PLRP-S (dimensões: 150mm x 4,6mm, tamanho de partícula 5µm e poro de 100Å), pré-coluna PLRP-S, detector UV empregando varredura de 240 a 400nm, fase móvel constituída por tampão, acetonitrila e tetrahydrofurano (80:10:10, v/v/v). O tampão consistia em uma solução aquosa contendo 1,4g de ácido cítrico monohidratado e 6,8g de hidróxido de tetrabutilamônio por litro, com pH ajustado para 9,0 com hidróxido de amônio. O método mostrou-se adequado para a identificação de vários filtros solares em cremes e loções comerciais.

GAGLIARDI e colaboradores <sup>37</sup> descreveram uma determinação quantitativa de 14 filtros solares por cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE), dentre eles ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, empregando coluna cromatográfica de fase reversa LiChrosorb® RP-18 (Merck) (dimensões: 250mm x 4,6mm com tamanho de partícula de 10µm), detector a 311nm. Fase móvel com gradiente, inicialmente com acetonitrila e água (5:95, v/v) contendo ácido perclórico 1mM e perclorato de sódio 50mM, variando linearmente a 35% de acetonitrila em 20 min, após 5 min com essa composição, outro gradiente se inicia a 80% de acetonitrila até 40 min. Fluxo de 2,5mL/min, temperatura da coluna a 30°C. O método foi validado obtendo-se reprodutibilidade entre 97,6 a 99,6% e % de desvio padrão de 0,9 a 2,0%.

SCHNEIDER e BRINGHEN <sup>93</sup> relatam a separação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, dentre 10 filtros solares por CLAE. Empregaram coluna cromatográfica de fase reversa Inertsil ODS-2 (dimensões: 150mm x 4,6mm com tamanho de partícula de 5µm), detector UV a 325nm, volume de injeção de 10µL, fluxo de 1,2mL/min. Fase móvel inicialmente isocrática, solução aquosa de ácido trifluoracético 0,1% (p/v), metanol e acetonitrila (65:28:7, v/v/v) por 2 min, gradiente de 28 a 80% de metanol em 0,5 min, mantendo a proporção de acetonitrila constante, e em 13,5 min mantém a proporção (13:80:7, v/v/v) de solução de ácido trifluoracético 0,1%, metanol e acetonitrila, respectivamente.

CHISVERT e colaboradores <sup>20</sup> determinaram benzofenona-4, oxibenzona, octil dimetil PABA, octilmetoxicinamato, octil salicilato e homosalato por CLAE. Empregaram coluna cromatográfica de fase reversa C18, detecção a 313nm, fase móvel etanol, água e ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) e fluxo de 0,5mL/min. Limite de detecção dos filtros solares entre 0,2 a 20mg/L.

CHISVERT e PASCUAL-MARTÍ <sup>19</sup> analisaram 7 filtros solares, dentre eles benzofenona-4 por cromatografia líquida de alta eficiência. As condições cromatográficas usadas foram: coluna cromatográfica de fase reversa

LiChrospher® RP-18 (Merck), dimensões: 125mm x 4mm de tamanho de partícula de 5µm e poro de 100 Å. Fase móvel água, ácido acético e etanol (39,5:0,5:70, v/v/v) contendo 65,4mM de hidroxipropil β-ciclodextrina, com fluxo de 0,6mL/min e detecção a 313nm. Limite de detecção dos filtros solares entre 1,5 a 2,3mg/L e desvio padrão relativo menor que 2,5%.

CHISVERT e VIDAL<sup>18</sup> avaliaram benzofenona-4 e ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico por injeções seqüenciais em eluições seletivas por extração de fase sólida acoplado a espectrofotômetro ultravioleta. Utilizaram sistema de injeções seqüenciais, microcoluna de troca iônica SAX LiChrolut® (Merck) que proporciona separação dos filtros solares devido variação de pH do eluente e espectrofotômetro UV-Visível. Limite de detecção de 0,6µg/mL para benzofenona-4 e 1,6µg/mL para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. O desvio padrão relativo foram 1-12% para benzofenona-4 e 1-6% para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico.

### 3-OBJETIVOS

- Separar, identificar e quantificar os filtros solares químicos benzofenona-4 e ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico incorporados em associação em formulação cosmética dos Laboratórios Stiefel, por métodos cromatográfico e de eletroforese capilar.
- Validação dos métodos empregados para a determinação de filtros solares.
- Comparação dos resultados obtidos com as duas metodologias por análise estatística.

## 4-PLANEJAMENTO

O trabalho experimental foi desenvolvido de acordo com as seguintes etapas:

- Revisão bibliográfica sobre o tema escolhido.
- Pesquisa bibliográfica dos métodos analíticos empregados para a determinação de filtros solares.
- Revisão bibliográfica dos efeitos causados pela radiação ultravioleta na pele.
- Levantamento bibliográfico das teorias das técnicas analíticas empregadas, como determinação de FPS *in vivo* e *in vitro*, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar.
- Padronização dos métodos analíticos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar.
- Aplicação dos métodos analíticos padronizados em amostras dos Laboratórios Stiefel e simuladas.
- Pesquisa de interferentes nos métodos padronizados.
- Validação dos métodos empregados.
- Na validação dos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e de eletroforese capilar (EC) foram avaliados: precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), robustez, estabilidade das soluções (amostras e padrões).

- **Análise estatística dos resultados obtidos.**
- **Avaliação dos resultados.**
- **Comparação da exatidão e precisão entre as metodologias empregadas.**
- **Comparação dos parâmetros eletroforéticos e cromatográficos obtidos na determinação de benzofenona-4 e ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico.**

## 5-MATERIAL

### 5.1- SOLVENTES, REAGENTES E TAMPÕES

- Todos os reagentes e solventes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.
  - Metanol grau cromatográfico (Omnisolv)
  - Acetonitrila grau cromatográfico (Omnisolv)
  - Água deionizada (Milli-Q)
  - Ácido Fosfórico (Nuclear)
  - Fosfato de potássio monobásico (Synth)
  - Fosfato de sódio dibásico (Synth)
  - Tetraborato de sódio (Merck)
  
- Soluções tampões
  - A. Solução tampão borato de 5mM (pH 9,2):** Foram pesados 1,9052g de tetraborato de sódio decahidratado e transferidos para balão volumétrico de 1000mL e dissolvidos com água deionizada. A solução foi filtrada através de membrana de nylon de 0,45 $\mu$ m.
  
  - B. Solução tampão borato de 10mM (pH 9,2):** Foram pesados 3,8103g de tetraborato de sódio decahidratado e transferidos para balão volumétrico de 1000mL e dissolvidos com água deionizada. A solução foi filtrada através de membrana de nylon de 0,45 $\mu$ m.
  
  - C. Solução tampão borato de 20mM (pH 9,2):** Foram pesados 7,6206 g de tetraborato de sódio decahidratado e transferidos para balão volumétrico

de 1000mL e dissolvidos com água deionizada. A solução foi filtrada através de membrana de nylon de 0,45 $\mu$ m.

**D. Solução tampão fosfato (pH 6,5):** Foram pesados 4,5008g de fosfato de potássio monobásico e 6,0006g de fosfato de sódio dibásico e transferidos para béquer de 1000mL e dissolvidos em 900mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 6,5 com ácido fosfórico e transferido para balão volumétrico de 1000mL. Completou-se o volume com água deionizada e a solução foi filtrada através de membrana de nylon de 0,45 $\mu$ m.

## 5.2- FILTROS QUÍMICOS EMPREGADOS COMO PADRÃO

### 5.2.1- Ácido 2-Fenilbenzimidazol 5-Sulfônico <sup>30</sup>

**Nome Comercial:** Eusolex<sup>®</sup> 232 (Merck), Parsol<sup>®</sup> HS (Givaudan-Roure), Neo-Heliopan Hydro<sup>®</sup> (Galena)

**Peso Molecular:** 274,3g/mol

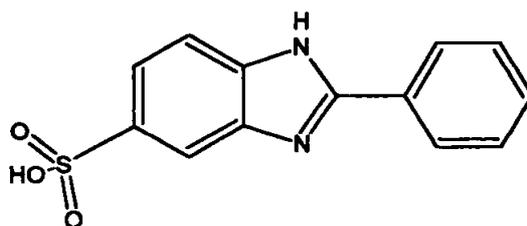
**Fórmula Molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S

**Propriedades Físicas:** pó branco, praticamente inodoro, ponto de fusão >300°C.

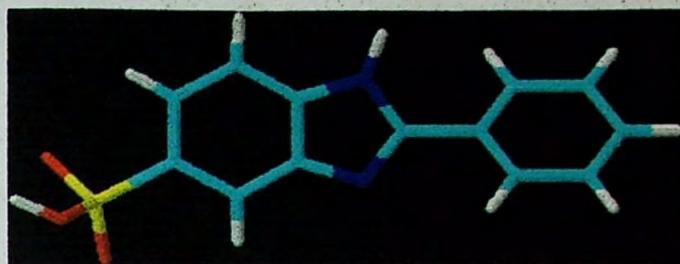
**Propriedades Químicas:** Solúvel em solução aquosa básica.

**Características UV:** λ máximo a 302nm em solução de hidróxido de sódio 0,0002M.

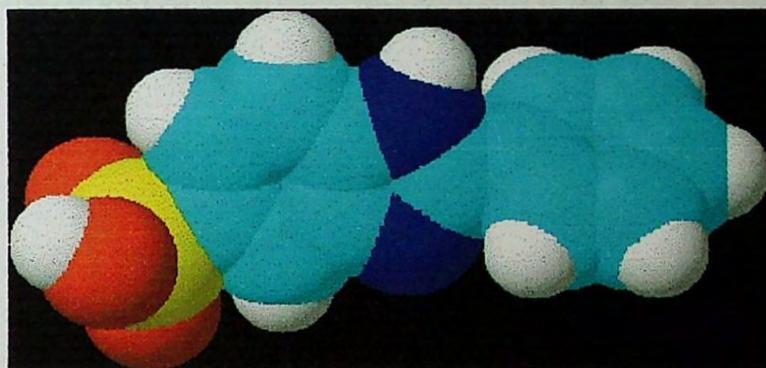
**Armazenagem:** Armazenar em recipiente fechado em área seca e fria, protegido da luz.



**Figura 9.** Representação da estrutura molecular do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico empregando Software "Advanced Chemistry Development ChemSketch 4.0".



**Figura 10.** Representação da estrutura molecular em 3D do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico empregando Software "Advanced Chemistry Development ChemSketch 4.0".



**Figura 11.** Representação da estrutura molecular em 3D do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico empregando Software "Advanced Chemistry Development ChemSketch 4.0".

### 5.2.2- Benzofenona-4 <sup>30</sup>

**Nome Comercial:** Escalol<sup>®</sup> 577 (ISP), UVINUL<sup>®</sup> MS40 (BASF)

**Peso Molecular:** 308g/mol

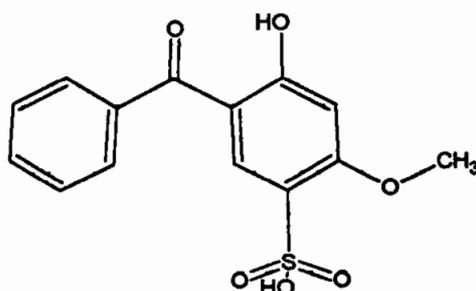
**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>S

**Propriedades Físicas:** Pó levemente amarelado, higroscópico.

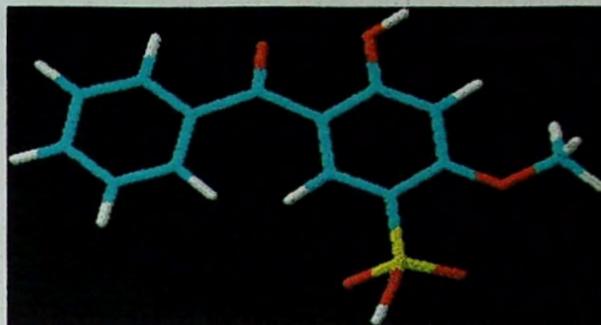
**Propriedades Químicas:** Solúvel em água, etanol, metanol.

**Características UV:** λ máximo a 285nm e 325nm em água destilada.

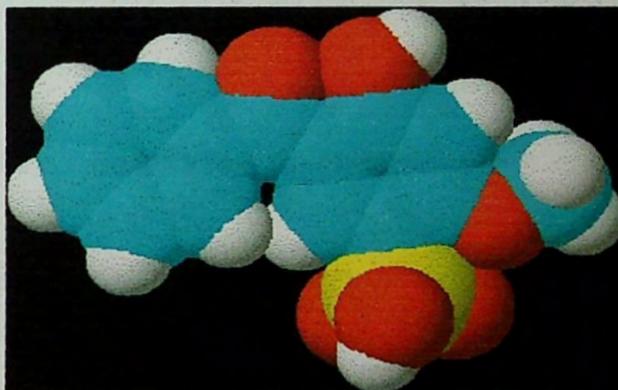
**Armazenagem:** Armazenar em recipiente fechado em área seca e fria.



**Figura 12.** Representação da estrutura molecular de benzofenona-4 empregando Software "Advanced Chemistry Development ChemSketch 4.0".



**Figura 13.** Representação da estrutura molecular 3D de benzofenona-4 empregando Software "Advanced Chemistry Development ChemSketch 4.0".



**Figura 14.** Representação da estrutura molecular 3D de benzofenona-4 empregando Software "Advanced Chemistry Development ChemSketch 4.0".

### 5.3- AMOSTRAS

#### AMOSTRA 1: Amostra comercial (gel)

|  |        |
|--|--------|
| Benzofenona-4.....                         | 1,0g   |
| Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico..... | 7,0g   |
| Excipiente q.s.p.....                      | 100,0g |

#### AMOSTRA 2: Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico da amostra comercial (gel)

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Benzofenona-4.....    | 1,0g   |
| Excipiente q.s.p..... | 100,0g |

#### AMOSTRA 3: Placebo de benzofenona-4 da amostra comercial (gel)

|  |        |
|--|--------|
| Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico..... | 7,0g   |
| Excipiente q.s.p.....                      | 100,0g |

#### AMOSTRA 4: Amostra simulada

|  |        |
|--|--------|
| Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico..... | 7,0g   |
| Hidróxido de sódio.....                    | qs     |
| Hidroxietilcelulose.....                   | 1,0g   |
| Fenoxietanol.....                          | 0,7g   |
| Metilparabeno.....                         | 0,2g   |
| Água purificada q.s.p.....                 | 100,0g |

**AMOSTRA 5: Amostra simulada**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Benzofenona-4.....         | 1,0g   |
| Hidróxido de sódio.....    | qs     |
| Hidroxietilcelulose.....   | 1,0g   |
| Fenoxietanol.....          | 0,7g   |
| Metilparabeno.....         | 0,2g   |
| Água purificada q.s.p..... | 100,0g |

**AMOSTRA 6: Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 da amostra comercial (gel)**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Excipiente ..... | 100,0g |
|------------------|--------|

#### 5.4- EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS

- Espectrofotômetro ultravioleta/visível: HP Modelo 8453, Cubeta de 1cm e acoplado a impressora HP deskjet 692C.
- Eletroforese Capilar, Marca Crystal<sup>®</sup>, Modelo 310 acoplado a um detector UV-Visível TSP (Thermo Separation Products), modelo UV3000.
- Capilar, Marca HP, de sílica fundida de 45cm x 75µm d.i. (100cm de comprimento total). O capilar foi condicionado com NaOH 1N por 15 minutos, água por 5min e eletrólito de corrido por 15min.
- Aparelho de Ultra-som, Marca Branson, Modelo 5210.
- Cromatógrafo Líquido Marca HP, Modelo 1100, Detector UV DAD, Modelo HP 1100.
- Coluna Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm x 5µm.
- Membrana de filtração de solução Millipore<sup>®</sup> de 0,45µm.
- Medidor de pH, Marca Mettler Toledo, Modelo MP220.
- Aparelho Milli-Q<sup>®</sup> Plus Millipore para obtenção de água de uso em CE e CLAE.
- Balança Analítica, Marca Mettler Toledo, capacidade 210g, Precisão +/- 0,0001g.
- Unidades filtrantes MILLEX HV 0,45µm.
- Câmara de fotoestabilidade, Marca Sanyo<sup>®</sup>.
- Banho maria, Marca Pemem<sup>®</sup>, Modelo PE-156.
- Estufa, Marca Heraeus Instruments<sup>®</sup>, Modelo T6120.

## **6-MÉTODOS**

### **6.1- IDENTIFICAÇÃO DOS FILTROS SOLARES**

#### **6.1.1- Determinação da Solubilidade**

Seguiu-se o procedimento da Farmacopéia Americana 24<sup>a</sup> ed. <sup>116</sup>.

#### **6.1.2- Espectro de Absorbância no Ultravioleta**

##### **Preparação da solução padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico**

Foram pesados exatamente cerca de 50,0mg de padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentração de 500,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

Uma alíquota de 5,0mL dessa solução foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com o tampão borato 10mM. Obteve-se concentração de 25,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

Uma alíquota de 20,0mL da solução de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (25µg/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 25mL, completando-se o volume com tampão de borato 10mM. Obteve-se concentração final de 20,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

## **Preparação da solução padrão de benzofenona-4**

Foram pesados exatamente cerca de 50,0mg de padrão de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentração de 500,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

Uma alíquota de 5,0mL dessa solução foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com o tampão borato 10mM. Obteve-se concentração de 25,0 $\mu$ g benzofenona-4/mL.

Uma alíquota de 20,0mL da solução de benzofenona-4 (25 $\mu$ g/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 25mL, completando-se o volume com tampão de borato 10mM. Obteve-se concentração final de 20,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

## **6.2- MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **6.2.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

#### **ESTUDOS PRELIMINARES**

Visando determinar a fase móvel ideal para a aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram realizados vários experimentos empregando diversas combinações de tampão fosfato, acetonitrila e metanol. Foram testadas soluções de tampão fosfato, acetonitrila e metanol nas seguintes proporções: 50:5:45 (v/v/v) e 58:5:37 (v/v/v). Selecionou-se a fase móvel que apresentou melhor resolução dos picos, tampão fosfato, acetonitrila e metanol na proporção 58:5:37 (v/v/v).

Os seguintes sistemas foram estudados:

#### **6.2.1.A. Sistema 1**

Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 50:5:45 (v/v/v)

Fluxo da fase móvel: 0,5mL/min

Coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula

Deteção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min

Temperatura: 20°C

### **6.2.1.B. Sistema 2**

Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v)

Fluxo da fase móvel: 0,5mL/min

Coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula

Deteccção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min

Temperatura: 20°C

Com o sistema 2, foram realizadas corridas cromatográficas que resultaram no estudo dos espectros de absorção UV em 3D dos filtros solares.

### **Preparação da solução padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico**

Foram pesados exatamente cerca de 70,0mg de 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentração de 700,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

## Procedimento

Uma alíquota de 10,0mL da solução padrão (700,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato. Obteve-se concentração de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

Após degasificação da solução de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL com auxílio de banho de ultra-som por 5 min, foram injetados 10 $\mu$ L da solução no cromatógrafo.

## Preparação da solução padrão de benzofenona-4

Foram pesados exatamente cerca de 100,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentração de 1000,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

Uma alíquota de 10,0mL da solução padrão (1000,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato. Obteve-se concentração de 100,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

## Procedimento

Uma alíquota de 10,0mL da solução padrão (100,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato. Obteve-se concentração de 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

Após degasificação da solução de 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL com auxílio de banho de ultra-som por 5 min, foram injetados 10 $\mu$ L da solução no cromatógrafo.

### **Preparação da solução padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4**

Foram pesados exatamente cerca de 70,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentração de 700,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

Foram pesados exatamente cerca de 100,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentração final de 1000,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

Uma alíquota de 10,0mL da solução padrão (1000,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato. Obteve-se concentração de 100,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

### **Procedimento**

Foram transferidas alíquotas de 10,0mL da solução padrão (700,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL) e 10,0mL da solução padrão (100,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL) para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato. Obteve-se concentração de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

Após degasificação da solução de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 com auxílio de banho de ultra-som por 5 min, foram injetados 10 $\mu$ L da solução no cromatógrafo.

## 6.2.2- Eletroforese Capilar

### ESTUDOS PRELIMINARES

Foram estudados os seguintes sistemas:

#### 6.2.2.A. Sistema 1

Eletrólito: Tampão borato 5mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-A)

Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i.

Deteção: 217nm

Temperatura: 24 a 30°C

#### 6.2.2.B. Sistema 2

Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B)

Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i.

Deteção: 217nm

Temperatura: 24 a 30°C

### **6.2.2.C. Sistema 3**

Eletrólito: Tampão borato 20mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-C)

Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i.

Detecção: 217nm

Temperatura: 24 a 30°C

### **Preparação da solução padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico**

Foram pesados exatamente cerca de 35,0mg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato (preparado conforme item 5.1-A, 5.1-B ou 5.1-C, dependendo do Sistema estudado). Obteve-se concentração de 350,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

### **Preparação da solução padrão de benzofenona-4**

Foram pesados exatamente cerca de 35,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato (preparado conforme item 5.1-A, 5.1-B ou 5.1-C, dependendo do Sistema estudado). Obteve-se concentração de 350,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

### **Preparação da solução padrão interno**

Foram pesados exatamente cerca de 200,0mg de benzoato de sódio e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e

completando-se o volume com tampão borato (preparado conforme item 5.1-A, 5.1-B ou 5.1-C, dependendo do sistema estudado). Obteve-se concentração de 2000,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL.

## Procedimento

O capilar de sílica fundida foi condicionado com hidróxido de sódio 1N por 15 min, água deionizada por 10 min e com o eletrólito de corrida por 15 min.

Foram transferidas alíquotas de 20,0mL da solução padrão (350,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL) e 3,0mL da solução padrão (350,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL) para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão borato (preparado conforme item 5.1-A, 5.1-B ou 5.1-C, dependendo do sistema estudado). Obteve-se concentrações finais de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

Uma alíquota 5,0mL da solução de padrão interno (2000,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão borato (preparado conforme item 5.1-A, 5.1-B ou 5.1-C, dependendo do Sistema estudado). Obteve-se concentração final de 100,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL.

Após degasificação da solução de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL e da solução de padrão interno (100 $\mu$ g/mL) com auxílio de banho de ultra-som por 5 min, foram injetados 20mbar x 0,20min (injeção hidrodinâmica) das soluções, no capilar condicionado, aplicando-se uma tensão de 29kV.

## **6.3- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA SELECIONADA**

### **6.3.1- Determinação de Ácido 2-Fenilbenzimidazol 5-Sulfônico e Benzofenona-4 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

#### **6.3.1.1- Padronização do Método**

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

- Fase móvel: tampão fosfato, acetonitrila e metanol (58:5:37, v/v/v)
- Fluxo da fase móvel: 0,5mL/min
- Coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula
- Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min
- Temperatura: 20°C
- Volume de injeção: 10µL

#### **6.3.1.2- Construção da Curva de Calibração**

##### **A- Preparação da solução padrão**

Foram pesados exatamente cerca de 140,0mg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 20,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 200mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentrações finais de 700,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 100,0µg de benzofenona-4/mL.

## B- Procedimento

Alíquotas de 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mL da solução padrão (700,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 100,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL) foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato. Obteve-se concentrações finais de 14,0; 35,0; 70,0; 105,0 e 140,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

Após degasificação das soluções padrões dos filtros solares com auxílio de banho de ultra-som por 5 min, foram injetados 10 $\mu$ L de cada solução no cromatógrafo.

As curvas de calibração do método cromatográfico para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 foram construídas plotando-se a concentração versus a área do pico obtido. A equação da reta para cada filtro solar foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

### 6.3.1.3- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram determinados empregando soluções padrão de baixa concentração, possibilitando a detecção e quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 em amostra comercial.

#### Procedimento:

Foram preparadas soluções contendo 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0µg/mL de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e de benzofenona-4.

Foram efetuadas cinco leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão entre os resultados obtidos.

Os cálculos para o limite de detecção e para o limite de quantificação foram realizados empregando as equações 7 e 8, respectivamente <sup>45, 46, 117</sup>.

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 3 \quad \text{Eq. 7}$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10 \quad \text{Eq. 8}$$

### **6.3.1.4- Aplicação do Método Padronizado às amostras Comerciais e Simuladas**

#### **6.3.1.4.1- Pesquisa de Interferentes**

A pesquisa de interferentes é realizada com o uso de placebos (de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4) e amostra. Neste experimento, empregou-se a amostra comercial e seus respectivos placebos. De acordo com o ICH (International Conference on Harmonisation) <sup>46,47</sup> e FDA<sup>117</sup>, amostras e placebos devem ser submetidos a condições de estresse como exposição à luz, ao calor, a oxidação e a hidrólise básica e ácida, comparando-se os resultados a amostra e placebos controles.

Para o estresse de amostras e placebos, foram empregadas as seguintes condições::

- Exposição à luz: aproximadamente 1000mg de amostras e placebos em balões volumétricos de 100,0mL foram submetidos à luz artificial a 12kLux (câmara de fotoestabilidade) por 7 dias.
- Exposição ao calor: aproximadamente 1000mg de amostras e placebos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL foram aquecidos a 80°C por 7 horas. Posteriormente, foram mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.
- Oxidação: Foram adicionados 5mL de peróxido de hidrogênio 3% em aproximadamente 1000mg de amostras e placebos contidos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL. Sendo mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.
- Hidrólise ácida: Foram adicionados 5mL de ácido clorídrico 1N em aproximadamente 1000mg de amostras e placebos contidos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL. Sendo mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.

- Hidrólise básica: Foram adicionados 5mL de hidróxido de sódio 1N em aproximadamente 1000mg de amostras e placebos contidos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL. Sendo mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.

Os experimentos descritos foram comparados com controles de amostras e placebos, mantidos a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Após o período de reação, as análises foram efetuadas de acordo com a preparação da amostra descrita a seguir.

A finalidade do estresse de amostras e placebos é o de simular as condições adversas que esses produtos possam enfrentar desde o transporte até o armazenamento. Dessa forma, há a investigação de possíveis interferentes que possam surgir devido a degradação dos filtros solares ou componentes (excipientes) da formulação.

O **Quadro 4** sintetiza as preparações necessárias para a pesquisa de interferentes, sendo o número de tomadas de ensaio (TE) igual a 3 e o número de injeção (Nº Inj) de cada tomada de ensaio igual a 1.

Pesquisou-se também interferentes no placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 da amostra comercial (Amostra 6) armazenado a temperatura ambiente, sem ser submetida às condições de estresse.

**Quadro 4. Resumo das preparações para a pesquisa de interferentes**

|  | <b>Preparação</b>   | <b>Nº TE</b> | <b>Nº Inj</b> |
|--|---|--------------|---------------|
| Padrões  | De acordo com o método                                      | 3            | 2             |
| Amostra – Controle                                       | 1000mg a 4°C por 7 dias                                     | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Controle                         | 1000mg a 4°C por 7 dias                                     | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Controle | 1000mg a 4°C por 7 dias                                     | 3            | 1             |
| Amostra – Calor  | 1000mg a 80°C por 7h  | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Calor                            | 1000mg a 80°C por 7h  | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Calor    | 1000mg a 80°C por 7h  | 3            | 1             |
| Amostra – Luz  | 1000mg a 12 kLux por 7 dias                                 | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Luz                              | 1000mg a 12 kLux por 7 dias                                 | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Luz      | 1000mg a 12 kLux por 7 dias                                 | 3            | 1             |
| Amostra – Ácido  | 1000mg + 5mL de HCl 1N por 7 dias                           | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Ácido                            | 1000mg + 5mL de HCl 1N por 7 dias                           | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Ácido    | 1000mg + 5mL de HCl 1N por 7 dias                           | 3            | 1             |
| Amostra – Base   | 1000mg + 5mL de NaOH 1N por 7 dias                          | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Base                             | 1000mg + 5mL de NaOH 1N por 7 dias                          | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Base     | 1000mg + 5mL de NaOH 1N por 7 dias                          | 3            | 1             |
| Amostra – Oxidação                                       | 1000mg + 5mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 7 dias | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Oxidação                         | 1000mg + 5mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 7 dias | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Oxidação | 1000mg + 5mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 7 dias | 3            | 1             |

**Nº TE** = Número de Tomadas de Ensaio, **Nº Inj** = Número de Injeções por Tomada de Ensaio

**Amostra** = Amostra 1 (amostra comercial)

**Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico** = Amostra 2 (Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico da amostra comercial)

**Placebo de benzofenona-4** = Amostra 3 (Placebo de benzofenona-4 da amostra comercial)

## **A- Preparação da solução padrão**

Foram pesados exatamente cerca de 70,0mg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentração de 700,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

Foram pesados 100,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentração de 1000 $\mu$ g benzofenona-4/mL.

Uma alíquota 10,0mL da solução padrão de benzofenona-4 (1000 $\mu$ g benzofenona-4/mL) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentração de 100,0 $\mu$ g benzofenona-4/mL.

Foram transferidas alíquotas de 10,0mL da solução padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (700,0 $\mu$ g/mL) e 10,0mL da solução padrão de benzofenona-4 (100,0 $\mu$ g/mL) para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentrações finais de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

## **B- Preparação da solução amostra comercial (Amostra 1)**

Foi pesado 1,0g de amostra comercial (Amostra 1), equivalente 70,0mg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 10,0mg de benzofenona-4, transferindo-se para balão volumétrico âmbar de 100mL e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D).

Uma alíquota de 10,0mL da solução amostra comercial (Amostra 1) foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato. Obteve-se concentrações equivalentes a 70,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0µg de benzofenona-4/mL.

## **C- Preparação das soluções placebo (Placebos da amostra comercial)**

Foi pesado 1,0g de placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico da amostra comercial (Amostra 2), procedendo-se, conforme a preparação da solução amostra.

Foi pesado 1,0g de placebo de benzofenona-4 da amostra comercial (Amostra 3), procedendo-se, conforme a preparação da solução amostra.

Foi pesado 1,0g de placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 da amostra comercial (Amostra 6), procedendo-se, conforme a preparação da solução amostra.

### **6.3.1.4.2- Determinação do teor de cada filtro solar nas amostras comerciais e simuladas**

#### **A- Preparação da solução padrão**

Foram utilizados como padrão a média aritmética das corridas cromatográficas de 3 soluções padrão, injetadas em duplicata e preparadas conforme item **6.3.1.4.1-A**.

#### **B- Preparação das soluções amostra**

As soluções de cada amostra (Amostra 1, 4 e 5) foram preparadas conforme item **6.3.1.4.1-B**.

Foram realizadas 6 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

### 6.3.1.4.3- TESTE DE RECUPERAÇÃO

As concentrações empregadas no teste de recuperação estão relacionadas com a curva de calibração <sup>117</sup> do produto comercial (Amostra 1), em mg/mL.

A concentração da solução de análise do produto comercial é 100mg/mL que é equivalente a 70,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 10,0µg de benzofenona-4.

Dessa forma, quantidades conhecidas de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 foram adicionadas a 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6 = Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 da amostra comercial).

Foram realizados 6 determinações a 50%, 100% e 150% do valor nominal de cada filtro solar na faixa análise do produto (100% do valor nominal representa 70,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 10,0µg de benzofenona-4).

A porcentagem de recuperação para cada filtro, foi calculado empregando a Equação 9.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\% \text{ de filtro solar encontrado}}{\% \text{ de filtro solar adicionado}} \times 100 \quad \text{Eq. 9}$$

## **A- Preparação da solução padrão**

Foram utilizados como padrão a média aritmética das corridas cromatográficas de 3 soluções padrão, injetadas em duplicata e preparadas conforme item **6.3.1.4.1-A**.

## **B- Preparação das solução do teste de recuperação**

- **Solução Estoque**

Foram pesados exatamente cerca de 140,0 de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 20,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 200mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentrações de 700,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 100,0µg de benzofenona-4/mL.

- **Procedimento**

Para o teste de recuperação foram empregados concentrações equivalentes a 50%, 100% e 150% do valor nominal de cada filtro solar na faixa análise do produto comercial. Seis determinações foram realizadas para cada concentração.

Uma alíquota de 5,0mL da "Solução Estoque" foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL com 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6), completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentrações de 35,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 5,0µg de benzofenona-4/mL, que são equivalentes a **50% do valor nominal** de cada filtro solar na faixa análise do produto. Esse procedimento foi repetido para mais 5 tomadas de ensaio.

Uma alíquota de 10,0mL da Solução Estoque foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL com 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6), completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentrações de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL, que são equivalentes a **100% do valor nominal** de cada filtro solar na faixa análise do produto. Esse procedimento foi repetido para mais 5 tomadas de ensaio.

Uma alíquota de 15,0mL da Solução Estoque foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL com 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6), completando-se o volume com tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Obteve-se concentrações de 105,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 15,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL, que são equivalentes a **150% do valor nominal** de cada filtro solar na faixa análise do produto. Esse procedimento foi repetido para mais 5 tomadas de ensaio.

## **6.3.2- Determinação de Ácido 2-Fenilbenzimidazol 5-Sulfônico e Benzofenona-4 por Eletroforese Capilar**

### **6.3.2.1- Padronização do Método**

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

- Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B)
- Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i.
- Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica)
- Tensão: 29kV
- Detecção: 217nm
- Temperatura: 24 a 30°C

### **6.3.2.2- Construção da Curva de Calibração**

#### **A- Preparação da solução padrão**

Foram pesados exatamente cerca de 140,0mg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 20,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 200mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentrações finais de 700,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 100,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

## **B- Preparação da solução padrão interno**

Foram pesados exatamente cerca de 200,0mg de benzoato de sódio e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentração de 2000,0µg de benzoato de sódio/mL.

## **C- Procedimento**

Foram transferidas alíquotas de 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mL da solução padrão (700,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 100,0µg de benzofenona-4/mL) e 5,0mL da solução padrão interno (benzoato de sódio 2000,0µg de benzoato de sódio/mL) para balões volumétricos âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão borato 10mM. Obteve-se concentrações finais de 14,0; 35,0; 70,0; 105,0 e 140,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0µg de benzofenona-4/mL e 100,0µg/mL de benzoato de sódio em cada balão volumétrico

Após degasificação das soluções padrões com auxílio de banho de ultrassom por 5 min, foram injetadas no capilar.

As curvas de calibração do método por eletroforese capilar para cada filtro solar foram construídas plotando-se a concentração versus a razão das áreas dos picos (filtro solar / benzoato de sódio). A equação da reta para cada filtro solar foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

### 6.3.2.3- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram determinados empregando soluções padrão de baixa concentração, possibilitando a detecção e quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 em amostra comercial.

#### Procedimento:

Foram preparadas soluções contendo 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0µg/mL de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e de benzofenona-4.

Foram efetuadas cinco leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão entre os resultados obtidos.

Os cálculos para o limite de detecção e para o limite de quantificação foram realizados empregando as equações 7 e 8, respectivamente <sup>45, 46, 117</sup>.

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 3 \quad \text{Eq. 7}$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10 \quad \text{Eq. 8}$$

### **6.3.2.4- Aplicação do Método Padronizado às Amostras Comerciais e Simuladas**

#### **6.3.2.4.1- Pesquisa de Interferentes**

A pesquisa de interferentes é realizada com o uso de placebos (de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4) e amostra. Neste experimento, empregou-se a amostra comercial e seus respectivos placebos. De acordo com o ICH (International Conference on Harmonisation) <sup>46,47</sup> e FDA<sup>117</sup>, amostras e placebos devem ser submetidos a condições de estresse como exposição à luz, ao calor, a oxidação e a hidrólise básica e ácida, comparando-se os resultados a amostra e placebos controles.

Para o estresse de amostras e placebos, foram empregadas as seguintes condições::

- Exposição à luz: aproximadamente 100mg de amostras e placebos em balões volumétricos de 100,0mL foram submetidos à luz artificial a 12kLux (câmara de fotoestabilidade) por 7 dias.
- Exposição ao calor: aproximadamente 100mg de amostras e placebos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL foram aquecidos a 80°C por 7 horas. Posteriormente, foram mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.
- Oxidação: Foram adicionados 5mL de peróxido de hidrogênio 3% em aproximadamente 100mg de amostras e placebos contidos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL. Sendo mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.
- Hidrólise ácida: Foram adicionados 5mL de ácido clorídrico 1N em aproximadamente 100mg de amostras e placebos contidos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL. Sendo mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.

- **Hidrólise básica:** Foram adicionados 5mL de hidróxido de sódio 1N em aproximadamente 100mg de amostras e placebos contidos em balões volumétricos âmbar de 100,0mL. Sendo mantidos a 25°C, ao abrigo da luz por 7 dias.

Os experimentos descritos foram comparados com controles de amostras e placebos, mantidos a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Após o período de reação, as análises foram efetuadas de acordo com a preparação da amostra descrita a seguir.

A finalidade do estresse de amostras e placebos é o de simular as condições adversas que esses produtos possam enfrentar desde o transporte até o armazenamento. Dessa forma, há a investigação de possíveis interferentes que possam surgir devido a degradação dos filtros solares ou componentes (excipientes) da formulação.

O **Quadro 5** sintetiza as preparações necessárias para a pesquisa de interferentes, sendo o número de tomadas de ensaio (TE) igual a 3 e o número de injeção (Nº Inj) de cada tomada de ensaio igual a 1.

Pesquisou-se também interferentes no placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 da amostra comercial (Amostra 6) armazenado a temperatura ambiente, sem ser submetida às condições de estresse.

**Quadro 5. Resumo das preparações para a pesquisa de interferentes**

|  | <b>Preparação</b>  | <b>Nº TE</b> | <b>Nº Inj</b> |
|--|--|--------------|---------------|
| Padrões  | De acordo com o método                                     | 3            | 2             |
| Amostra – Controle                                       | 100mg a 4°C por 7 dias                                     | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Controle                         | 100mg a 4°C por 7 dias                                     | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Controle | 100mg a 4°C por 7 dias                                     | 3            | 1             |
| Amostra – Calor  | 100mg a 80°C por 7h  | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Calor                            | 100mg a 80°C por 7h  | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Calor    | 100mg a 80°C por 7h  | 3            | 1             |
| Amostra – Luz  | 100mg a 12 kLux por 7 dias                                 | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Luz                              | 100mg a 12 kLux por 7 dias                                 | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Luz      | 100mg a 12 kLux por 7 dias                                 | 3            | 1             |
| Amostra – Ácido  | 100mg + 5mL de HCl 1N por 7 dias                           | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Ácido                            | 100mg + 5mL de HCl 1N por 7 dias                           | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Ácido    | 100mg + 5mL de HCl 1N por 7 dias                           | 3            | 1             |
| Amostra – Base   | 100mg + 5mL de NaOH 1N por 7 dias                          | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Base                             | 100mg + 5mL de NaOH 1N por 7 dias                          | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Base     | 100mg + 5mL de NaOH 1N por 7 dias                          | 3            | 1             |
| Amostra – Oxidação                                       | 100mg + 5mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 7 dias | 3            | 1             |
| Placebo benzofenona-4 – Oxidação                         | 100mg + 5mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 7 dias | 3            | 1             |
| Placebo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico – Oxidação | 100mg + 5mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% por 7 dias | 3            | 1             |

**Nº TE** = Número de Tomadas de Ensaio, **Nº Inj** = Número de Injeções por Tomada de Ensaio

**Amostra** = Amostra 1 (amostra comercial)

**Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico** = Amostra 2 (Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico da amostra comercial)

**Placebo de benzofenona-4** = Amostra 3 (Placebo de benzofenona-4 da amostra comercial)

## **A- Preparação da solução padrão**

Foram pesados exatamente cerca de 35,0mg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentração de 350,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL.

Foram pesados 35,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentração de 350,0µg benzofenona-4/mL.

Foram transferidas alíquotas de 20,0mL da solução padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (350,0µg/mL), 3,0mL da solução padrão de benzofenona-4 (350,0µg/mL) e 5,0mL da solução de padrão interno (2000,0µg de benzoato de sódio/mL) para balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentrações finais de 70,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL, 10,5µg de benzofenona-4/mL e 100,0µg de benzoato de sódio/mL.

## **B- Preparação da solução padrão interno**

Foram pesados exatamente cerca de 200,0mg de benzoato de sódio e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentração de 2000,0µg de benzoato de sódio/mL.

### **C- Preparação da solução amostra comercial (Amostra 1)**

Foram pesados 100,0mg de amostra 1, equivalente 7,0mg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 1,0mg de benzofenona-4, transferindo-se para balão volumétrico âmbar de 100mL. Adicionou-se uma alíquota de 5,0mL da solução do padrão interno (2000,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL), completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentrações equivalentes a 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL, 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL e 100,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL.

### **D- Preparação da solução placebo (Placebos da amostra comercial)**

Foram pesados 100,0mg de placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico da amostra comercial (Amostra 2), procedendo-se, conforme a preparação da solução amostra.

Foram pesados 100,0mg de placebo de benzofenona-4 da amostra comercial (Amostra 3), procedendo-se, conforme a preparação da solução amostra.

Foram pesados 100,0mg de placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 da amostra comercial (Amostra 6), procedendo-se, conforme a preparação da solução amostra.

### **6.3.2.4.2- Determinação do Teor de cada Filtro Solar nas Amostras Comerciais e Simuladas**

#### **A- Preparação da solução padrão**

Foram utilizados como padrão a média aritmética das corridas cromatográficas de 3 soluções padrão, injetadas em duplicata e preparadas conforme item **6.3.2.4.1-A**.

#### **B- Preparação da solução padrão interno**

Solução preparada conforme item **6.3.2.4.1-B**.

#### **C- Preparação das soluções amostra**

As soluções de cada amostra (Amostra 1, 4 e 5) foram preparadas conforme item **6.3.2.4.1-C**.

Foram realizadas 6 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

### 6.3.2.4.3- Teste de Recuperação

As concentrações empregadas no teste de recuperação estão relacionadas com a faixa de análise <sup>117</sup> do produto comercial (Amostra 1), em mg/mL.

A concentração da solução de análise do produto comercial é 100mg/mL que é equivalente a 70,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 10,0µg de benzofenona-4.

Dessa forma, quantidades conhecidas de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 foram aplicadas a 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6 = Placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 da amostra comercial).

Foram realizados 6 determinações a 50%, 100% e 150% do valor nominal de cada filtro solar na faixa de análise do produto (100% do valor nominal representa 70,0µg de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 10,0µg de benzofenona-4).

A porcentagem de recuperação para cada filtro, foi calculado empregando a Equação 9.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\% \text{ de filtro solar encontrado}}{\% \text{ de filtro solar adicionado}} \times 100 \quad \text{Eq. 9}$$

### A- Preparação da solução padrão

Foram utilizados como padrão a média aritmética das corridas cromatográficas de 3 soluções padrão, injetadas em duplicata e preparadas conforme item **6.3.2.4.1-A**.

## B- Preparação das solução do teste de recuperação

- **Solução Estoque**

Foram pesados exatamente cerca de 140,0 de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 20,0mg de benzofenona-4 e transferidos para balão volumétrico âmbar de 200mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentrações de 700,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 100,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

- **Procedimento**

Para o teste de recuperação foram empregados concentrações equivalentes a 50%, 100% e 150% do valor nominal de cada filtro solar na faixa análise do produto comercial. Seis determinações foram realizadas para cada concentração.

Uma alíquota de 5,0mL da "Solução Estoque" foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL com 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6), completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentrações de 35,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 5,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL, que são equivalentes a 50% do valor nominal de cada filtro solar na faixa análise do produto. Esse procedimento foi repetido para mais 5 tomadas de ensaio.

Uma alíquota de 10,0mL da Solução Estoque foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL com 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6), completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentrações de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-

fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL, que são equivalentes a **100% do valor nominal** de cada filtro solar na faixa análise do produto. Esse procedimento foi repetido para mais 5 tomadas de ensaio.

Uma alíquota de 15,0mL da Solução Estoque foi transferida para balão volumétrico âmbar de 100mL com 100,0mg de placebo de filtros solares (Amostra 6), completando-se o volume com tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Obteve-se concentrações de 105,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 15,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL, que são equivalentes a **150% do valor nominal** de cada filtro solar na faixa análise do produto. Esse procedimento foi repetido para mais 5 tomadas de ensaio.

## **7- RESULTADOS**

### **7.1- IDENTIFICAÇÃO**

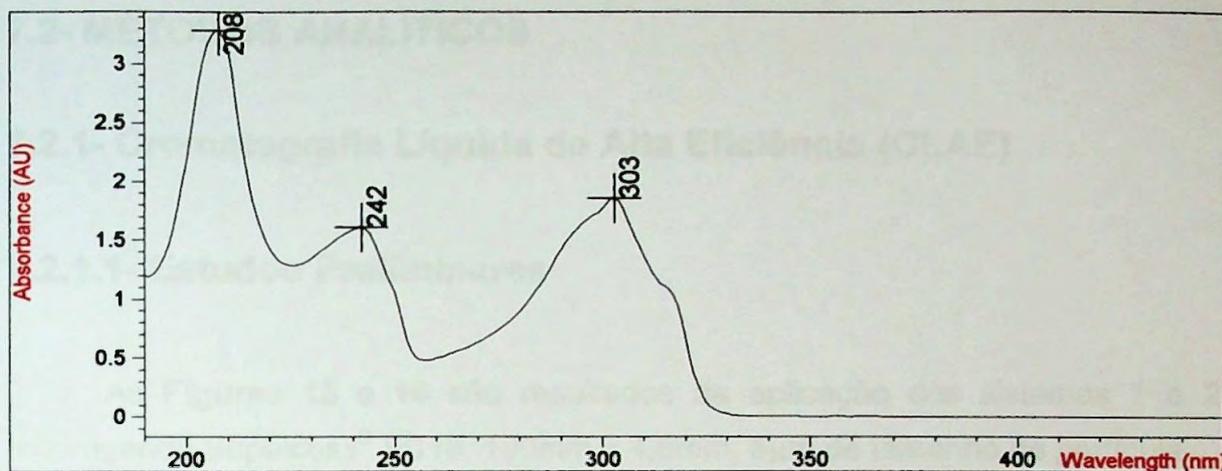
#### **7.1.1- Determinação da Solubilidade**

A benzofenona-4 mostrou-se solúvel em água, etanol e metanol e o ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico.

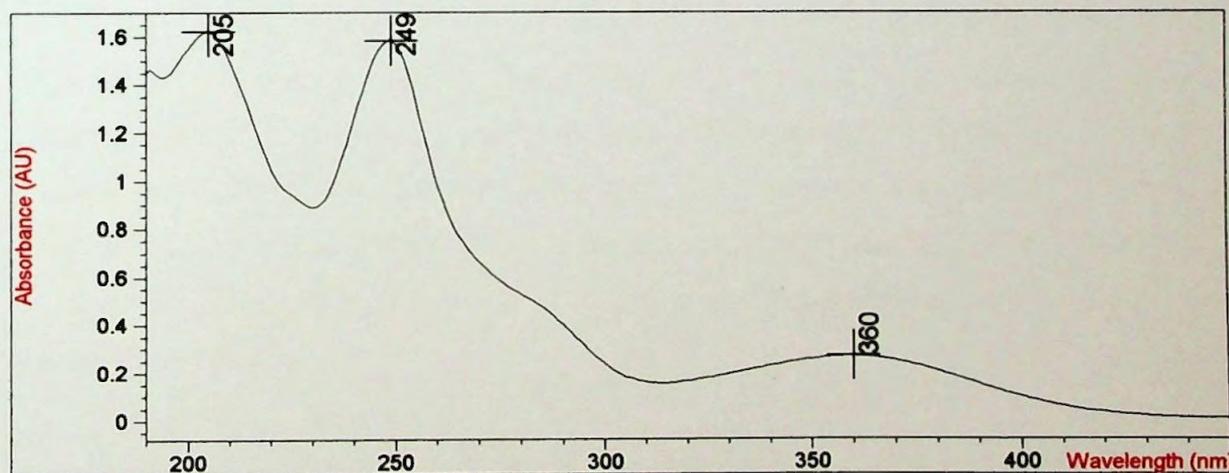
O Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico apresentou-se solúvel em solução aquosa básica.

#### **7.1.2- Espectro de Absorção no Ultravioleta**

Os Quadros 6 e 7 representam os espectros de absorção de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (20 $\mu$ g/mL) e benzofenona-4 (20 $\mu$ g/mL), respectivamente, em tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B).



**Quadro 6.** Espectro de absorção no UV para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico em tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Concentração de 20,0 $\mu$ g/mL. Picos máximos a 208, 242 e 303nm.



**Quadro 7.** Espectro de absorção no UV para benzofenona-4 em tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Concentração de 20,0 $\mu$ g/mL. Picos máximos a 205, 249 e 360nm.

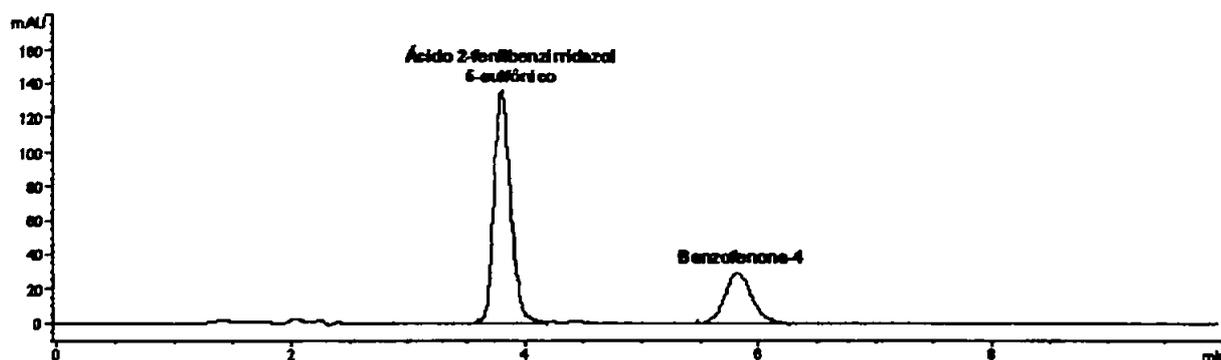
## **7.2- MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **7.2.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

#### **7.2.1.1- Estudos Preliminares**

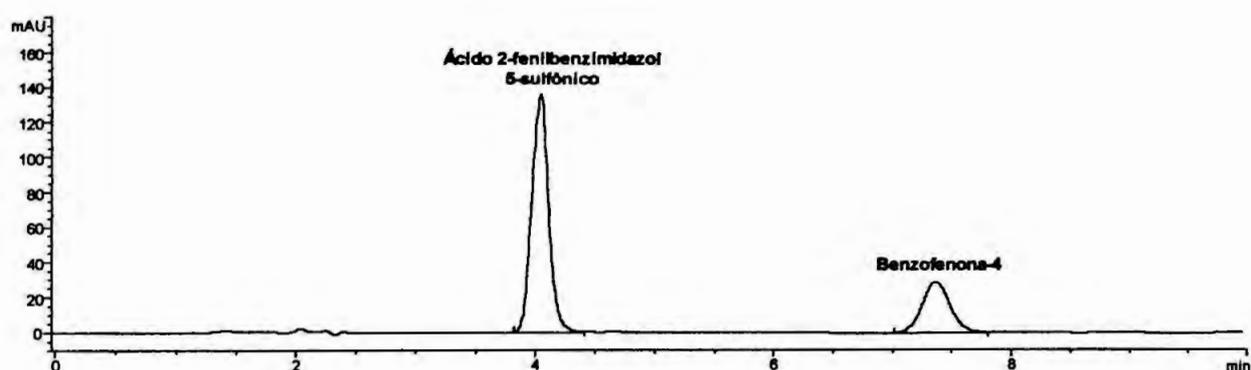
As Figuras 15 e 16 são resultados da aplicação dos sistemas 1 e 2, empregando Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula.

O estudo dos espectros de absorção UV em 3D dos filtros solares empregando o sistema 2, resultou no Quadro 8, com o qual se verifica a otimização da análise empregando 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min.



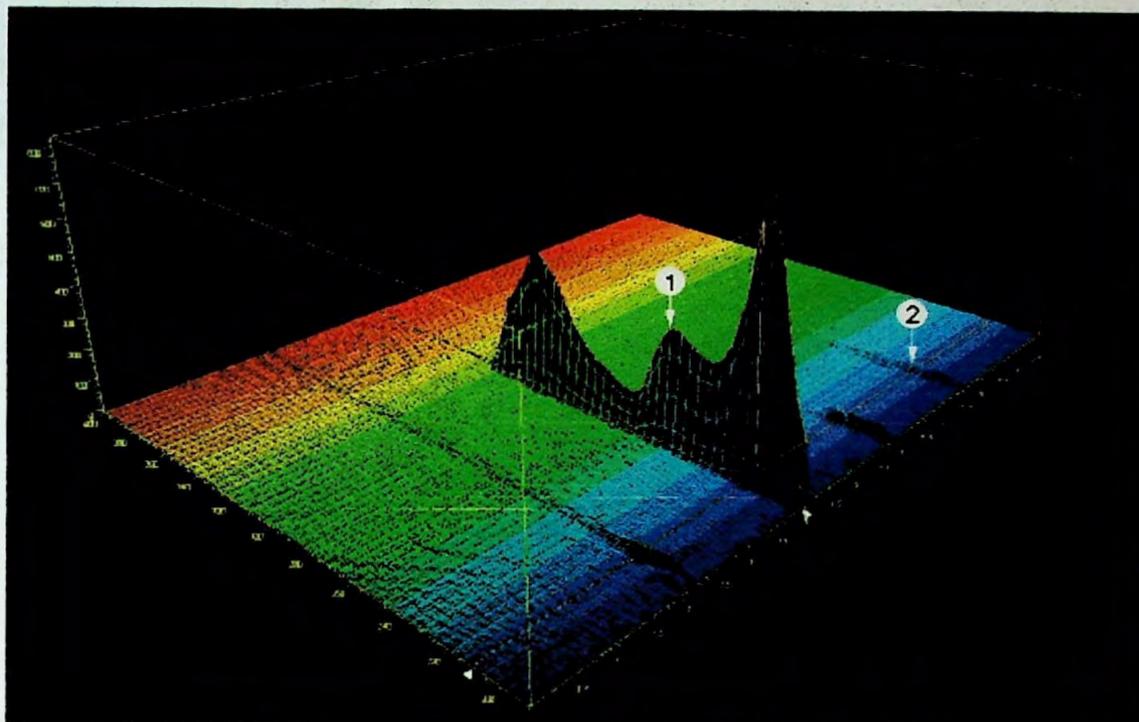
**Figura 15.** Cromatograma referente ao sistema 1.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 50:5:45 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L. Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL (tempo de retenção: 3,88 min) e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL (tempo de retenção: 5,89 min).



**Figura 16.** Cromatograma referente ao sistema 2.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L. Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL (tempo de retenção: 4,05 min) e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL (tempo de retenção: 7,52 min).



**Quadro 8.** Espectro de absorção UV em 3D referente ao sistema 2.

① Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico

② Benzofenona-4

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L. Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL (tempo de retenção: 4,05 min) e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL (tempo de retenção: 7,52 min).

## **7.2.1.2- Validação da Metodologia Analítica Seleccionada**

### **PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

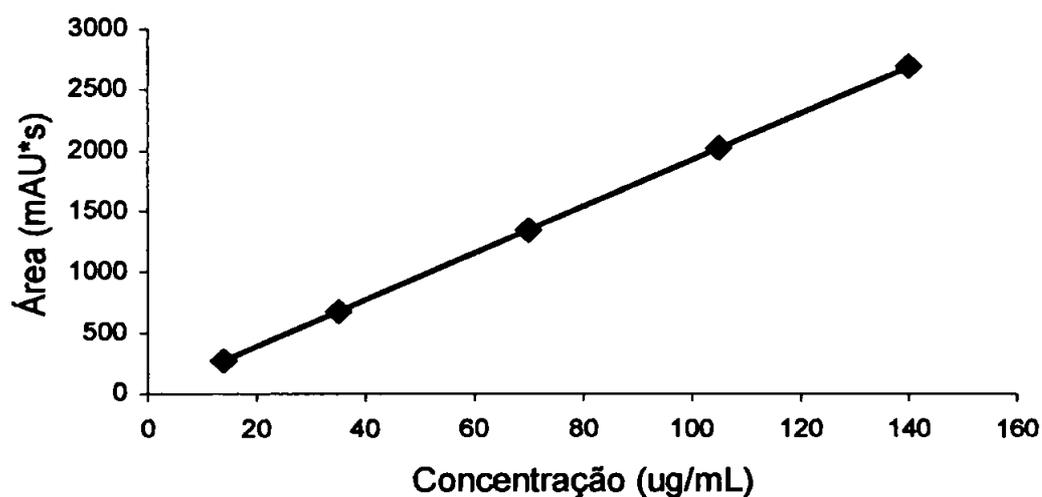
#### **7.2.1.2.1- Construção da Curva de Calibração**

##### **A- Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico**

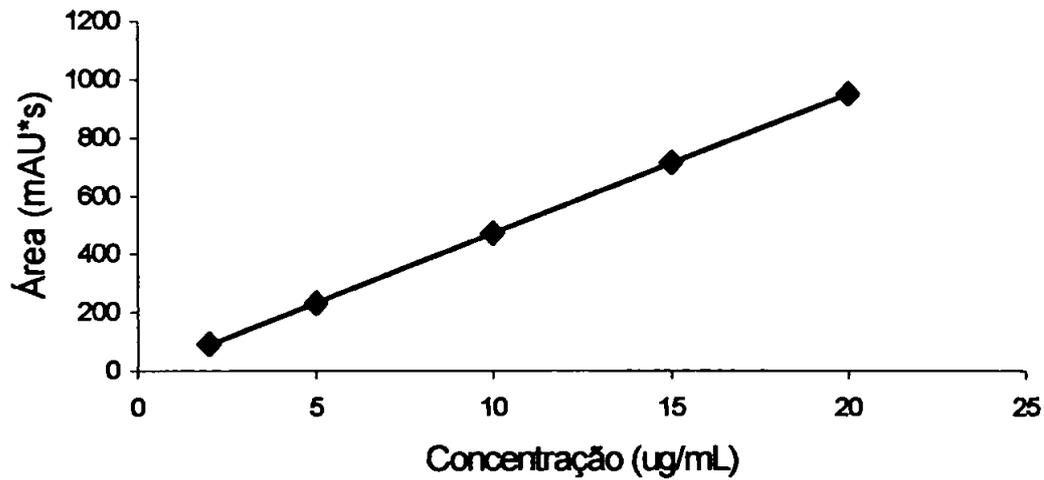
A Figura 17 representa a curva de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração são descritos no Quadro 9.

##### **B- Benzofenona-4**

A Figura 18 representa a curva de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração são descritos no Quadro 10.



**Figura 17.** Curva de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico em tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min. Concentração variando de 14,0 a 140,0 $\mu$ g/mL.



**Figura 18.** Curva de calibração da benzofenona-4 em tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D). Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min. Concentração variando de 2,0 a 20,0 $\mu$ g/mL.

**Quadro 9.** Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico

| Concentração (C)<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Area <sup>m</sup><br>(mAU*s) |
|--|------------------------------|
| 14,0                                     | 268,82950                    |
| 35,0                                     | 673,98228                    |
| 70,0                                     | 1344,08565                   |
| 105,0                                    | 2023,22180                   |
| 140,0                                    | 2702,04728                   |

<sup>m</sup> média de três leituras para cada concentração

**Quadro 10.** Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para benzofenona-4

| Concentração (C)<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Area <sup>m</sup><br>(mAU*s) |
|--|------------------------------|
| 2,0                                      | 90,96736                     |
| 5,0                                      | 233,30312                    |
| 10,0                                     | 472,66700                    |
| 15,0                                     | 714,65372                    |
| 20,0                                     | 954,84625                    |

<sup>m</sup> média de três leituras para cada concentração

Os valores estatísticos obtidos para as curvas de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 estão resumidos nos Quadros 11 e 12, respectivamente.

**Quadro 11.** Valores estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Método cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min.

| Parâmetros Estatísticos    | Resultados |
|----------------------------|------------|
| Intercepto                 | -2,98952   |
| Inclinação                 | 19,30526   |
| Coefficiente de correlação | 1,00000    |

**Quadro 12.** Valores estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração de benzofenona-4. Método cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min.

| Parâmetros Estatísticos    | Resultados |
|----------------------------|------------|
| Intercepto                 | -6,26869   |
| Inclinação                 | 48,03425   |
| Coefficiente de correlação | 1,00000    |

### 7.2.1.2.2- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

#### A- Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico

O Quadro 13 apresenta os resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico.

#### B- Benzofenona-4

O Quadro 14 representa os resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de benzofenona-4.

**Quadro 13.** Resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Método cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min.

| Número        | Área<br>(2,0µg/mL) | Área<br>(4,0µg/mL) | Área<br>(6,0µg/mL) | Área<br>(8,0µg/mL) | Área<br>(10,0µg/mL) |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 1             | 39,01239           | 76,19273           | 114,48711          | 153,06732          | 192,21311           |
| 2             | 38,47262           | 76,88810           | 114,81721          | 153,57136          | 192,41237           |
| 3             | 38,00711           | 77,62952           | 115,27110          | 153,77107          | 192,32713           |
| 4             | 37,82987           | 76,88817           | 115,87923          | 154,92713          | 192,52162           |
| 5             | 39,05179           | 76,95710           | 115,33081          | 153,01173          | 192,02637           |
| Valor médio   | 38,47476           | 76,91112           | 115,15709          | 153,66972          | 192,30012           |
| Desvio padrão | 0,56049            | 0,50876            | 0,53128            | 0,77409            | 0,19033             |

Desvio padrão médio = 0,51299

Inclinação da curva de calibração = 19,22047

Limite de detecção = 0,08µg/mL

Limite de quantificação = 0,27µg/mL

**Quadro 14.** Resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de benzofenona-4. Método cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min.

| Número        | Área<br>(2,0µg/mL) | Área<br>(4,0µg/mL) | Área<br>(6,0µg/mL) | Área<br>(8,0µg/mL) | Área<br>(10,0µg/mL) |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 1             | 90,12645           | 182,71982          | 274,71848          | 369,17444          | 465,21343           |
| 2             | 89,87962           | 182,35163          | 275,99173          | 367,99871          | 466,57128           |
| 3             | 91,00317           | 185,21076          | 277,57122          | 368,29786          | 466,17829           |
| 4             | 92,33415           | 183,07142          | 276,72113          | 368,91732          | 465,11742           |
| 5             | 91,57210           | 183,74318          | 275,95762          | 369,65172          | 464,54217           |
| Valor médio   | 90,98310           | 183,41936          | 276,19204          | 368,80801          | 465,52452           |
| Desvio padrão | 1,01540            | 1,12522            | 1,05458            | 0,66582            | 0,82925             |

Desvio padrão médio = 0,93805

Inclinação da curva de calibração = 46,72357

Limite de detecção = 0,06µg/mL

Limite de quantificação = 0,20µg/mL

### **7.2.1.2.3- Aplicação do Método Padronizado às Amostras Comerciais e Simuladas**

#### **7.2.1.2.3.1- Pesquisa de Interferentes**

A **Figura 19** mostra o cromatograma referente à solução dos padrões de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4.

A **Figura 20** mostra o cromatograma referente ao placebo da amostra comercial.

A **Figura 21** apresenta o cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 22** mostra o cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) controle, mantido a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 23** mostra o cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) controle, mantido a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 24** apresenta o cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) exposta a luz, por 7 dias.

A **Figura 25** mostra o cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) exposto a luz, por 7 dias.

A **Figura 26** mostra o cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) exposto a luz, por 7 dias.

A **Figura 27** mostra o cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida ao calor, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 28** mostra o cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido ao calor, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 29** mostra o cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido ao calor, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 30** apresenta o cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida a oxidação, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 31** apresenta o cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido a oxidação, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 32** mostra o cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido a oxidação, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 33** apresenta o cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com ácido, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

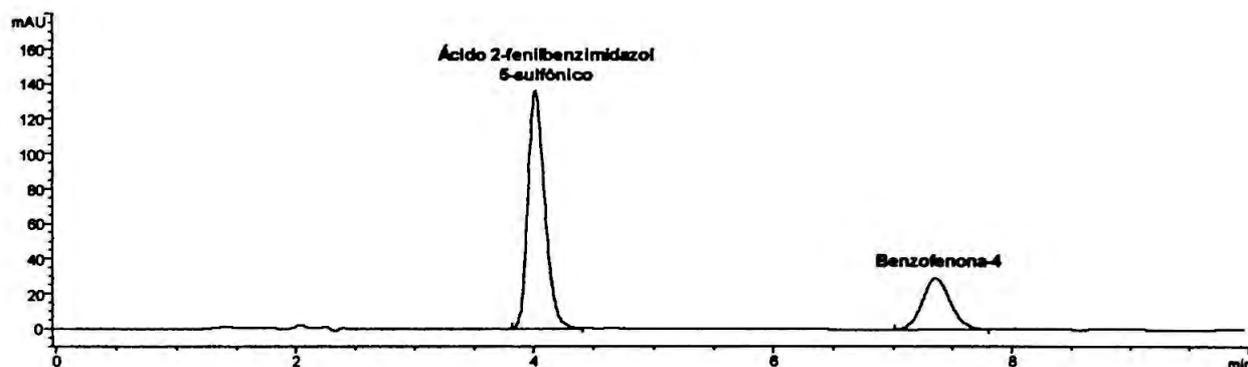
A **Figura 34** apresenta o cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com ácido, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 35** mostra o cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com ácido, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 36** apresenta o cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com base, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

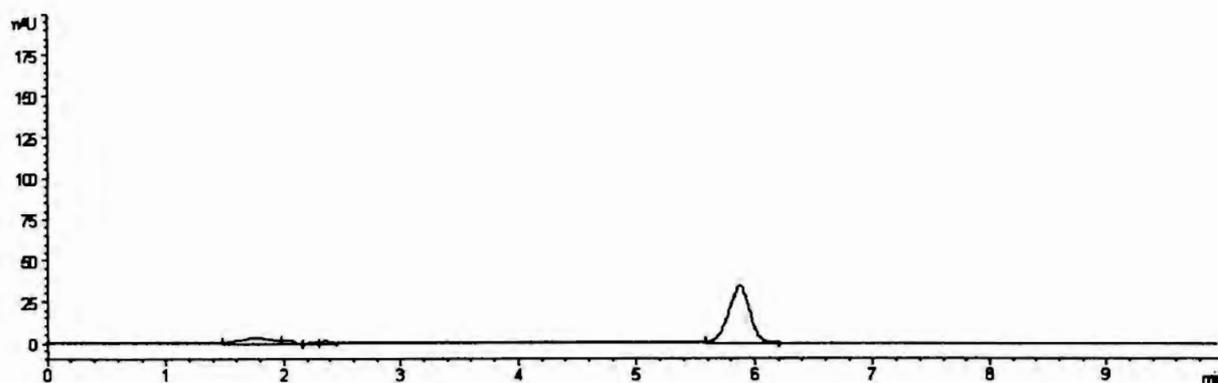
A **Figura 37** apresenta o cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com base, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 38** mostra o cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com base, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.



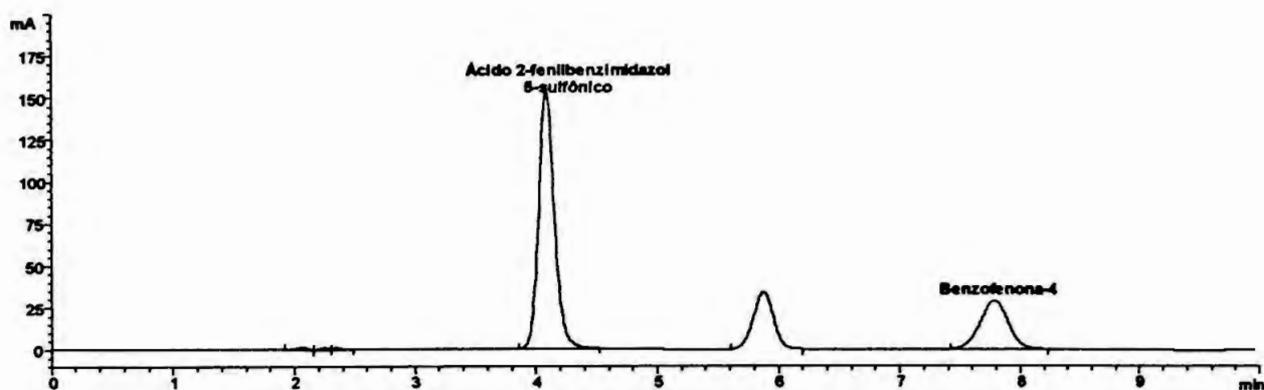
**Figura 19.** Cromatograma referente à solução dos padrões de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L. Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.



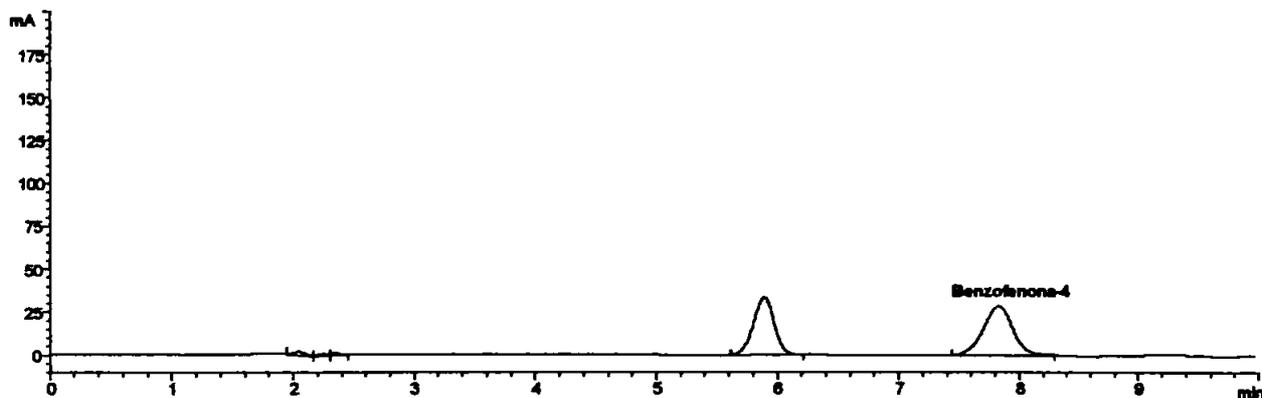
**Figura 20.** Cromatograma referente ao placebo da amostra comercial.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L.



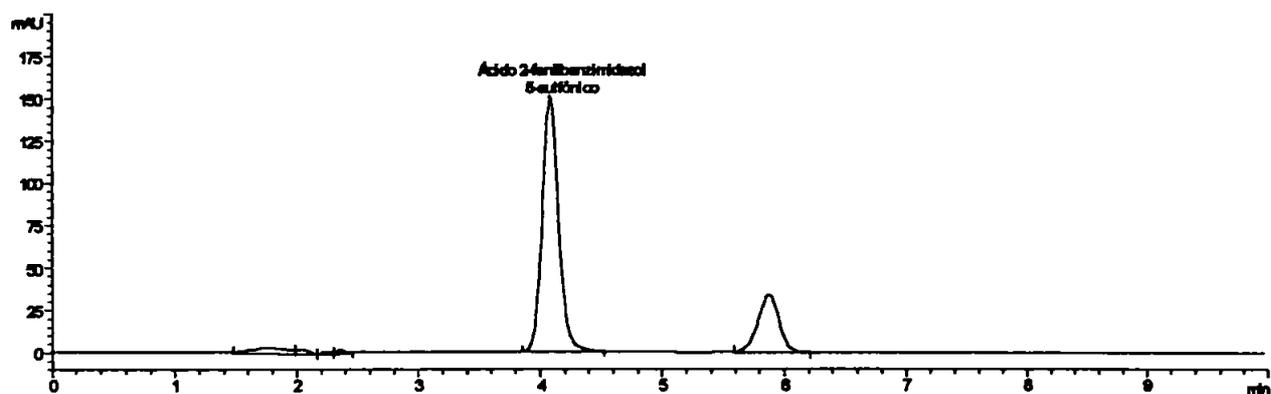
**Figura 21.** Cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL.



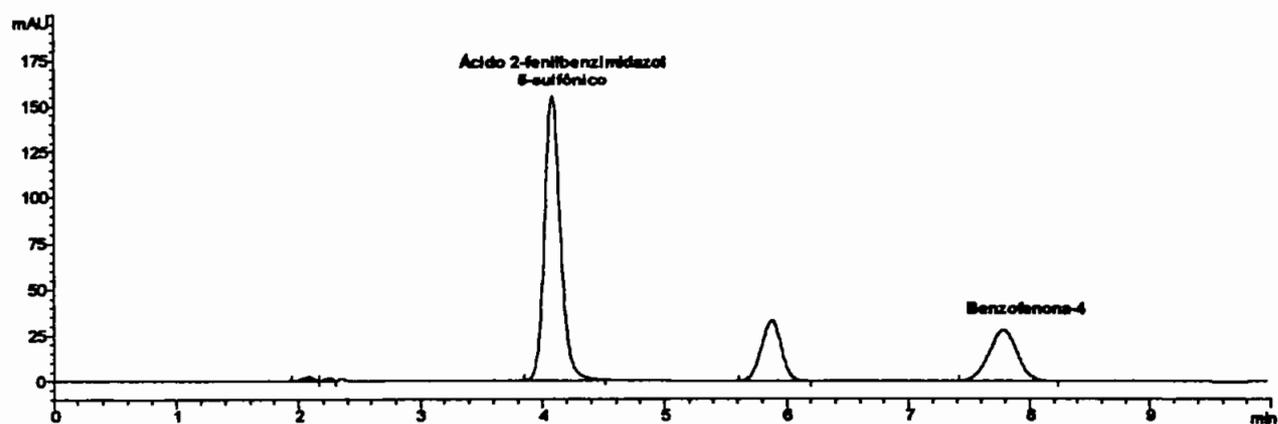
**Figura 22.** Cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



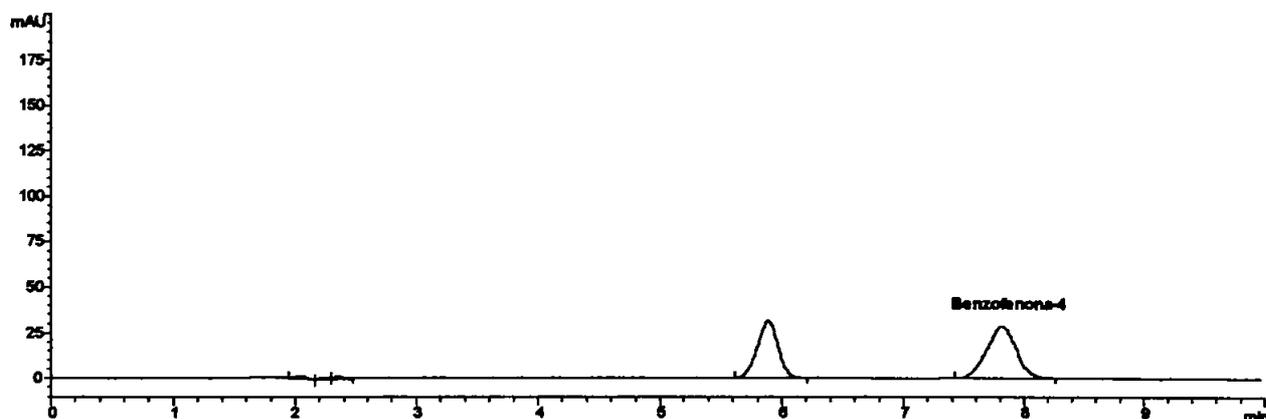
**Figura 23.** Cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



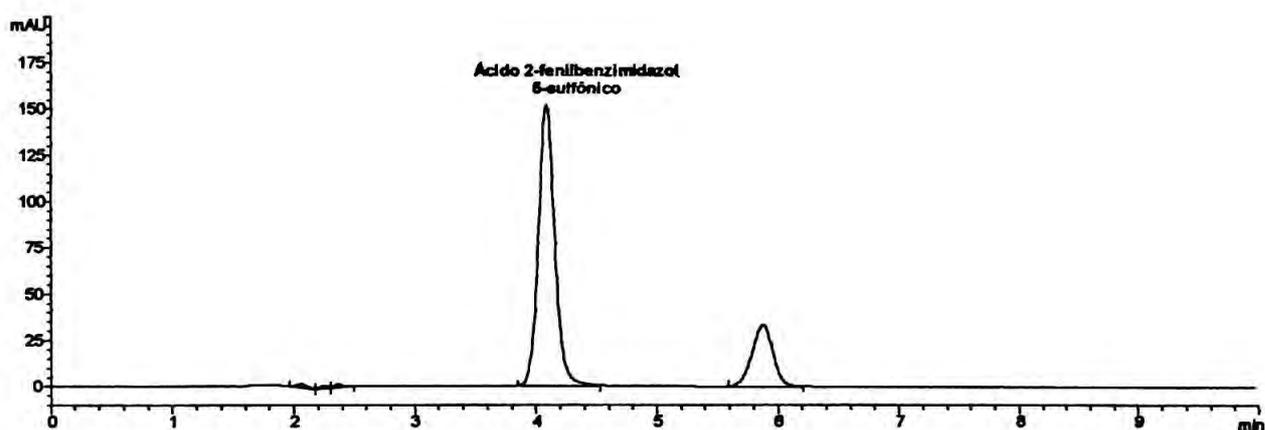
**Figura 24.** Cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) exposta a luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L



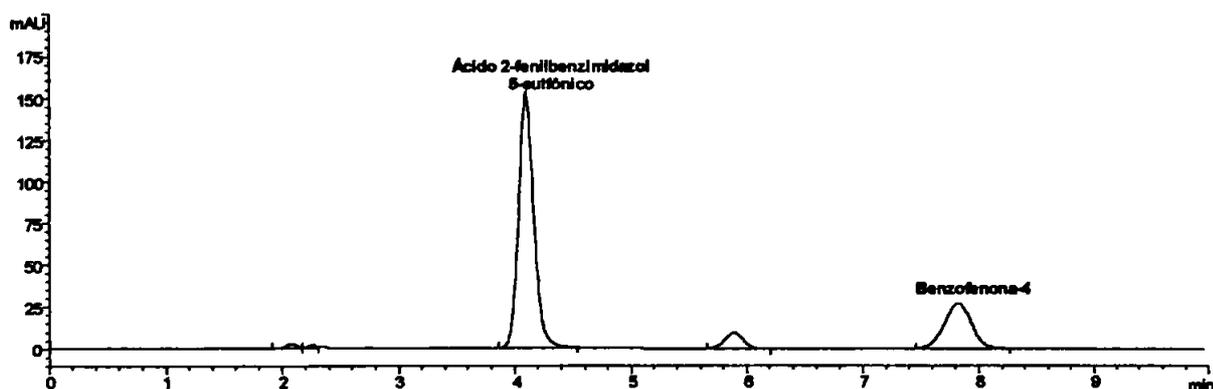
**Figura 25.** Cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) exposto a luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L



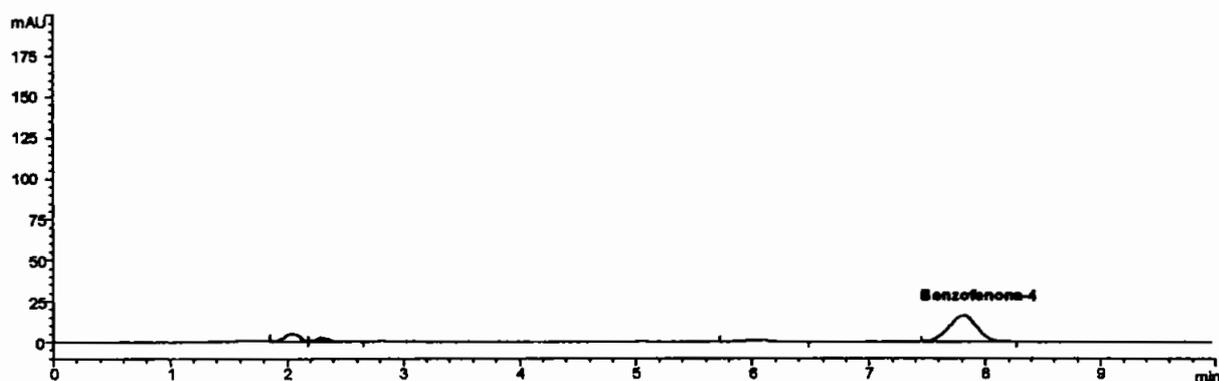
**Figura 26.** Cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) exposto a luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10 $\mu$ L



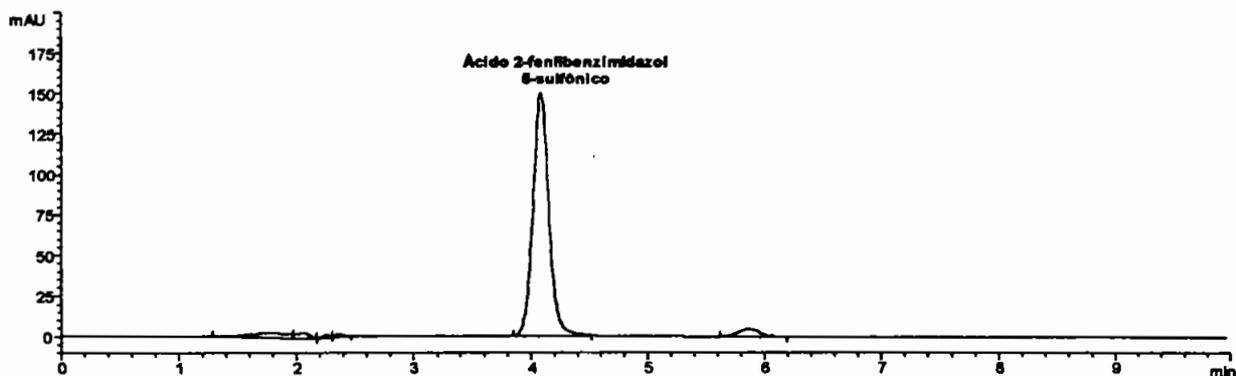
**Figura 27.** Cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida ao calor, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



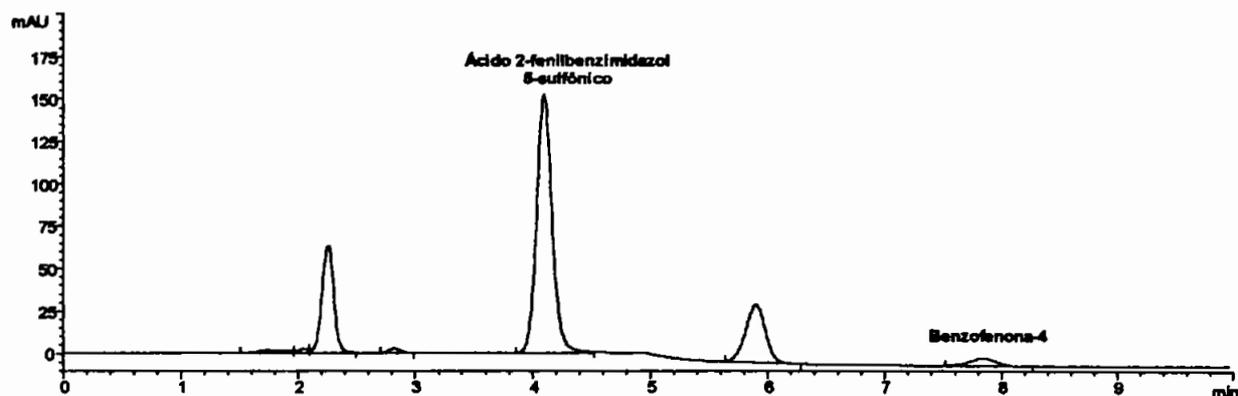
**Figura 28.** Cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido ao calor, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



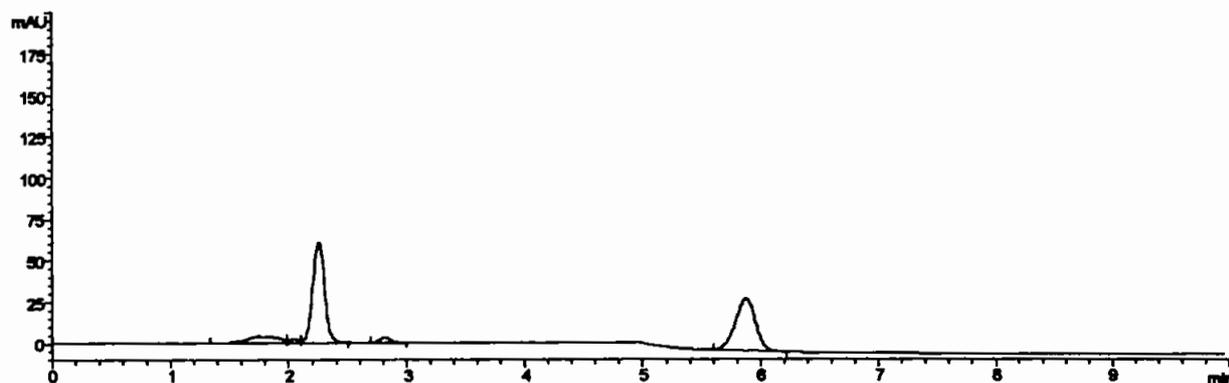
**Figura 29.** Cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido ao calor, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



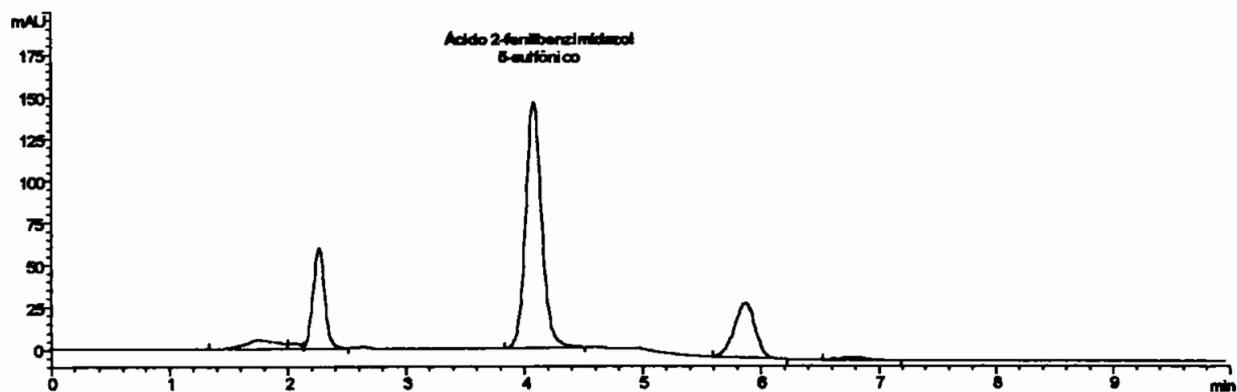
**Figura 30.** Cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida a oxidação, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



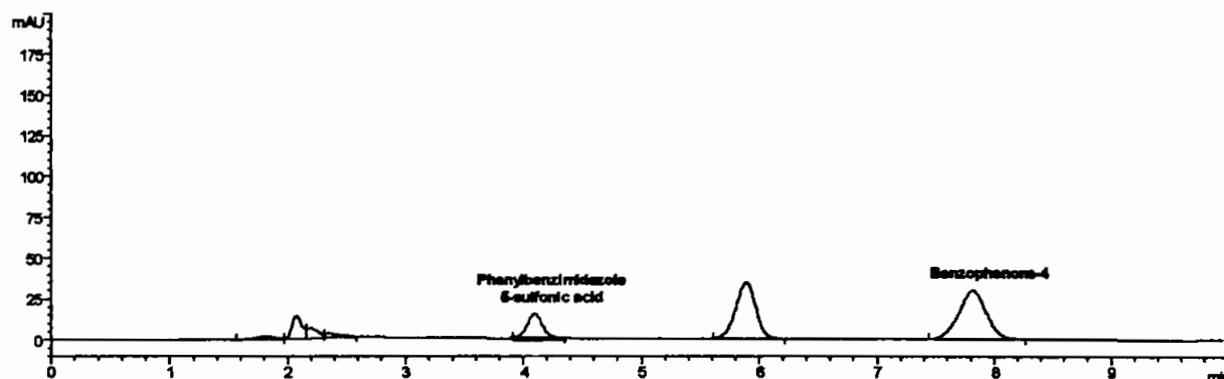
**Figura 31.** Cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido a oxidação, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



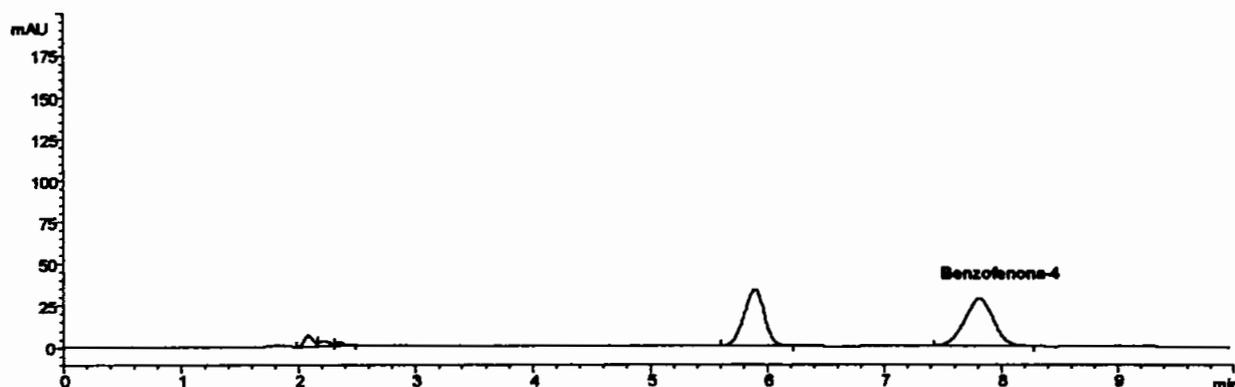
**Figura 32.** Cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido a oxidação, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



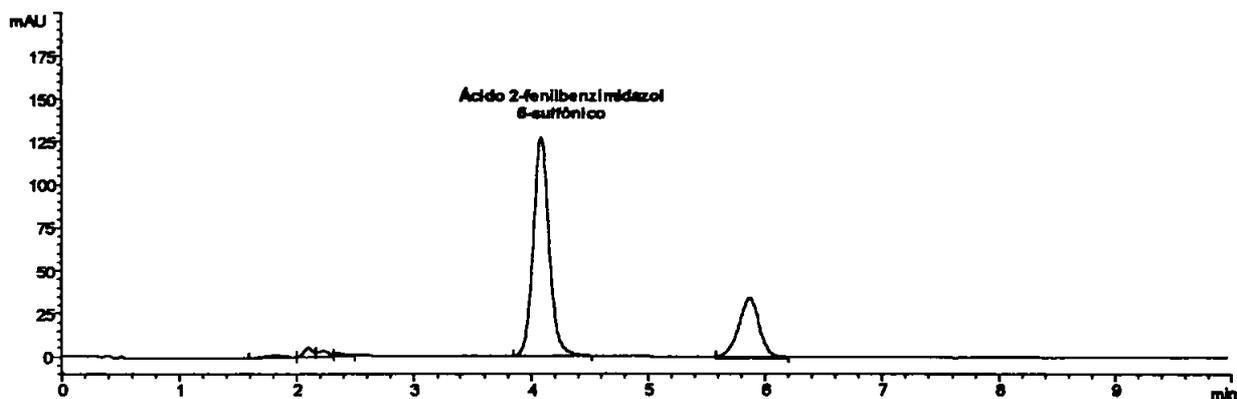
**Figura 33.** Cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com ácido, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



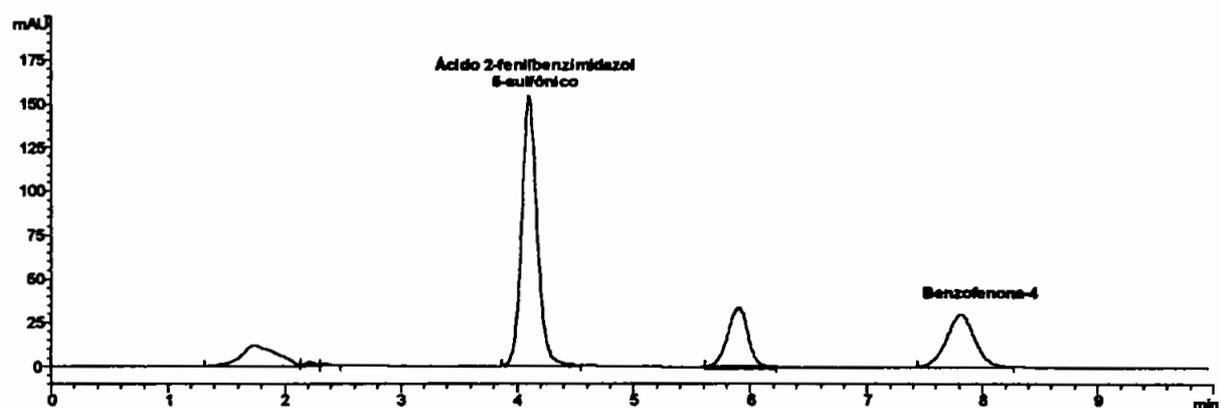
**Figura 34.** Cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com ácido, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



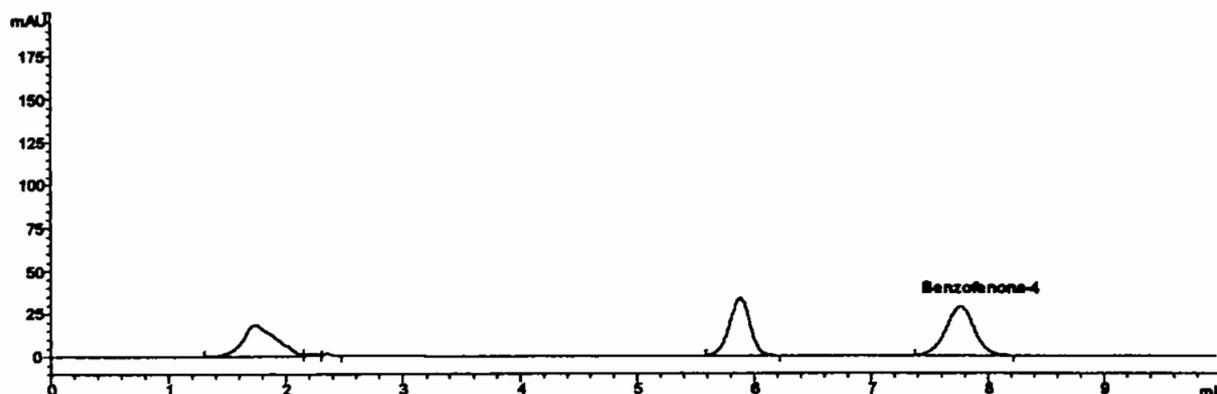
**Figura 35.** Cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com ácido, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



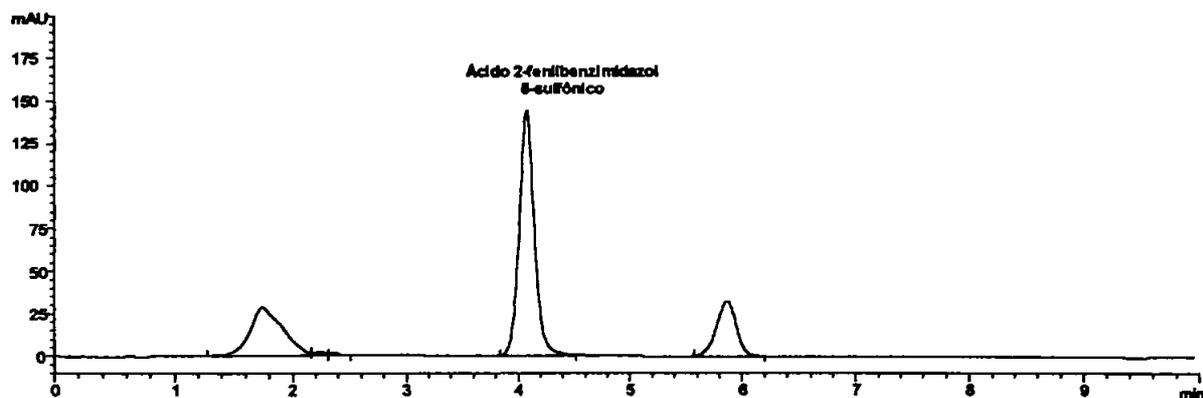
**Figura 36.** Cromatograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com base, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



**Figura 37.** Cromatograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com base, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL



**Figura 38.** Cromatograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com base, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Fase móvel: Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil<sup>®</sup> LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL

### **7.2.1.2.3.2- Determinação do Teor de Cada Filtro Solar nas Amostras Comerciais e Simuladas**

A **Tabela 1** apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4).

A **Tabela 2** mostra resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4) estudadas para o ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A **Tabela 3** apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de benzofenona-4 nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5).

A **Tabela 4** mostra resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5) estudadas para a benzofenona-4 pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

**Tabela 1.** Resultados obtidos na determinação do teor de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4) pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

| Amostra | Valor teórico<br>(%) | Valor encontrado * | Teor percentual<br>(%) |
|---------|----------------------|--------------------|------------------------|
| 1       | 7,000                | 7,042              | 100,60                 |
| 4       | 7,000                | 7,005              | 100,07                 |

\* Média de 6 determinações

**Tabela 2.** Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4) estudadas para o ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

| Amostra | Desvio padrão<br>Relativo | Intervalo de confiança da<br>média |
|---------|---------------------------|------------------------------------|
| 1       | 0,19                      | 100,60 ± 0,20                      |
| 4       | 0,12                      | 100,07 ± 0,13                      |

**Tabela 3.** Resultados obtidos na determinação do teor de benzofenona-4 nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5) pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

| Amostra | Valor teórico (%) | Valor encontrado * | Teor percentual (%) |
|---------|-------------------|--------------------|---------------------|
| 1       | 1,000             | 1,003              | 100,30              |
| 5       | 1,000             | 1,002              | 100,20              |

\* Média de 6 determinações

**Tabela 4.** Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5) estudadas para a benzofenona-4 pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

| Amostra | Desvio padrão relativo | Intervalo de confiança da média |
|---------|------------------------|---------------------------------|
| 1       | 0,52                   | 100,30 ± 0,54                   |
| 5       | 0,41                   | 100,20 ± 0,43                   |

### 7.2.1.2.3.3- Teste de Recuperação

As tabelas 5 e 6 apresentam os resultados dos testes de recuperação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, respectivamente.

**Tabela 5.** Resultados obtidos do teste de recuperação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

| % recuperação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico |   |  |  |
|--|---|--|--|
| Tomadas de Ensaio                                      | 50% do valor nominal<br>equivalente a 35,0µg/mL de<br>ácido 2-fenilbenzimidazol 5-<br>sulfônico | 100% do valor nominal<br>equivalente a 70,0µg/mL de<br>ácido 2-fenilbenzimidazol 5-<br>sulfônico | 150% do valor nominal<br>equivalente a 105,0µg/mL<br>de ácido 2-fenilbenzimidazol<br>5-sulfônico |
| 1  | 99  | 101  | 100  |
| 2  | 100   | 100  | 100  |
| 3  | 100   | 100  | 100  |
| 4  | 100   | 100  | 100  |
| 5  | 100   | 101  | 99   |
| 6  | 100   | 101  | 100  |
| Média  | 100   | 101  | 100  |
| DPR %  | 0,41  | 0,54   | 0,41   |

DPR = Desvio Padrão Relativo

**Tabela 6.** Resultados obtidos do teste de recuperação de benzofenona-4 pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

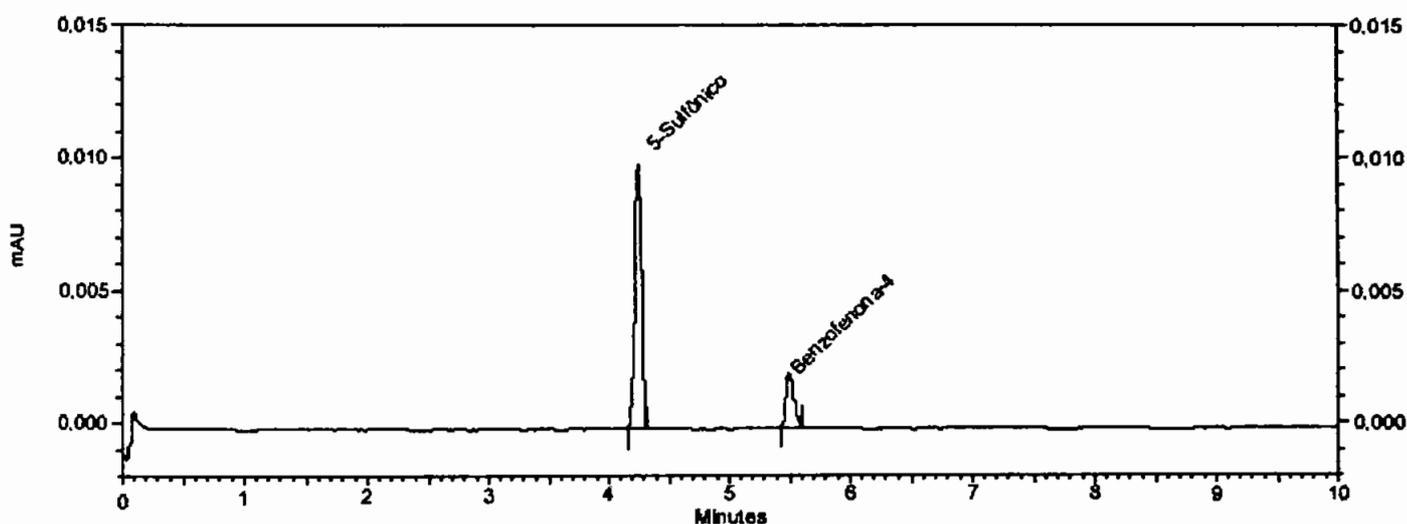
| Tomadas de<br>Ensaio | % recuperação de benzofenona-4                                     |  |  |
|----------------------|--|--|--|
|                      | 50% do valor nominal<br>equivalente a 5,0µg/mL de<br>benzofenona-4 | 100% do valor nominal<br>equivalente a 10,0µg/mL<br>de benzofenona-4 | 150% do valor nominal<br>equivalente a 15,0µg/mL<br>de benzofenona-4 |
| 1                    | 99   | 100  | 98   |
| 2                    | 99   | 100  | 99   |
| 3                    | 97   | 100  | 100  |
| 4                    | 99   | 99   | 99   |
| 5                    | 98   | 100  | 98   |
| 6                    | 99   | 100  | 99   |
| Média                | 99   | 100  | 99   |
| DPR %                | 0,85   | 0,41   | 0,76   |

DPR = Desvio Padrão Relativo

## 7.2.2- Eletroforese Capilar

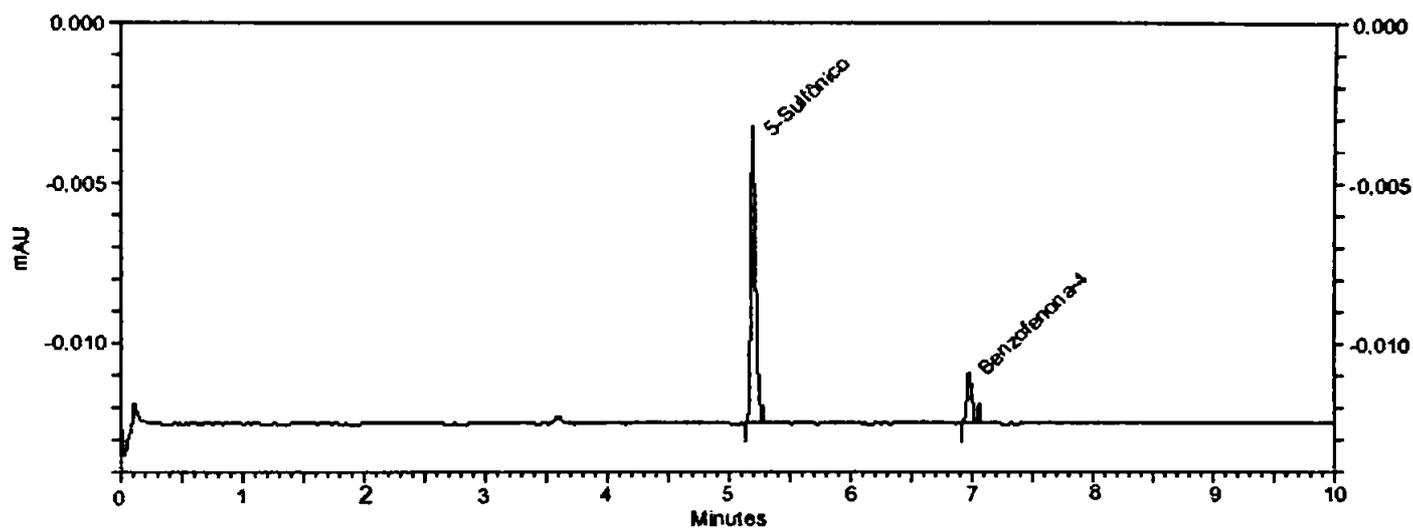
### 7.2.2.1- Estudos Preliminares

As Figuras 39, 40 e 41 são resultados da aplicação dos sistemas 1, 2 e 3 empregando capilar de sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i.; detecção a 217nm e temperatura: 24 a 30°C.



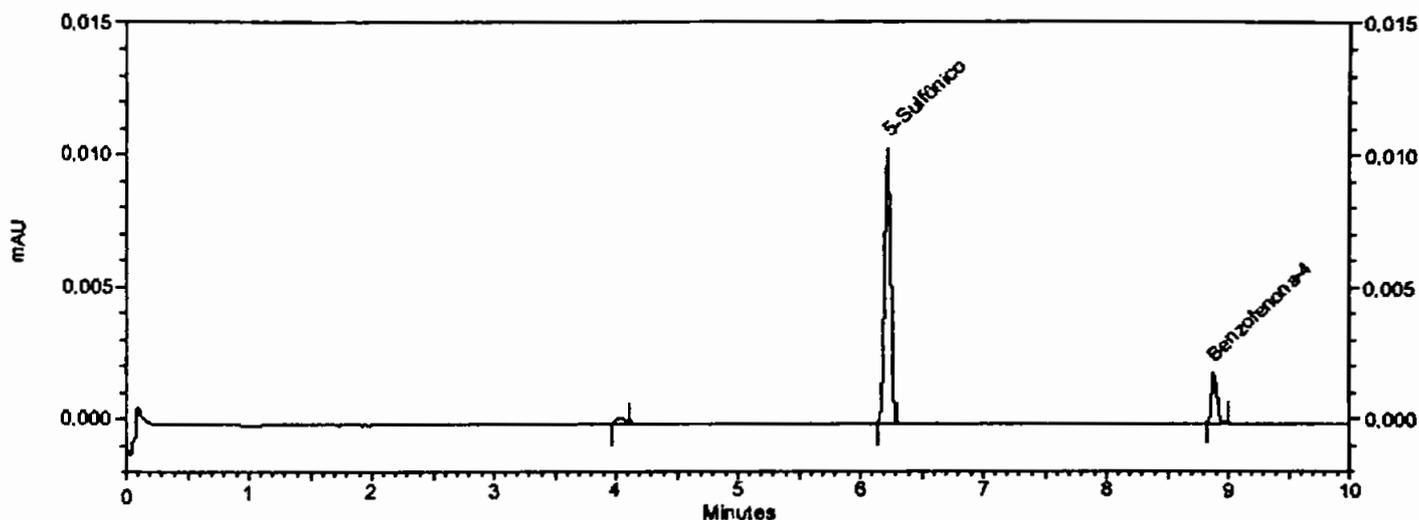
**Figura 39.** Eletroferograma referente ao sistema 1.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 5mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-A). Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; Temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar em 0,20min (hidrodinâmica). Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.



**Figura 40.** Eletroferograma referente ao sistema 2.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B). Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; Temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar em 0,20min (hidrodinâmica). Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.



**Figura 41.** Eletroferograma referente ao sistema 3.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 20mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-C). Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; Temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar em 0,20min (hidrodinâmica). Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

## **7.2.2.2- Validação da Metodologia Analítica Seleccionada**

### **PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR**

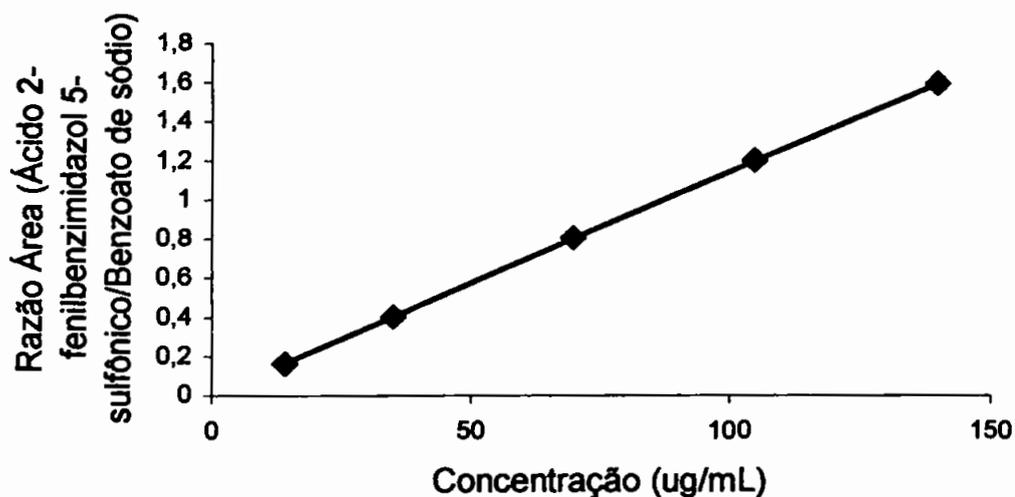
#### **7.2.2.2.1- Construção da Curva de Calibração**

##### **A- Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico**

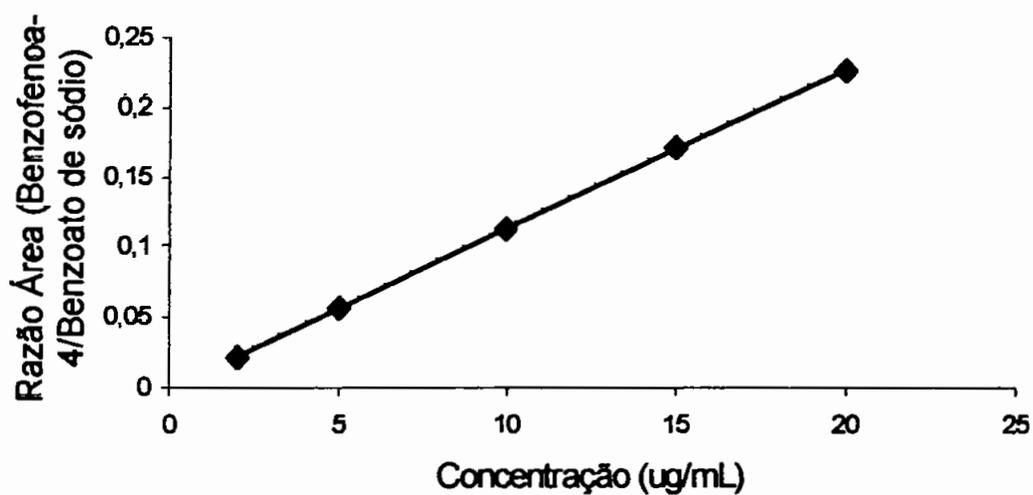
A **Figura 42** representa a curva de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração são descritos no **Quadro 15**.

##### **B- Benzofenona-4**

A **Figura 43** representa a curva de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração são descritos no **Quadro 16**.



**Figura 42.** Curva de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico em Tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Detecção: 217nm. Concentração variando de 14,0 a 140,0 $\mu$ g/mL.



**Figura 43.** Curva de calibração da benzofenona-4 em Tampão borato 10mM (preparado conforme item 5.1-B). Detecção: 217nm. Concentração variando de 2,0 a 20,0 $\mu$ g/mL.

**Quadro 15.** Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método de eletroforese capilar para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico

| Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Razão Área <sup>m</sup><br>(A/A)* |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 14,0                                 | 0,163121                          |
| 35,0                                 | 0,404085                          |
| 70,0                                 | 0,80355                           |
| 105,0                                | 1,20115                           |
| 140,0                                | 1,59485                           |

<sup>m</sup> média de três leituras para cada concentração

\* Razão das área dos picos (ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/benzoato de sódio)

**Quadro 16.** Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método de eletroforese capilar para benzofenona-4

| Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Razão Área <sup>m</sup><br>(A/A)** |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| 2,0                                  | 0,0216088                          |
| 5,0                                  | 0,0567729                          |
| 10,0                                 | 0,113157                           |
| 15,0                                 | 0,17165                            |
| 20,0                                 | 0,227614                           |

<sup>m</sup> média de três leituras para cada concentração

\*\* Razão das área dos picos (benzofenona-4/benzoato de sódio)

Os valores estatísticos obtidos para as curvas de calibração do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 pelo método de eletroforese capilar estão resumidos nos Quadros 17 e 18, respectivamente.

**Quadro 17.** Valores estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Método eletroforese capilar. Detecção: 217nm.

| Parâmetros Estatísticos    | Resultados |
|----------------------------|------------|
| Intercepto                 | 0,00593    |
| Inclinação                 | 0,01137    |
| Coefficiente de correlação | 0,99999    |

**Quadro 18.** Valores estatísticos obtidos na determinação da curva de calibração de benzofenona-4. Método eletroforese capilar. Detecção: 217nm.

| Parâmetros Estatísticos    | Resultados |
|----------------------------|------------|
| Intercepto                 | -0,00093   |
| Inclinação                 | 0,01145    |
| Coefficiente de correlação | 0,99997    |

## 7.2.2.2.2- Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

### A- Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico

O Quadro 19 apresenta os resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico.

### B- Benzofenona-4

O Quadro 20 representa os resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de benzofenona-4.

**Quadro 19.** Resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico. Método eletroforese capilar. Detecção: 217nm.

| Número        | Razão Área<br>(2,0µg/mL) | Razão Área<br>(4,0µg/mL) | Razão Área<br>(6,0µg/mL) | Razão Área<br>(8,0µg/mL) | Razão Área<br>(10,0µg/mL) |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1             | 0,0288217                | 0,0441729                | 0,0678252                | 0,0948990                | 0,1165290                 |
| 2             | 0,0233723                | 0,0460999                | 0,0677804                | 0,0942503                | 0,1160764                 |
| 3             | 0,0180120                | 0,0471700                | 0,0699901                | 0,0931128                | 0,1171742                 |
| 4             | 0,0201217                | 0,0488088                | 0,0732190                | 0,0962027                | 0,1183938                 |
| 5             | 0,0245180                | 0,0467908                | 0,0692123                | 0,0940223                | 0,1209763                 |
| Valor médio   | 0,0229691                | 0,0466085                | 0,0696054                | 0,0944974                | 0,1178299                 |
| Desvio padrão | 0,0041682                | 0,0016868                | 0,0022282                | 0,0011482                | 0,0019631                 |

Razão Área = Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico / Benzoato de sódio

Desvio padrão médio = 0,0022389

Inclinação da curva de calibração = 0,011881

Limite de detecção = 0,57µg/mL

Limite de quantificação = 1,88µg/mL

**Quadro 20.** Resultados relativos aos limites de detecção e quantificação de benzofenona-4. Método eletroforese capilar. Detecção: 217nm.

| Número        | Razão Área<br>(2,0µg/mL) | Razão Área<br>(4,0µg/mL) | Razão Área<br>(6,0µg/mL) | Razão Área<br>(8,0µg/mL) | Razão Área<br>(10,0µg/mL) |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1             | 0,0160020                | 0,0431708                | 0,0660172                | 0,0921173                | 0,1117330                 |
| 2             | 0,0200291                | 0,0442132                | 0,0697716                | 0,0890001                | 0,1107066                 |
| 3             | 0,0272091                | 0,0415082                | 0,0673008                | 0,0907120                | 0,1151721                 |
| 4             | 0,0209216                | 0,0448211                | 0,0671256                | 0,0870010                | 0,1128560                 |
| 5             | 0,0215977                | 0,0468700                | 0,0645430                | 0,0873283                | 0,1130902                 |
| Valor médio   | 0,0211519                | 0,0441167                | 0,0669516                | 0,0892317                | 0,1127116                 |
| Desvio padrão | 0,0040225                | 0,0019865                | 0,0019222                | 0,0021892                | 0,0016730                 |

Razão Área = Benzofenona-4 / Benzoato de sódio

Desvio padrão médio = 0,0023587

Inclinação da curva de calibração = 0,011412

Limite de detecção = 0,62µg/mL

Limite de quantificação = 2,07µg/mL

### **7.2.2.2.3- Aplicação do Método Padronizado às Amostras Comerciais e Simuladas**

#### **7.2.2.2.3.1- Pesquisa de Interferentes**

A **Figura 44** mostra o eletroferograma referente à solução dos padrões de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4.

A **Figura 45** mostra o eletroferograma referente ao placebo da amostra comercial.

A **Figura 46** apresenta o eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 47** mostra o eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) controle, mantido a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 48** mostra o eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) controle, mantido a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 49** apresenta o eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) exposta a luz, por 7 dias.

A **Figura 50** mostra o eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) exposto a luz, por 7 dias.

A **Figura 51** mostra o eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) exposto a luz, por 7 dias.

A **Figura 52** mostra o eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida ao calor, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 53** mostra o eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido ao calor, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 54** mostra o eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido ao calor, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 55** apresenta o eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida a oxidação, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 56** apresenta o eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido a oxidação, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 57** mostra o eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido a oxidação, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 58** apresenta o eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com ácido, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

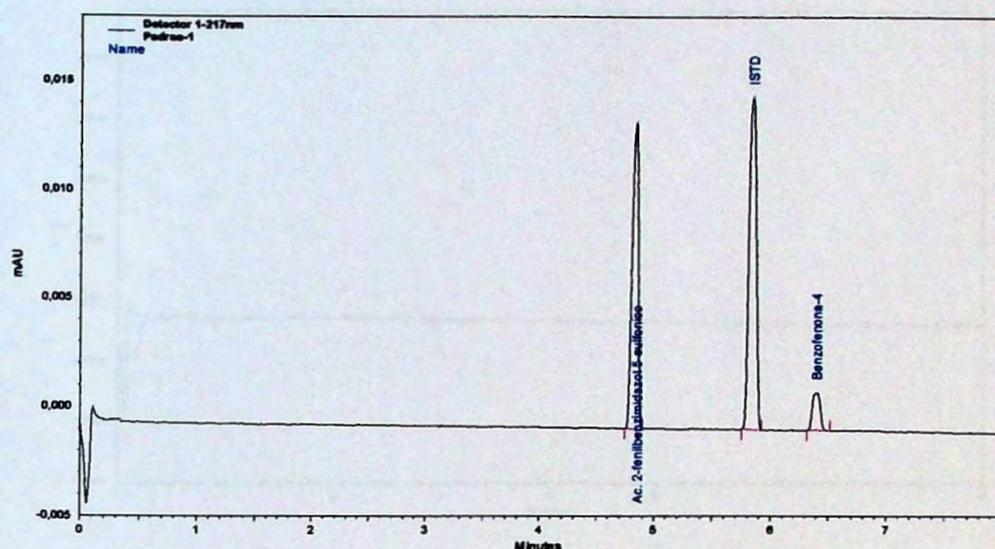
A **Figura 59** apresenta o eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com ácido, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 60** mostra o eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com ácido, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 61** apresenta o eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com base, e mantida a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

A **Figura 62** apresenta o eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com base, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.

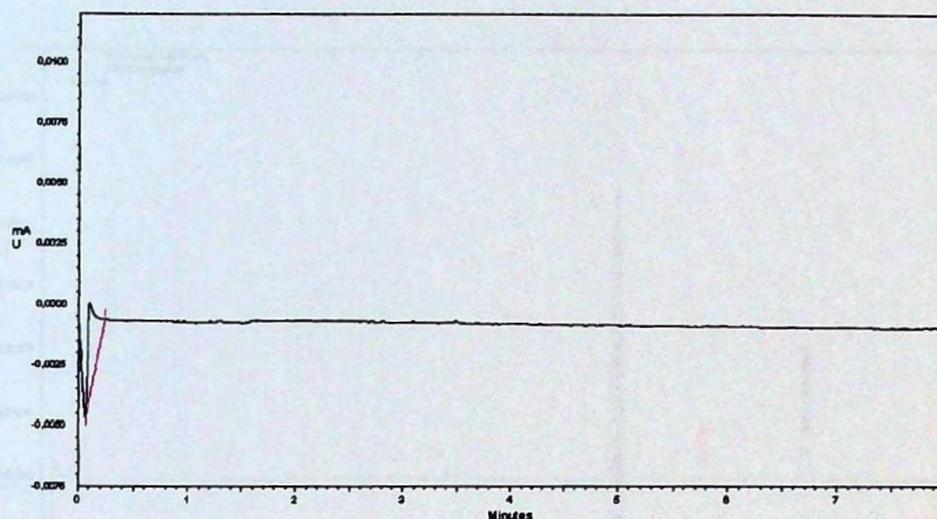
A **Figura 63** mostra o eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com base, e mantido a 25°C ao abrigo da luz, por 7 dias.



**Figura 44.** Eletroferograma referente à solução dos padrões de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4.

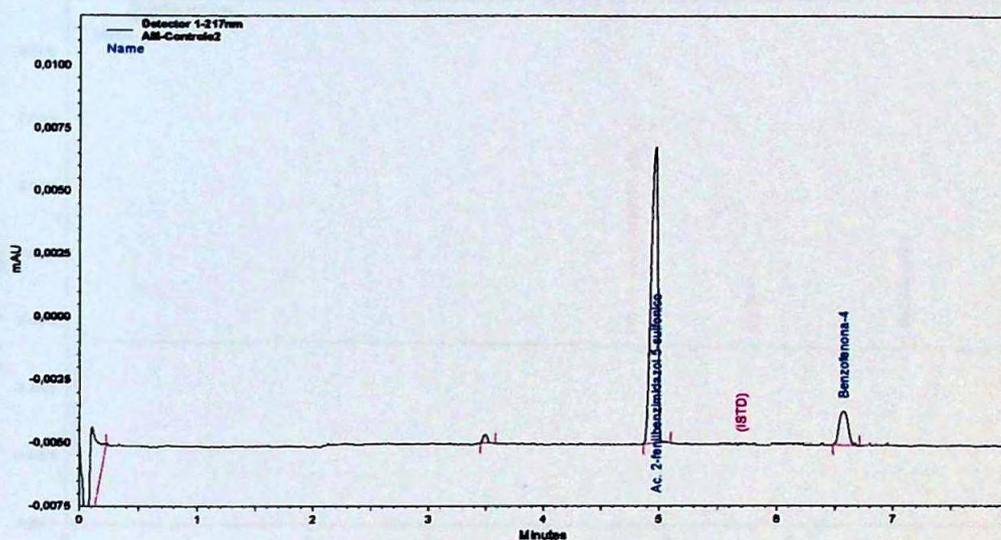
Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV. Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL e 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL.

ISTD = Padrão Interno de Benzoato de Sódio (100,0 $\mu$ g/mL)



**Figura 45.** Eletroferograma referente ao placebo da amostra comercial.

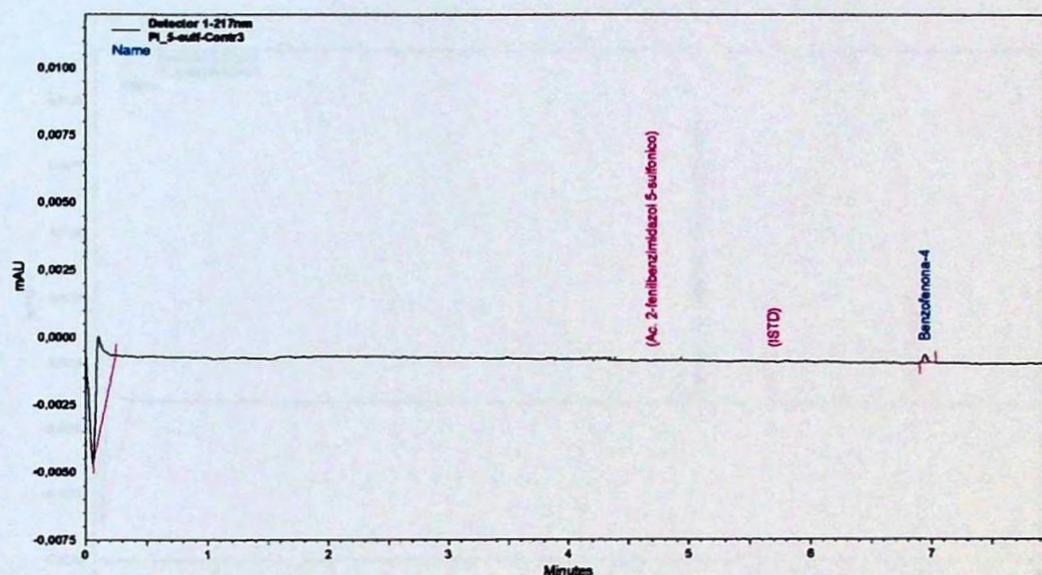
Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.



**Figura 46.** Eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio

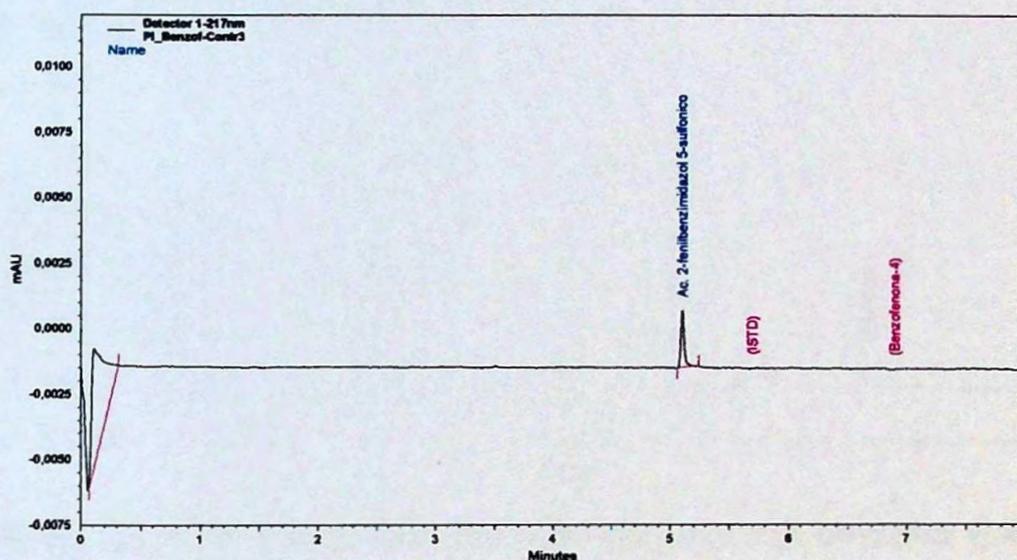


**Figura 47.** Eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio

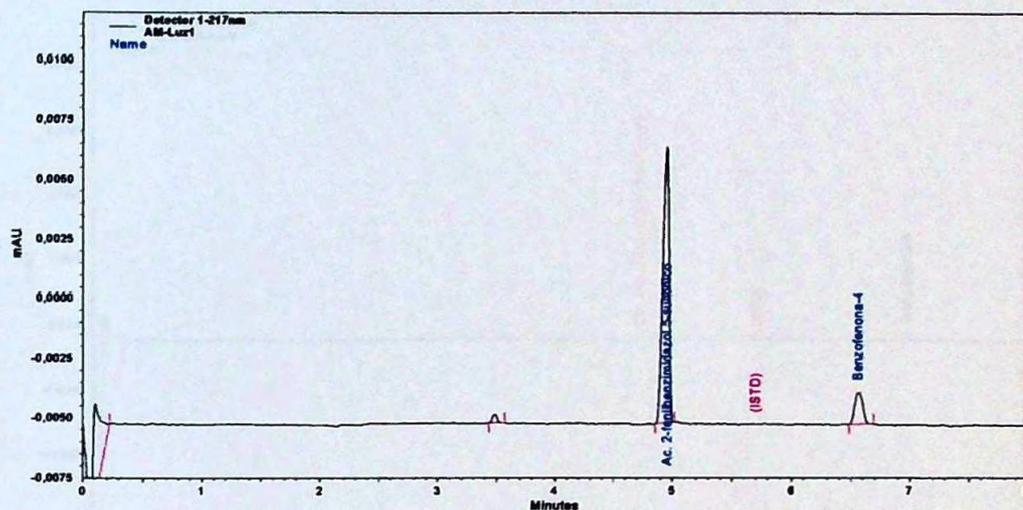
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 48.** Eletroferograma referente ao placebo benzofenona-4 (Amostra 3) controle, mantida a 4°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

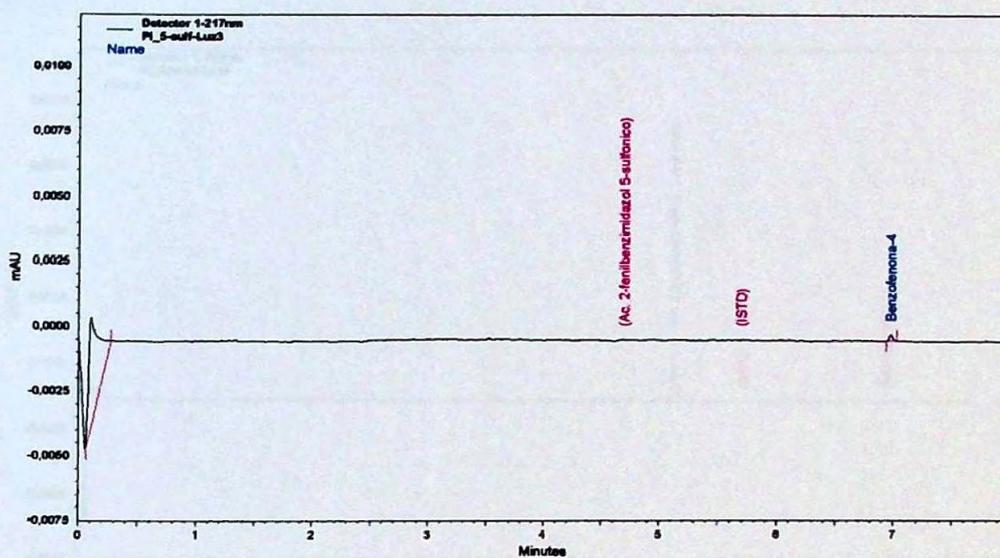
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 49.** Eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) exposta à luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

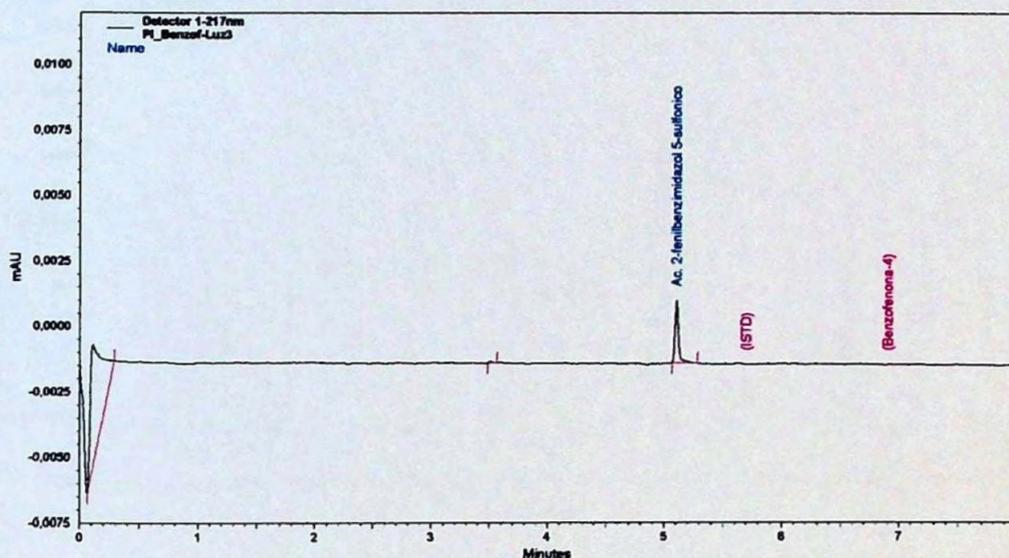
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 50.** Eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) exposto à luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

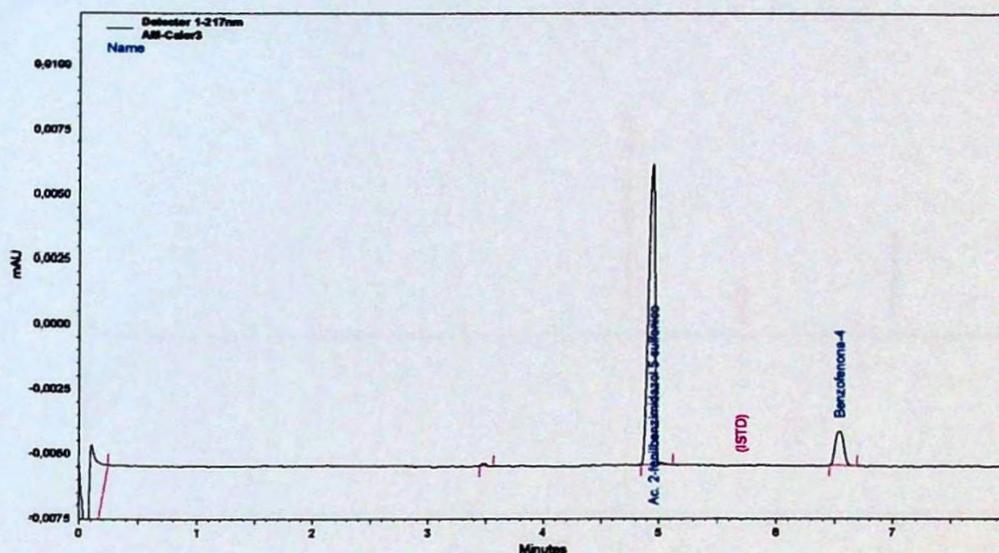
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 51.** Eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) exposto à luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

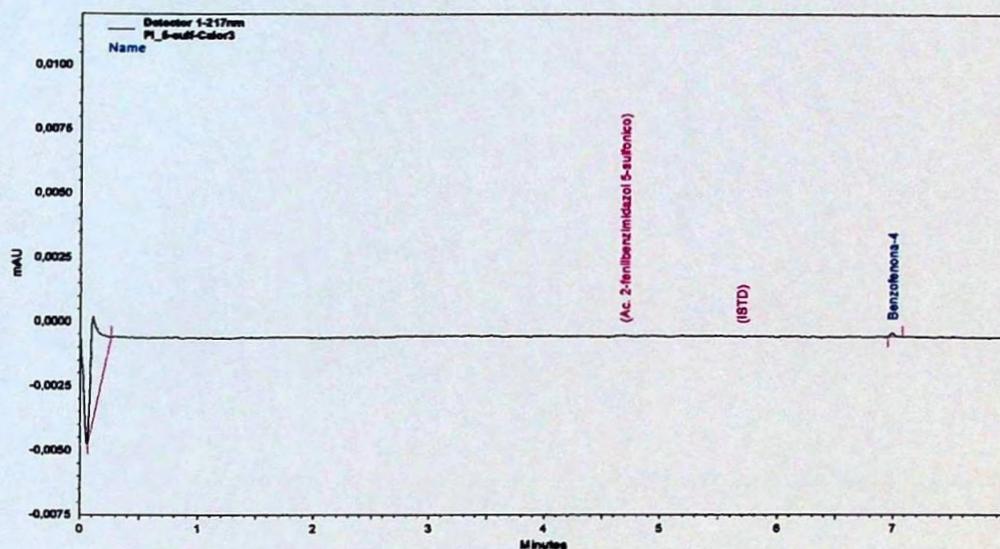
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 52.** Eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida ao calor, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

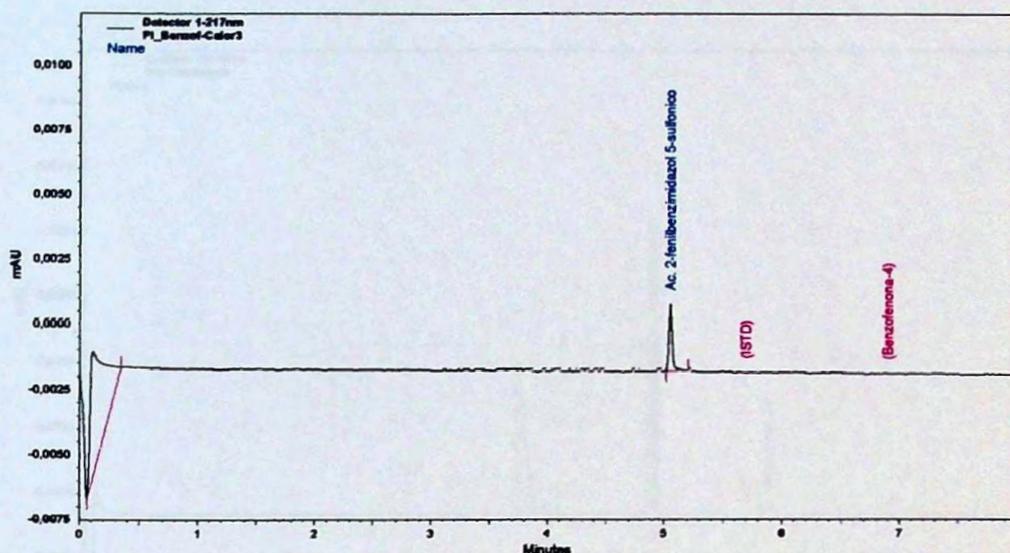
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 53.** Eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido ao calor, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

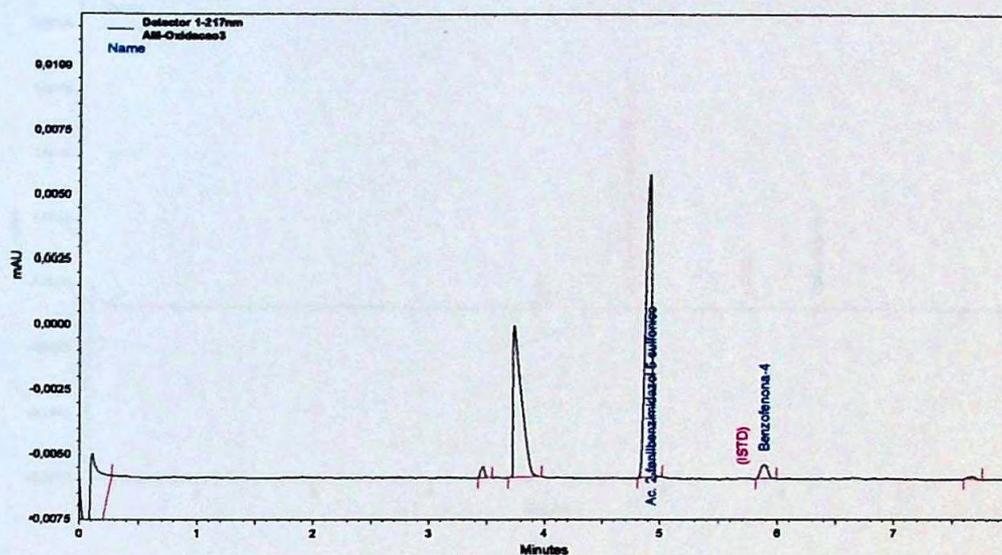
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 54.** Eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido ao calor, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

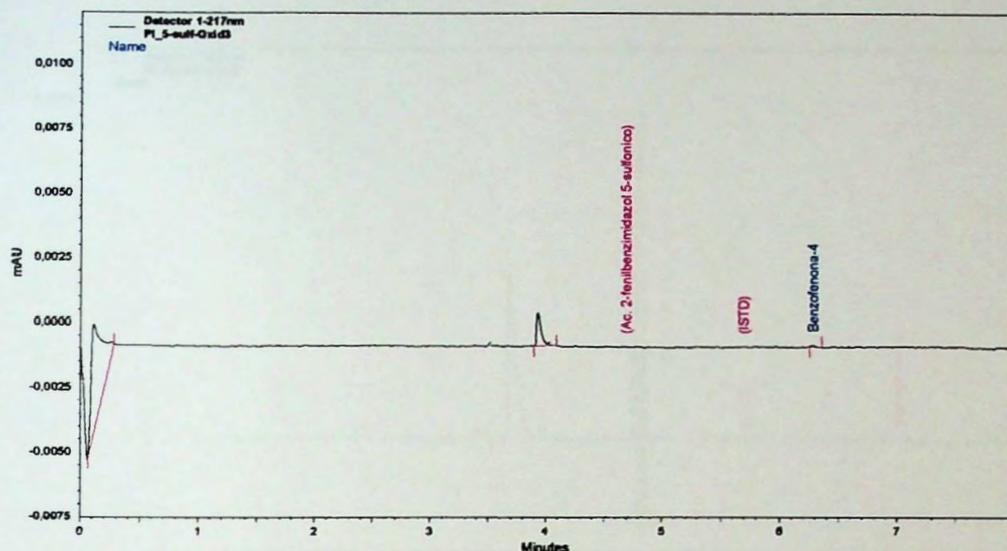
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 55.** Eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) submetida a oxidação, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

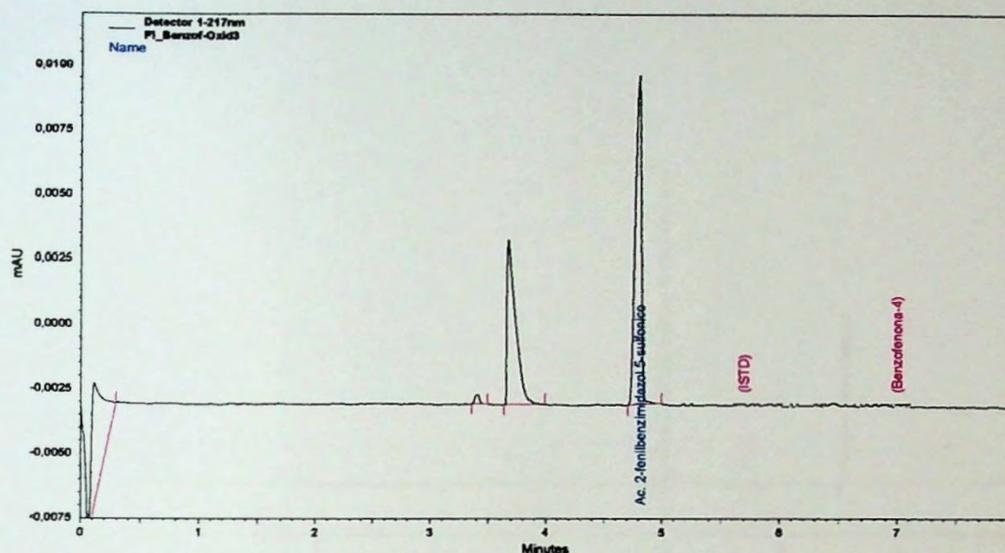
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 56.** Eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) submetido a oxidação, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

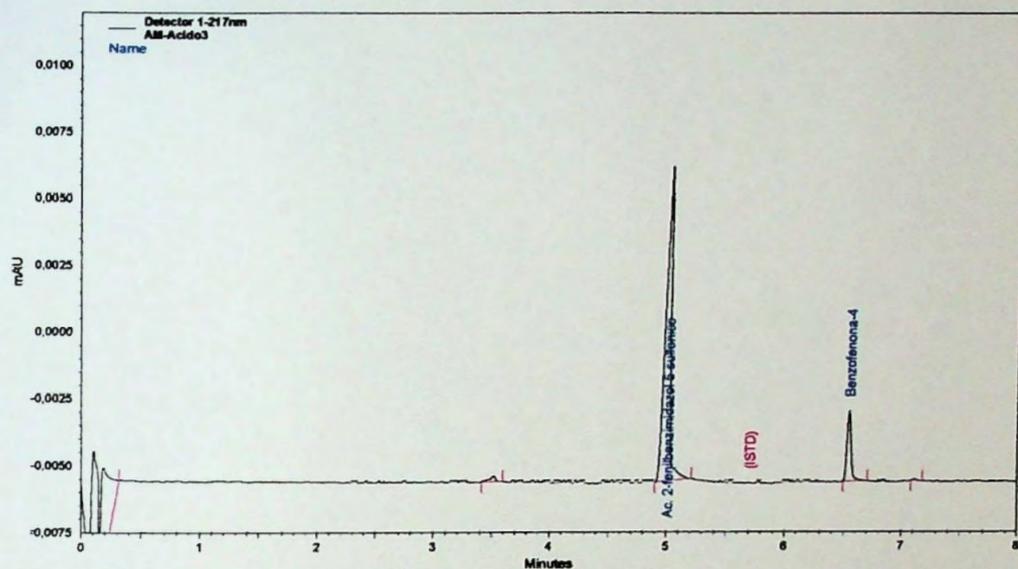
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 57.** Eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) submetido a oxidação, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

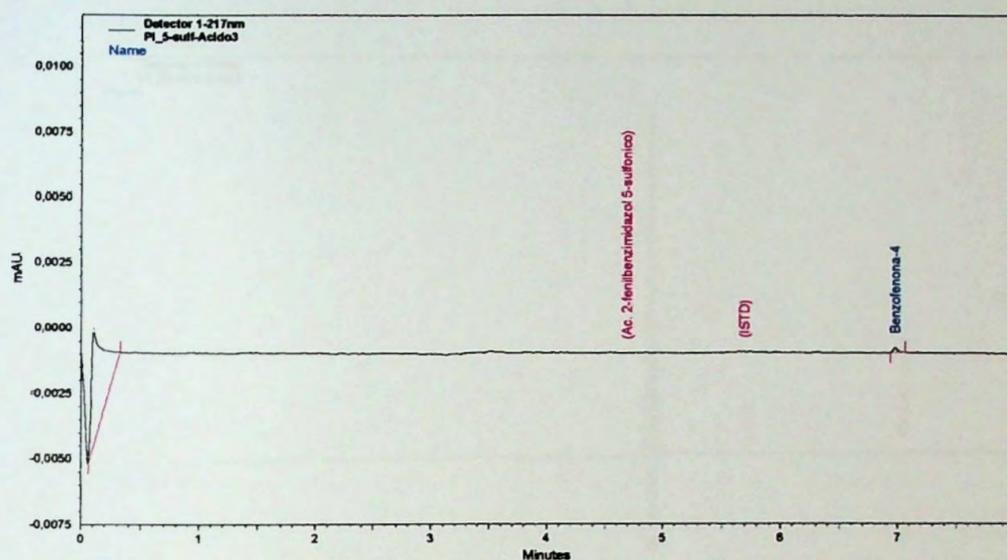
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 58.** Eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com ácido, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Silica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

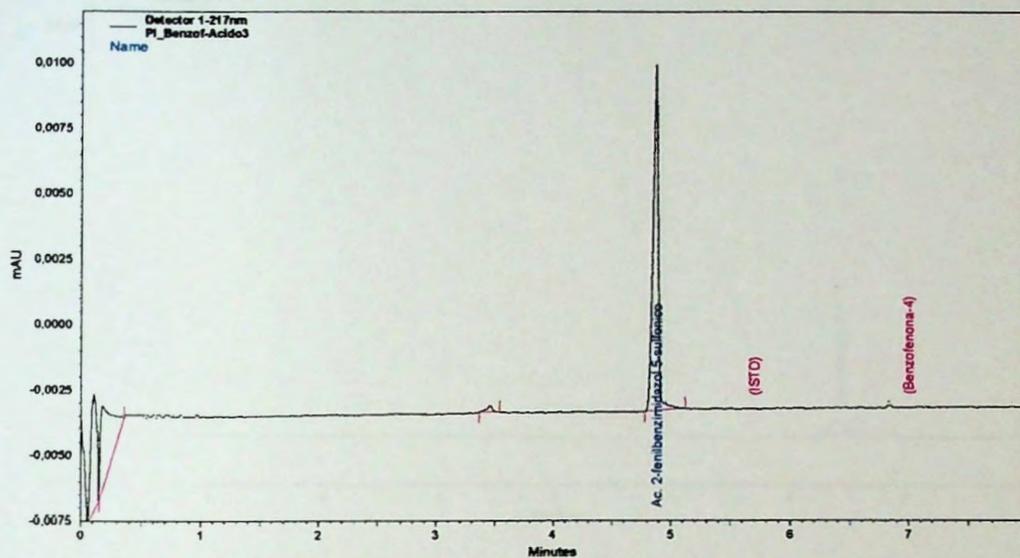
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 59.** Eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com ácido, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

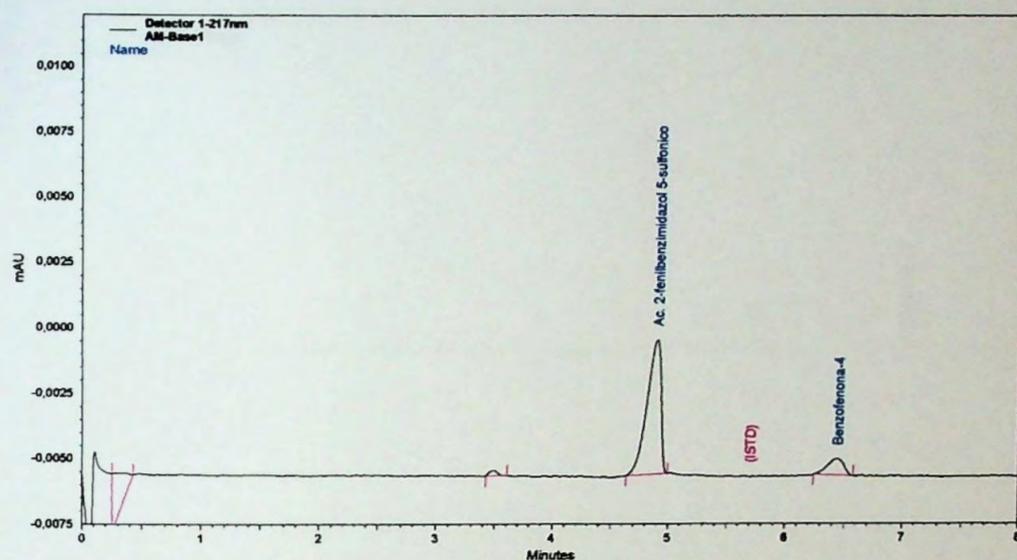
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 60.** Eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com ácido, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

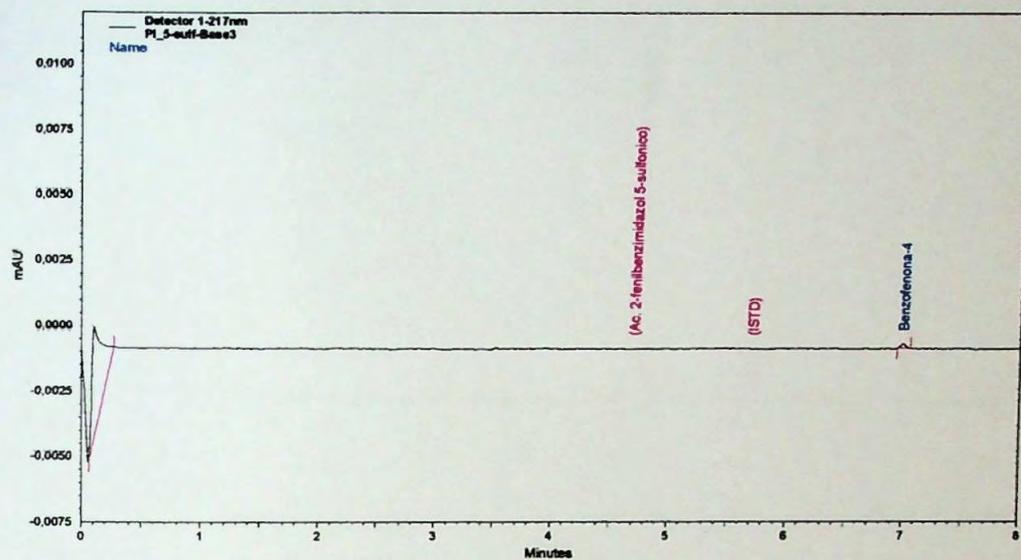
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 61.** Eletroferograma referente a amostra comercial (Amostra 1) tratada com base, e mantida a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

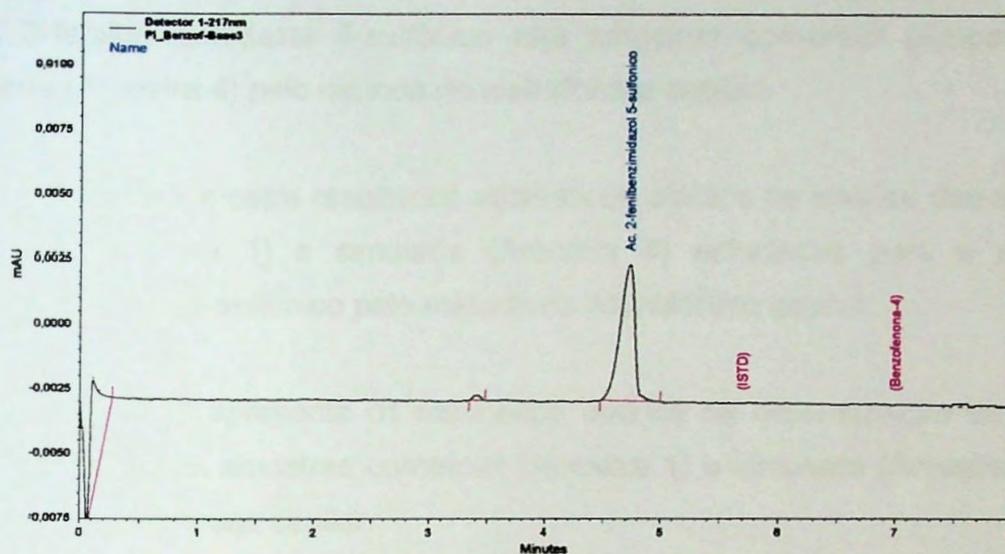
ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 62.** Eletroferograma referente ao placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Amostra 2) tratado com base, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio



**Figura 63.** Eletroferograma referente ao placebo de benzofenona-4 (Amostra 3) tratado com base, e mantido a 25°C, ao abrigo da luz, por 7 dias.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75µm d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

ISTD = Tempo de migração do Padrão Interno de Benzoato de Sódio

### **7.2.2.2.3.2- Determinação do Teor de Cada Filtro Solar nas Amostras Comerciais e Simuladas**

A **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4) pelo método de eletroforese capilar.

A **Tabela 8** mostra resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4) estudadas para o ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico pelo método de eletroforese capilar.

A **Tabela 9** apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de benzofenona-4 nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5) pelo método de eletroforese capilar.

A **Tabela 10** mostra resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5) estudadas para a benzofenona-4 pelo método de eletroforese capilar.

A **Figura 64** apresenta o eletroferograma referente à solução dos padrões de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, preparada conforme item 6.3.2.4.1-A. Obtendo-se concentrações de 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL; 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL e 100,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL

A **Figura 65** apresenta o eletroferograma referente à solução da amostra comercial (Amostra 1), preparada conforme item 6.3.2.4.1-C. Obtendo-se concentrações equivalentes a 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL; 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL e 100,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL

**Tabela 7.** Resultados obtidos na determinação do teor de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4) pelo método de eletroforese capilar.

| Amostra | Valor teórico (%) | Valor encontrado * | Teor percentual (%) |
|---------|-------------------|--------------------|---------------------|
| 1       | 7,000             | 7,037              | 100,53              |
| 4       | 7,000             | 7,003              | 100,04              |

\* Média de 6 determinações

**Tabela 8.** Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 4) estudadas para o ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico pelo método de eletroforese capilar.

| Amostra | Desvio padrão Relativo | Intervalo de confiança da média |
|---------|------------------------|---------------------------------|
| 1       | 0,07                   | 100,53 ± 0,08                   |
| 4       | 0,07                   | 100,04 ± 0,08                   |

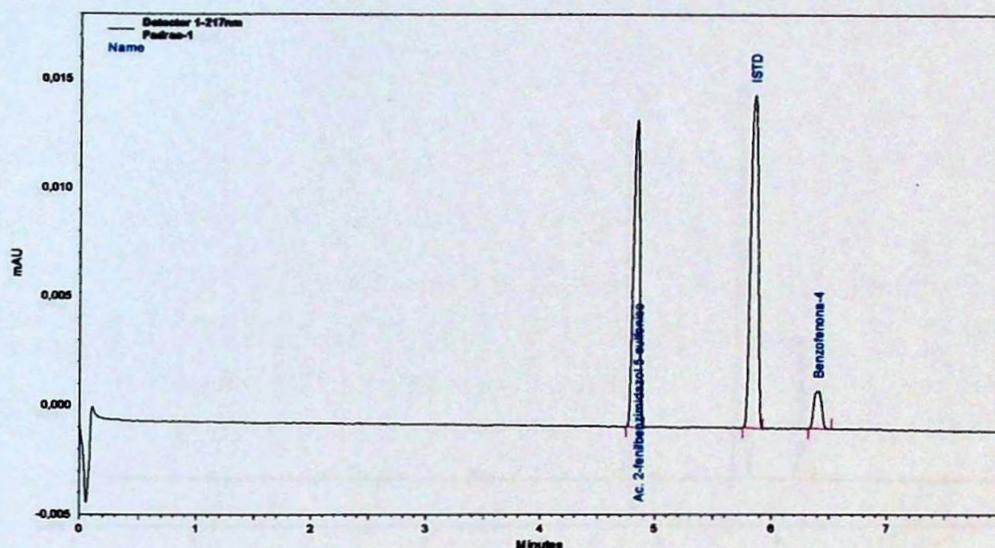
**Tabela 9.** Resultados obtidos na determinação do teor de benzofenona-4 nas amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5) pelo método de eletroforese capilar.

| Amostra | Valor teórico (%) | Valor encontrado * | Teor percentual (%) |
|---------|-------------------|--------------------|---------------------|
| 1       | 1,000             | 1,005              | 100,50              |
| 5       | 1,000             | 1,007              | 100,70              |

\* Média de 6 determinações

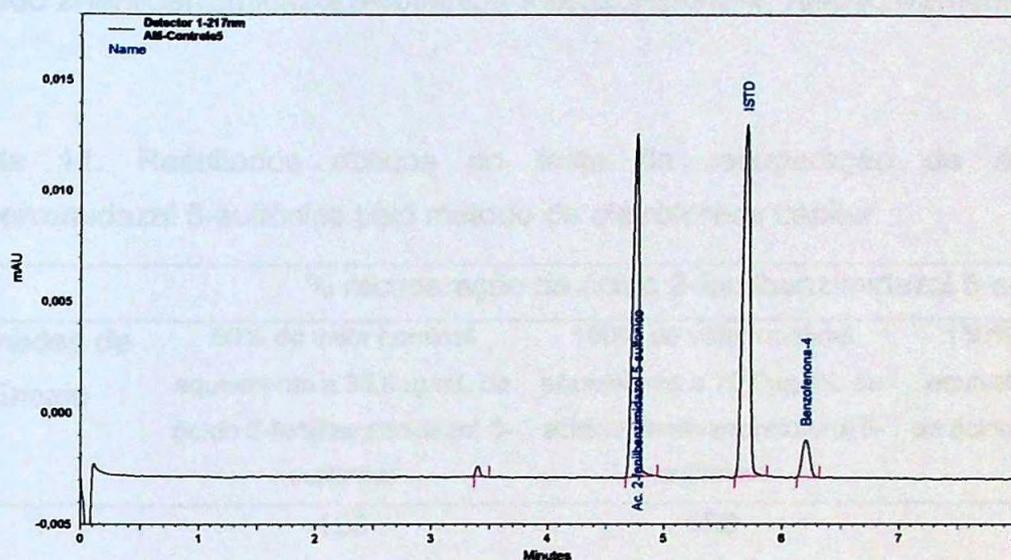
**Tabela 10.** Resultados estatísticos obtidos na análise das amostras comercial (Amostra 1) e simulada (Amostra 5) estudadas para a benzofenona-4 pelo método de eletroforese capilar.

| Amostra | Desvio padrão Relativo | Intervalo de confiança da média |
|---------|------------------------|---------------------------------|
| 1       | 0,55                   | 100,50 ± 0,57                   |
| 5       | 0,52                   | 100,70 ± 0,54                   |



**Figura 64.** Eletroferograma da solução padrão de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4.

Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV. Concentração: 70,0 $\mu$ g de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico/mL; 10,0 $\mu$ g de benzofenona-4/mL e 100,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL (ISTD = Padrão Interno).



**Figura 65.** Eletroferograma da solução amostra comercial (Amostra 1) Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B); Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar por 0,20 min (injeção hidrodinâmica); tensão aplicada: 29kV.

ISTD = Padrão interno de benzoato de sódio a 100,0 $\mu$ g de benzoato de sódio/mL.

### 7.2.2.2.3.3- Teste de Recuperação

As *Tabelas 11 e 12* apresentam os resultados dos testes de recuperação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, respectivamente.

**Tabela 11.** Resultados obtidos do teste de recuperação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico pelo método de eletroforese capilar

| % recuperação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico |   |  |  |
|--|---|--|--|
| Tomadas de Ensaio                                      | 50% do valor nominal<br>equivalente a 35,0µg/mL de<br>ácido 2-fenilbenzimidazol 5-<br>sulfônico | 100% do valor nominal<br>equivalente a 70,0µg/mL de<br>ácido 2-fenilbenzimidazol 5-<br>sulfônico | 150% do valor nominal<br>equivalente a 105,0µg/mL<br>de ácido 2-fenilbenzimidazol<br>5-sulfônico |
| 1  | 100   | 100  | 99   |
| 2  | 100   | 99   | 100  |
| 3  | 101   | 100  | 100  |
| 4  | 100   | 100  | 100  |
| 5  | 100   | 100  | 99   |
| 6  | 101   | 100  | 99   |
| Média  | 100   | 100  | 100  |
| DPR %  | 0,52  | 0,41   | 0,55   |

DPR = Desvio Padrão Relativo

**Tabela 12.** Resultados obtidos do teste de recuperação de benzofenona-4 pelo método de eletroforese capilar.

| Tomadas de<br>Ensaio | % recuperação de benzofenona-4                                     |  |  |
|----------------------|--|--|--|
|                      | 50% do valor nominal<br>equivalente a 5,0µg/mL de<br>benzofenona-4 | 100% do valor nominal<br>equivalente a 10,0µg/mL<br>de benzofenona-4 | 150% do valor nominal<br>equivalente a 15,0µg/mL<br>de benzofenona-4 |
| 1                    | 100  | 100  | 100  |
| 2                    | 101  | 101  | 100  |
| 3                    | 102  | 101  | 102  |
| 4                    | 101  | 100  | 101  |
| 5                    | 100  | 100  | 101  |
| 6                    | 99   | 102  | 100  |
| Média                | 101  | 101  | 101  |
| DPR %                | 1,04   | 0,81   | 0,81   |

DPR = Desvio Padrão Relativo

## 8- COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E ELETROFORESE CAPILAR POR ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 8.1- COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO DOS DOIS MÉTODOS

A exatidão de dois métodos é comparada pelo teste t de Student, que permite verificar se as médias dos valores experimentais obtidas por dois métodos distintos diferem significativamente ou não <sup>6</sup>.

Sejam  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$  as médias obtidas de uma mesma amostra, analisada por dois métodos diferentes. A variância baseada em ambas as amostras é:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1).S_1^2 + (n_2 - 1).S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

onde:

- $S_1^2$     variância da amostra pelo método 1
- $S_2^2$     variância da amostra pelo método 2
- $n_1$     número de amostras obtidas pelo método 1
- $n_2$     número de amostras obtidas pelo método 2

O valor de t é calculado pela expressão:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

e o número de graus de liberdade (GL) é:

$$GL = n_1 + n_2 - 2$$

O valor encontrado para  $t$  não deve exceder o valor tabelado, considera-se que a diferença entre os resultados encontrados pelos dois métodos, não seja significativa, para um determinado nível de confiança <sup>5</sup>.

## 8.2- COMPARAÇÃO DA PRECISÃO DOS DOIS MÉTODOS

A precisão de dois métodos é comparada pelo teste F, que permite verificar se o método 1 é mais preciso que o método 2 ou se a precisão dos dois métodos não difere significativamente <sup>5</sup>.

No teste F, são consideradas duas variâncias de uma mesma amostra, obtidas por métodos diferentes.

O valor de F é calculado pela equação:

$$F = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

onde:  $S_2^2$  é a maior variância, e  $S_1^2$  é a menor variância.

O número de graus de liberdade é dado por:

$$GL = n - 1$$

O teste F está associado aos graus de liberdade de  $S_1^2$  e  $S_2^2$ . Se o valor encontrado excede ao valor tabelado, em certo nível de probabilidade, há uma diferença significativa entre a precisão dos dois métodos.

### **8.3- RESULTADOS OBTIDOS NA COMPARAÇÃO DA EXATIDÃO E PRECISÃO DOS MÉTODOS**

A **Tabela 13** relaciona os valores experimentais obtidos na determinação de benzofenona-4 e os respectivos métodos.

Os valores experimentais obtidos na determinação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico estão relacionados na **Tabela 14**.

A **Tabela 15** mostra os resultados obtidos da comparação da exatidão dos métodos.

Os resultados obtidos na comparação da precisão dos métodos propostos são apresentados na **Tabela 16**.

**Tabela 13.** Resultados experimentais obtidos na determinação de benzofenona-4 para as amostras 1 (comercial) e 5 (simulada) e os respectivos métodos.

| Amostra | Parâmetro estatístico | Cromatografia líquida de alta eficiência | Eletroforese capilar |
|---------|-----------------------|--|----------------------|
| 1       | $\bar{x}$             | 100,30                                   | 100,50               |
|         | S                     | 0,52                                     | 0,55                 |
|         | n                     | 6  | 6                    |
| 5       | $\bar{x}$             | 100,20                                   | 100,70               |
|         | S                     | 0,41                                     | 0,52                 |
|         | n                     | 6  | 6                    |

Onde:  $\bar{x}$  média dos valores experimentais, em %  
 S desvio padrão  
 n número de amostras

**Tabela 14** - Resultados experimentais obtidos na determinação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico para as amostras 1 (comercial) e 4 (simulada) e os respectivos métodos.

| Amostra | Parâmetro estatístico | Cromatografia líquida de alta eficiência | Eletroforese capilar |
|---------|-----------------------|--|----------------------|
| 1       | $\bar{x}$             | 100,60                                   | 100,53               |
|         | S                     | 0,19                                     | 0,07                 |
|         | n                     | 6  | 6                    |
| 5       | $\bar{x}$             | 100,07                                   | 100,04               |
|         | S                     | 0,12                                     | 0,07                 |
|         | n                     | 6  | 6                    |

Onde:  $\bar{x}$  média dos valores experimentais, em %  
 S desvio padrão  
 n número de amostras

**Tabela 15.** Resultados da comparação da exatidão dos métodos para a determinação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e de benzofenona-4.

|                                       | Amostra | t de Student |
|---------------------------------------|---------|--------------|
| Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico | 1       | 0,86         |
|                                       | 4       | 0,42         |
| Benzofenona-4                         | 1       | 0,54         |
|                                       | 5       | 1,86         |

Valor de t de Student crítico para P = 95% e 10 graus de liberdade é 2,23

**Tabela 16.** Resultados da comparação da precisão dos métodos para a determinação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e de benzofenona-4.

|                                       | Amostra | F    |
|---------------------------------------|---------|------|
| Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico | 1       | 0,74 |
|                                       | 4       | 0,17 |
| Benzofenona-4                         | 1       | 0,29 |
|                                       | 5       | 3,46 |

Valor de F crítico para P = 95% e 5 graus de liberdade é 4,96

## 9- DISCUSSÃO

Devido ao aumento da incidência de câncer de pele e outros distúrbios associados a radiação ultravioleta <sup>64,90</sup>, há o incentivo ao desenvolvimento de novas formulações com filtros solares.

Dessa forma, são necessários métodos para a identificação e quantificação de filtros solares para a garantia da segurança e qualidade dessas formulações.

No presente trabalho foram analisados os filtros solares químicos benzofenona-4 e ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico pelos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar.

No Brasil ainda não há metodologias oficiais validadas e aprovadas para a determinação de filtros solares presentes em formulações cosméticas. A maioria dos trabalhos empregados para a identificação e quantificação de filtros solares estão relacionados aos métodos espectrofotométricos e cromatográficos, sendo poucos os trabalhos relacionados a eletroforese capilar.

Verificou-se um desafio interessante, o estudo da associação de benzofenona-4 e ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico por eletroforese capilar, pois o mesmo trabalho não foi encontrado na literatura.

Com o intuito de se empregar a eletroforese capilar como um método alternativo à cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de filtros solares, realizou-se o desenvolvimento e validação dos dois métodos.

## **9.1- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

### **9.1.1- Estudos Preliminares**

Na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência, um dos aspectos estudados foi a composição da fase móvel. Foram realizados testes preliminares analisando dois sistemas (Figura 15 e 16) para otimização do método. Nos dois sistemas houve uma boa separação dos picos de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, sendo o sistema 2, o escolhido para ser validado.

A escolha do sistema 2 foi em decorrência da análise dos cromatogramas provenientes da amostra comercial (Amostra 1), o qual possui um conservante (álcool benzílico) que proporciona um pico entre os dois filtros solares. Caso fosse escolhido o sistema 1, a determinação quantitativa dos filtros seria comprometida.

Inicialmente, os experimentos foram realizados a 258nm. Para melhorar a sensibilidade da detecção de benzofenona-4, verificou-se o comprimento adequado de 217nm, por meio de análise 3D do espectro de absorção (Quadro 8 – p. 86).

Avaliando os tempos de retenção de cada filtro solar, foram selecionados os seguintes comprimento de onda: 253nm para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 217nm para benzofenona-4.

O sistema 2 (Figura 16) escolhido para a validação do método possui a seguinte constituição: Condições: Fase móvel: tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol 58:5:37 (v/v/v); fluxo da fase móvel: 0,5mL/min; coluna: Supelcosil® LC18, 100mm x 4,6mm, 5µm de tamanho de partícula. Detecção: 258nm até 5,00 min e 217nm após 5,01 min; temperatura: 20°C; volume de injeção: 10µL

## 9.1.2- Validação do Método Analítico Selecionado

### 9.1.2.1- Curva de Calibração (Linearidade)

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foram construídas curvas de calibração em um intervalo de 14,0 – 140,0µg/mL para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Figura 17 e Quadro 9) e de 2,0 – 20,0µg/mL para benzofenona-4 (Figura 18 e Quadro 10).

Obteve-se boa linearidade entre as áreas dos picos versus concentração, com um coeficiente de correlação de 1,00000 para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 0,99998 para benzofenona-4, conforme Quadros 11 e 12. Estes coeficientes estão dentro das especificações estabelecidas na literatura <sup>47</sup>.

### 9.1.2.2- Limite de Detecção e Limite de Quantificação (Sensibilidade)

O limite de detecção (LD) de um método analítico corresponde a mais baixa concentração do composto estudado na amostra que pode ser detectada<sup>15, 45, 46, 47, 117</sup>.

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico corresponde a mais baixa concentração do composto estudado na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão <sup>46, 47, 117</sup>.

Para calcular o limite de detecção e o limite de quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 presentes em amostras comerciais foram realizadas leituras de soluções contendo concentrações na faixa de 2,0 a 10,0µg/mL. Foram realizadas cinco leituras de cada concentração, sendo que o

desvio padrão médio é dividido pela inclinação da curva de calibração, com o objetivo de se obter uma estimativa do ruído associado ao método <sup>46, 47, 117</sup>.

O limite de detecção (LD) aceitável deve ser 3 vezes o valor do sinal : ruído do método. O limite de quantificação (LQ) deve ser 10 vezes o valor do sinal : ruído do método ou 3,3 vezes o LD <sup>46, 47, 117</sup>.

A análise dos resultados obtidos dos Quadros 13 e 14 indicam que o método utilizado apresenta boa sensibilidade. Os valores de detecção e quantificação foram, respectivamente, para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico de 0,08µg/mL e 0,27µg/mL e para benzofenona-4 de 0,06µg/mL e 0,20µg/mL.

### **9.1.2.3- Pesquisa de Interferentes na Amostra Comercial (Especificidade)**

A Figura 20 mostra os resultados da pesquisa de interferentes a partir de excipientes da amostra comercial. Verifica-se que o placebo da amostra comercial não apresenta componentes que possam interferir com os picos dos filtros solares.

Observa-se a não formação de interferentes na amostra comercial, placebo de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e placebo de benzofenona-4, mesmo quando submetidos a luz, calor, oxidação, hidrólise ácida e básica. Os resultados estão apresentados nas Figuras 24 a 38.

Verifica-se a especificidade do método para a determinação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 na amostra comercial.

#### **9.1.2.4- Aplicação do Método Validado às Amostras Comercial e Simuladas (Precisão)**

A Tabela 1 e 3 mostram os resultados obtidos na determinação do teor de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, respectivamente, em amostras comerciais e simuladas.

O desvio padrão relativo foi calculado para as amostras comercial e simuladas empregando-se 6 determinações. Pode-se observar nas Tabelas 2 e 4 que os desvios padrões relativos obtidos com os dois filtros solares presentes na amostra comercial e simuladas variaram entre 0,12 a 0,52%, indicando uma boa reprodutibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

#### **9.1.2.5- Teste de Recuperação (Exatidão)**

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação a 50%, 100% e 150% do valor nominal de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico, as % de recuperação foram 100%, 101% e 100%, respectivamente.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para o teste de recuperação a 50%, 100% e 150% do valor nominal de benzofenona-4, as % de recuperação foram 99%, 100% e 99%, respectivamente.

Um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados obtidos varia de 98,0 a 102,0% <sup>5,46,47</sup>, assim sendo, os resultados obtidos demonstram a exatidão do método cromatográfico.

## 9.2- ELETROFORESE CAPILAR

### 9.2.1- Estudos Preliminares

Para a melhor solubilização do ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico, houve a necessidade de se empregar tampão com pH em torno de 9, dessa forma, escolheu-se trabalhar com o tampão borato.

Foram estudados 3 sistemas objetivando a otimização do eletrólito. Analisou-se 3 concentrações de tampão borato: 5mM (sistema 1), 10mM (sistema 2) e 20mM (sistema 3), que estão representados nas Figuras 39, 40 e 41, respectivamente.

O sistema 2 foi o escolhido para a validação por apresentar boa resolução e adequado tempo de análise.

Realizou-se a pesquisa de compostos que poderiam ser empregados como padrão interno do método como: ácido cítrico, ácido ascórbico, tiamina e benzoato de sódio. Entre eles, o único que apresentou boa resposta foi o benzoato de sódio.

O sistema 2 (Figura 40) escolhido para a validação do método possui a seguinte constituição: Condições: Eletrólito: Tampão borato 10mM pH 9,2 (preparado conforme item 5.1-B). Capilar: Sílica fundida de 100cm de comprimento total (45cm até o detector) x 75 $\mu$ m d.i. Detecção: 217nm; Temperatura: 24 a 30°C. Injeção: 20mbar em 0,20min (hidrodinâmica).

## 9.2.2- Validação do Método Analítico Selecionado

### 9.2.2.1- Curva de Calibração (Linearidade)

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foram construídas curvas de calibração em um intervalo de 14,0 – 140,0µg/mL para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico (Figura 42 e Quadro 15) e de 2,0 – 20,0µg/mL para benzofenona-4 (Figura 43 e Quadro 16).

Obteve-se boa linearidade entre a razão das áreas dos picos (filtros solar/benzoato de sódio) versus concentração. O coeficiente de correlação encontrado para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico foi 0,99999 e para benzofenona-4 foi 0,99997, conforme Quadros 17 e 18. Estes coeficientes estão dentro das especificações estabelecidas na literatura <sup>13,47</sup>.

### 9.2.2.2- Limite de Detecção e Limite de Quantificação (Sensibilidade)

O limite de detecção (LD) de um método analítico corresponde a mais baixa concentração do composto estudado na amostra que pode ser detectada<sup>18, 45, 46, 47, 117</sup>.

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico corresponde a mais baixa concentração do composto estudado na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão <sup>46, 47, 117</sup>.

Para calcular o limite de detecção e o limite de quantificação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 presentes em amostras comerciais foram realizadas leituras de soluções contendo concentrações na faixa de 2,0 a 10,0µg/mL. Foram realizadas cinco leituras de cada concentração, sendo que o

desvio padrão médio é dividido pela inclinação da curva de calibração, com o objetivo de se obter uma estimativa do ruído associado ao método <sup>46, 47, 117</sup>.

O limite de detecção (LD) aceitável deve ser 3 vezes o valor do sinal : ruído do método. O limite de quantificação (LQ) deve ser 10 vezes o valor do sinal : ruído do método ou 3,3 vezes o LD <sup>46, 47, 117</sup>.

A análise dos resultados obtidos dos Quadros 19 e 20 indicam que o método utilizado apresenta boa sensibilidade. Os valores de detecção e quantificação foram, respectivamente, para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico de 0,57µg/mL e 1,88µg/mL e para benzofenona-4 de 0,62µg/mL e 2,07µg/mL.

### **9.2.2.3- Pesquisa de Interferentes na Amostra Comercial (Especificidade)**

A Figura 45 mostra os resultados da pesquisa de interferentes a partir de excipientes da amostra comercial. Verifica-se que o placebo da amostra comercial não apresenta componentes que possam interferir com os picos dos filtros solares.

Os resultados apresentados nas Figuras 49 a 63 mostram que não há formação de interferentes, mesmo quando submetidos a luz, calor, oxidação, hidrólise ácida e básica.

Dessa forma, o método apresentou especificidade para a determinação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 na amostra comercial.

#### **9.2.2.4- Aplicação do Método Validado às Amostras Comercial e Simuladas (Precisão)**

A Tabela 7 e 9 mostram os resultados obtidos na determinação do teor de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4, respectivamente, em amostras comerciais e simuladas.

O desvio padrão relativo foi calculado para as amostras comercial e simuladas empregando-se 6 determinações. Pode-se observar nas Tabelas 8 e 10 que os desvios padrões relativos obtidos com os dois filtros solares presentes nas amostras comercial e simuladas variaram entre 0,07 a 0,55%, indicando uma boa reprodutibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

#### **9.2.2.5- Teste de Recuperação (Exatidão)**

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação a 50%, 100% e 150% do valor nominal de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico, as % de recuperação foram 100%, 100% e 100%, respectivamente.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para o teste de recuperação a 50%, 100% e 150% do valor nominal de benzofenona-4, as % de recuperação foram 101%, 101% e 101%, respectivamente.

Um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados obtidos varia de 98,0 a 102,0% <sup>5,46,47</sup>, assim sendo, os resultados obtidos demonstram a exatidão do método por eletroforese capilar.

### **9.3- COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO DE FILTROS SOLARES**

#### **9.3.1- Comparação da Exatidão e Precisão**

Foram usados testes de significância para verificar se a diferença entre os dois resultados é significativa. O teste t de Student é usado para verificar a significância de uma média ou da diferença entre duas médias e o teste F de Snedecor, empregado para comparar duas variâncias.

Nos resultados obtidos na comparação da exatidão e precisão (Tabelas 13 a 16) dos dois métodos propostos (eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência) pode-se verificar que não existe diferença estatística significativa entre as médias e variâncias dos métodos para a determinação de ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 para um nível de confiança de 95%.

## 10- CONCLUSÕES

Pelos dados experimentais obtidos e nas condições em que foi realizado o trabalho pode-se concluir:

- Ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 podem ser determinados quantitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna Supelcosil® LC18 e Tampão fosfato (preparado conforme item 5.1-D), acetonitrila e metanol (58:5:37, v/v/v) como fase móvel e por eletroforese capilar na presença de eletrólito: tampão borato 10mM pH 9,2.
- Os excipientes na amostra comercial não interferem com os métodos propostos.
- Os coeficientes de correlação para os métodos propostos apresentaram boa linearidade dentro das especificações, variando de 0,99997 a 1,00000 para as duas metodologias.
- Com o método da cromatografia líquida de alta eficiência, as porcentagens de recuperação variaram de 100% a 101% para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e de 99 a 100% para benzofenona-4.
- Com o método de eletroforese capilar, as porcentagens de recuperação foram 100% para ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e 101% para benzofenona-4.
- Os métodos se apresentaram precisos para a determinação dos filtros solares com desvio padrão relativo na faixa de 0,12 a 0,52% para o método cromatográfico e 0,07 a 0,55% para o método por eletroforese capilar.

- Os métodos cromatográfico e por eletroforese capilar apresentaram boa especificidade, precisão, sensibilidade e exatidão às amostras testadas com ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4.
- Os testes t e F mostraram que os dois métodos propostos às mesmas amostras contendo ácido 2-fenilbenzimidazol 5-sulfônico e benzofenona-4 são comparáveis em termos de precisão e exatidão.
- A eletroforese capilar é uma opção viável para a análise de filtros solares em produtos cosméticos.

## 11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMOVICS, J.A. **Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals**. New York: M. Dekker, 1990. p. 167-224.
2. AGARELLI, A.B. Proteção solar em produtos multifuncionais. **Rev. Racine**, São Paulo, v. 34, set./out., p. 6-10, 1996.
3. ANDERSEN, P.H., ABRAMS, K., BJERRING, P., et al. A time-correlation study of ultraviolet B induced erythema measured by reflectance spectroscopy and laser doppler flowmetry. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 8, n. 3, p. 123-128, 1991.
4. ANVISA. Disponível na Internet. <http://www.anvisa.org.br> em 29 dez. 2002.
5. AOAC. **Peer verified methods program, manual on policies and procedures**. Gaithersbury: AOAC, 1993. 35 p.
6. AZEVEDO, J.S., VIANAJR, N.V, SOARES, C.D.V. UVA/UVB sunscreen determination by second-order derivative ultraviolet spectrophotometry. **II Farmaco**, Pavia, v. 54, n. 9, p. 573-578, 1999.

7. BERGOLD, A.M., PONZIO, H.A., RIBEIRO, M.H., et al. Determinação do FPS do parsol MCX. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 4, jan./fev., p. 46-51, 1992.
8. BERNHARDT, P., GIESEN, M., HOLLENBERG, D. et al. UV filters for hair protection. **Int. J. Cosm. Sci**, Oxford, v. 15, p. 181-199, 1993.
9. BILLHIMER, W.L. Avaliação de filtros solares em seres humanos: proteção contra a queimadura solar. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 1, mai./jun., p. 41-48, 1989.
10. BOGER, J., ARAUJO, O.E., FLOWERS, F. Sunscreens: efficacy, use and misuse. **South Med. J.**, v. 72, p. 1421-1427, 1984.
11. BORELLI, S.S. Considerações sobre filtros solares. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 6, mar/abr, p. 20-22, 1994.
12. BRASH, D.E., ZIEGLER, A., JONASON, A.S. et al. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis and tumor promotion. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 1, p. 136-142, 1996.
13. BRITTAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não-cromatográficos. **Pharm. Tech.**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 719-736, 1998.

14. BROWN, R., CAPHART, M., FAUSTINO, P. et al. Analytical procedures and method validation: highlights of the FDA's draft guidance. *LC/GC*, Cleveland, v. 19, n. 1, p. 74-79, 2000.
15. BRUCE, P., MINKKINEN, P., RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Microchimica Acta*, Wien, v. 128, n. 1-2, p. 93-106, 1998.
16. BUENDÍA-EISMAN, A., ORTEGA, S.S. Fotoprotección en la infancia. *Piel*, Barcelona, v. 15, n. 6, p. 247-249, 2000.
17. CERNASOV, D., MACCHIO, R., MESIHA, M. et al. Octyldodecyl neopentanoate. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 112, n. 6, p. 75-82, 1997.
18. CHISVERT, A. VIDAL, M.T., SALVADOR, A. Sequential injection analysis for benzophenone-4 and phenylbenzimidazole sulphonic acid in sunscreen sprays by solid-phase extraction coupled with ultraviolet spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 464, n. 1, p. 295-301, 2002.
19. CHISVERT, A., PASCUAL-MARTÍ, M., SALVADOR, A. Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatography. Use of cyclodextrins as mobile phase modifier. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 921, n. 2, p. 207-215, 2001.

20. CHISVERT, A., PASCUAL-MARTÍ, M.C., SALVADOR, A. Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC. **Fresenius J. Anal. Chem.**, Berlin, v. 369, n. 7-7, p. 638-641, 2001.
21. COLIPA. Nuevo metodo europeo de evaluacion del factor de proteccion solar. 1994. 11 p.
22. COTEAU, C., CULLEL, N.P., CONNAN, A.E. et al. Stripping method to quantify absorption of two sunscreens in human. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 222, n. 1-2, p. 153-157, 2001.
23. DEAN, J.A. **Analytical Chemistry Handbook**. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 463-474.
24. DEBUYS, H.V., LEVY, S.B., MURRAY, J.C. et al. Modern approaches to photoprotection. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 577-590, 2000.
25. DESIMONE II, E.M., BANAKAR, U.V. Issues in contemporary drug delivery part VIII: sunscreens as therapeutic agents. **J. Pharm. Technol.**, Eugene, v. 9, may/jun., p. 99-106, 1993.
26. DIFFEY, B.L., ELWOOD, J.M. Tables of ambient solar ultraviolet radiation for use in epidemiological studies of malignant melanoma and other

- diseases. In: GALLAGHER, R.P., ELWOOD, J.M. (Eds.). **Epidemiological Aspects of Cutaneous Malignant Melanoma**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 81-105.
27. DIFFEY, B.L., ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v. 40, may/jun., p. 127-133, 1989.
28. DIFFEY, B.L., STOKES, R.P., FORESTIER, S. et al. Suncare product photostability: a key parameter for a more realistic in vitro efficacy evaluation. **Eur. J. Dermatol.**, Montrouge, v. 7, apr/may, p. 226-228, 1997.
29. DIFFEY, B.L., TANNER, P.R., MATTS, P.J. et al. In vitro assesment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 43, n. 6, p. 1024-1035, 2000.
30. Enciclopédia de absorventes de UV para produtos com filtro solar. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 45-58, 1995.
31. ENTERPRISE DIRECTORATE GENERAL OF THE EUROPEAN COMMISSION. **Cosmetics Legislation**. 1999. v. 1. Disponível na Internet. <http://pharmacos.eudra.org> em 29 dez. 2002.

32. ETTRE, L.S. The birth of partition chromatography. **LC/GC**, Cleveland, v. 19, n. 5, p. 506-512, 2001.
33. FARMER, K.C., NAYLOR, M.F. Sun exposure, sunscreens, and skin cancer prevention: a year-round concern. **Ann. Pharmacother.**, v. 30, n. 6, p. 662-673, 1996.
34. FDA. Disponível na Internet. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr990521.html> em 29 dez. 2002.
35. FOURTANIER, A., LABAT-ROBERT, J., KERN, P., et al. In vivo evaluation of photoprotection against chronic ultraviolet-A irradiation by a new sunscreen Mexopyl SX. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 549-560, 1992.
36. FUKUDA, M., TAKATA, S. The evolution of recent sunscreen. In: ALTMAYER, P., HOFFMAN, K., STÜCKER, M. (Eds.) **Skin cancer and UV radiation**. Berlin: Springer, 1997. p. 265-275.
37. GAGLIARDI, L., CAVAZZUTTI, G., MONTANARELLA, L., TONELLI, D. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v. 464, n. 2, p. 428-433, 1989.

38. GANGE, R.W. Acute effects of ultraviolet radiation in the skin. In: FITZPATRICK, T.B., EISEN, A.Z., WOLFF, K., et al (Eds.) **Dermatology in general medicine**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1987. p. 1451-1457.
39. GOODMAN, GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica: farmacologia dermatológica: filtros solares**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996, p. 1193.
40. GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, n. 9, p. 305a-309a, 1996.
41. GROOT, D., JONSTON, P., **Young as you look**. Edmonton: In Forum, 1997. 302p.
42. HANSEN, J. Filtros solares: revisão da legislação mundial. **Cosmet. On Line**, São Paulo, v. 19, n. 105, p. 74-99, 1997. 53
43. HARRIGAN, P. Re-application of suscreen - does it affect protection? **Cosmet. Dermatol.**, v. 13, n. 5, p. 11-12, 2000.
44. HRUZA, L.L., PENTLAND, A.P., Mechanisms of UV-induced inflammation. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 100, p. 355-415, 1993.

45. INMAN, E.L., RICKARD, E.C. Chromatographic detection limit in pharmaceutical method development. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v. 447, n. 1, p. 1-12, 1988.
46. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHAMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996, Geneva. **ICH-Q2A: Text on validation of analytical procedures.** Geneva, 1996. p. 1-5. Disponível na Internet. <http://ifpma.org/ich1> em 1 out. 2001.
47. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHAMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996, Geneva. **ICH-Q2B: Validation of analytical procedures: methodology.** Geneva, 1996. p. 1-5. Disponível na Internet. <http://ifpma.org/ich1> em 1 out. 2001.
48. JANNIGER, C.K. Solar exposure in children. **Pediatr. Dermatol.**, Boston, v. 49, jun., p. 401-402, 1992.
49. JAPANESE STANDARDS OF COSMETIC INGREDIENTS. **Cosmetics Legislation.** 1994. Disponível na Internet. <http://www.pharmasys.or.jp> em 29 dez. 2002.

50. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. **J. Liq. Chrom. Rel. Technol.**, New York, v. 19, n. 5, p. 719-736, 1996.
51. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **J. Liq. Chrom. Rel. Technol.**, New York, v. 19, n. 5, p. 737-757, 1996.
52. JOHNSON, E.L., STEVENSON, R. **Basic Liquid Chromatography**. Palo Alto: Varian Associates, 1978. 351 p.
53. JORGENSON, J.W., LUKAS, K.D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. **Anal. Chem.**, Washington, v. 53, p. 1298-1302, 1981. 86
54. KIMBROUGH, D.A. The photochemistry of sunscreens. **J. Chem. Educ.**, Washington, v. 74, n. 1, p. 51-53, 1997.
55. KOCHEVAR, I.E., PATHAK, M.A., PARRISH, J.A. Photophysics, photochemistry, and photobiology. In: FITZPATRICK, T.B., EISEN, A.Z., WOLFF, K., FREEDBERG, I.M., AUSTEN, K.F. (Eds.) **Dermatology in general medicine**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1987. p. 1443-1451.

56. KRIPKE, M.L., PITCHER, H., LONGSTRETH, J.D. Potential carcinogenic impacts of stratospheric ozone depletion. **J. Environ. Sci. Health**, v. 7, p. 53-74, 1989.
57. KRULL, I., SWARTZ, M., Regulatory review of method validation protocols. **LC/GC**, Cleveland, v. 18, n. 6, p. 620-625, 2000.
58. KUHN, R., HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary Electrophoresis: Principles and Practice**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 371 p.
59. LASER AND SKIN SURGERY CENTER OF NEW YORK. **Skin Cancer**, 1996. Disponível na Internet.  
[http://www.laserskinsurgery.com/newsletter/backissue/10\\_96/1096\\_index.html](http://www.laserskinsurgery.com/newsletter/backissue/10_96/1096_index.html) em 29 dez. 2002.
60. LAWRENCE, N. New and emerging treatments for photoaging. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 99-112, 2000.
61. LI, S.F.Y., NG, C.L., ONG, C.P. Pharmaceutical analysis by capillary electrophoresis. In: BROWN, P.R., GRUSHIKA, E. **Adv. Chromatogr.** New York, 1995. v. 35, p.199-257.
62. LOWE, N.J. Photoprotection. **Semin. Dermatol.**, v. 9, p. 78-83, 1990.

63. **LOWE, N.J., FRIEDLANDER, J.** Prevention of photodamage with sunprotection and sunscreens. In: **GILCHREST, B.A. (Ed.) Photodamage.** Cambridge: Blackwell Science, 1995. p. 201-220.
64. **MAES, D., MARENUS, K., SMITH, W.P.** Novos avanços na fotoproteção. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 4, p. 40-45, 1992.
65. **MANSUR, J.S., BREDER, M.N.R., MANSUR, M.C., et al.** Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.
66. **MENDONÇA, V.L.M., KEDOR, E.R.M.** Proteção solar x fator de proteção. **Rev. Racine**, São Paulo, set./out., p. 14, 1996.
67. **MENTER, J.M.** Recent developments in UVA photoprotection. **Int. J. Dermatol.**, Philadelphia, v. 29, p. 389-394, 1990.
68. **MERCK.** Color care protection: active ingredients, additives, pigments for the cosmetic industry. 2001. 1 CD-ROM.
69. **MEYBECK, A.** Objective methods for the evaluation of sunscreens. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 98, mar., p. 51-60, 1994.

70. MICHAUD, P., SOTO, P., LEROY, T. et al. First-derivative spectroscopic determination of sunscreens in cosmetic formulations. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 93-104, 1994.
71. MORETTO, L.D., MOOKHERJEA, S. A era da validação. **Pharm. Tech.**, São Paulo, v. 2., n. 3, p. 12-20, 1998.
72. MOURA, C.J. Radiação e filtros solares. **Rev. Racine**, São Paulo, v. 34, set./out., p. 3-4, 1996.
73. MULLER, W. Prevention of skin cancer and sun damage. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v. 2, p. 44-46, 85, 1986.
74. MURPHY, G.M. Sunblocks: mechanisms of action. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 34-36, 1999.
75. O'DONOGHUE, M.N. Sunscreen: one weapon against melanoma. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p., 789-793, 1991.
76. PAOLA, M.V.R.V. Princípios de formulação de protetores solares. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 13, set./out., p. 74-82, 2001.
77. 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.

78. PARRISH, J.A. Responses of skin to visible and ultraviolet radiation. In: GOLDSMITH, L.A. (Ed.) **Biochemistry and Physiology of the Skin**. New York: Oxford University Press, 1983, p. 713-733.
79. PATEL, N.P., HIGHTON, A., MOY, R.L. Properties of topical sunscreen formulations: a review. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, New York, v. 18, n. 4, p. 316-320, 1992.
80. PATHAK, M.A. Sunscreens and their use in the preventive treatment of sunlight-induced skin damage. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, New York, v. 13, p. 739-750, 1987.
81. PATHAK, M.A. Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 7, p. 285-312, 1982.
82. PEYREFITE, G., MARTINI, M.C., CHIVOT, M. **Cosmetologia, histologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998. 507 p.
83. PINNEL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 84, n. 1, p. 1-19, 2003.

84. POTARD, G., LAUGEL, CI, BAILLET, A. et al. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 249-260, 1999.
85. PRISTA, L.N., BAHIA, M.G., VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. Porto: Associação Nacional de Farmácia, 1992. p. 239-298.
86. QUEROL, J.M. Método de validación de los fotoprotectores. **Piel**, Barcelona, v. 15, n. 6, p. 78-86, 2000.
87. RAMSAY, C.A. Vascular changes in human skin after ultraviolet irradiation. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 487-493, 1976.
88. RANGEL, V.L.B.I., CORRÊA, M.A., Fotoproteção. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 14, n. 6, nov./dez., p. 88-95, 2002.
89. RASTOGI, S.C., JENSEN, G.H. Identification of UV filters in sunscreen products by high-performance liquid chromatography-diode-array detection. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v. 828, n. 1/2, p. 311-316, 1998.
90. RIBEIRO, C. Sol e câncer de pele. **Rev. Racine**, São Paulo, v. 51, p. 37-38, 1999.

91. RIGEL, D.S. Can sunscreens protect against skin cancer? In: AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY ANNUAL MEETING, 56, 1998, Orlando. 78
92. SANTORO, M.I.R.M., PRADO, M.S.A., STEPPE, M. et al. Eletroforese capilar: teoria e aplicação na análise de medicamentos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 97-110, 2000.
93. SCHNEIDER, P., BRINGHEN, A., GONZENBACH, H. Single step HPLC analysis of sunscreen products containing complex UV filter systems. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v. 159, n. 4-6, p. 32-38, 1996.
94. SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. Introdução aos produtos fotoprotetores. **Cosmet. Toiletris Ed. Port.**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 60-67, 2000.
95. SHAAT, N.A., The chemistry of sunscreens. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 101, p. 55-70, 1986.
96. SHONO, S., IMURA, M., OTA, M. et al. The relationship of skin color, UVB-induced erythema, and melanogenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 84, n. 4, p. 265-267, 1985.

97. SIKES, R.G. The history of suntanning: a love/hate affair. **J. Aesthetic Sci.**, v. 1, n. 2, p. 6-7, 1998. Disponível na Internet.  
<http://www.dermcare.org/history.htm> em 29 dez. 2002.
98. SMITHERS, D.W., WOOD, J.H. Xeroderma pigmentosum - an attempt at cancer prophylaxis. **Lancet**, London, v. 1, p. 945-946, 1952.
99. STABERG, B., WORM, A.M., BORDTHAGEN, H., ROSSING, N. Direct and indirect effects of UVA on skin vessel leakiness. **J. Invest. Dermatol.**, Philadelphia, v. 79, p. 358-360, 1982.
100. STEINER, D. Benefícios e riscos da exposição solar. **Rev. Racine**, São Paulo, v. 41, n. 11/12, p. 4-9, 1997/1998.
101. STEINER, D. Câncer de pele. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 9, n. 5, p. 26-27, 1997.
102. STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v. 9, n. 3/4, p. 30-33, 1997.
103. STERLING, G.B. Sunscreens: a review. **Cutis**, New York, V. 50, n. 3, p. 221-224, 1992.

104. STERN, R.S., WEINSTEIN, M.C., BAKER, S.G. Risk reduction for non-melanoma skin cancer with childhood sunscreen use. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 122, n. 5, p. 537-545, 1986.
105. STILLER, M.J., DAVIS, I.C., SHUPACK, J.L. A concise guide to topical sunscreens: state of the art. **Intern. J. Dermatol.**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 540-543, 1992.
106. 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.
107. SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY AND END RESULTS (SEER). **Cancer Statistics Review 1973-1991**. National Cancer Institute, 1995. p. 66-69. 71
108. SWARTZ, M.E., KRULL, I.S., Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Tech.**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.
109. SYNDER, L.R., KIRLAND, J.J., GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1997. 765 p.
110. TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

111. TAVARES, M.F.M. **Mecanismos de separação em eletroforese capilar.** *Química Nova*, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493- 511, 1997.
112. TAYLOR, C.R., STERN, R.S., LEYDEN, J.J. et al. **Photoaging/photodamage and photoprotection.** *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 22, n. 1, p. 1-15, 1990.
113. TRUHAN, A.P. **Sun protection in childhood.** *Clin. Pediatr.*, Philadelphia, v. 30, n. 12, p.676-681, 1991.
114. US FDA. **Analytical procedures and methods validation (draft).** Rockville: Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000. 33 p. Disponível na Internet. <http://www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.pdf> em 1 out. 2001.
115. US FDA. **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods.** Rockville: Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1994. 30 p. Disponível na Internet. <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf> em 1 out. 2001.
116. USP. **United States Pharmacopeia 24, National Formulary 19.** Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1999.

117. **USP. United States Pharmacopeia 24, National Formulary 19.** Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1999. Chap. 1225: Validation of compendial methods.
118. **VANQUERP, V., RODRIGUEZ, C., COIFFARD, C. et al.** High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. **J. Chrom. A.**, Amsterdam, v. 832, n. 1-2, p. 273-277, 1999.
119. **VIGLIOGLIA, P.A., RUBIN, J. Cosmiatria II.** 2. ed. Buenos Aires: AP. Americana, 1991. p. 120-135.
120. **WEINBERGER, R. Practical Capillary Electrophoresis.** 2. ed. San Diego: Academic Press, 2000. 459 p.
121. **WESTERDAHL, J., OLSSON, H., INGVAR, C.** At what age do sunburn episodes play a crucial role for the development of malignant melanoma. **Eur. J. Cancer**, v. 30a, n. 11, p. 1647-1654, 1994.
122. **WESTERHOF, W., KAMMEYER, A., RIS, J.** Suggestions for photostable sunscreens. **J. Appl. Cosmetol.**, v. 3, jan./mar., p. 107, 1985.
123. **WHITEMAN, D., GREEN, A.** Melanoma and sunburn. **Cancer Causes and Control**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 564-572, 1994.

124. WILKINSON, J.B., MOORE, R.J. **Cosmetología de Harry**. Madri: Dias de Santos, 1990. p. 249-293.

## OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO  
DO(S) ANEXO(S) NESTE ARQUIVO