



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ESTUDO DA
FOTOESTABILIDADE DA AVOBENZONA NA PRESENÇA DE
PILAR[5]ARENO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA UV/VIS,
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E RMN DE
 ^1H**

DÉBORA DE AZEVEDO DOMINGUES

Florianópolis
Dezembro/2019

Débora de Azevedo Domingues

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ESTUDO DA
FOTOESTABILIDADE DA AVOBENZONA NA PRESENÇA DE
PILAR[5]ARENO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA UV/VIS,
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E RMN DE
¹H**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Gustavo Amadeu
Micke:163843728
94

Assinado de forma digital
por Gustavo Amadeu
Micke:16384372894
Dados: 2019.12.09
16:55:20 -03'00'

Gustavo Amadeu Micke

Lizandra C. Bretanha

Florianópolis
Dezembro/2019

Agradecimentos

Agradeço primeiramente e acima de tudo à minha mãe e à minha avó, por fazerem de mim quem sou e por todo amor, dedicação, confiança e apoio sempre.

A todos os meus amigos que me apoiaram durante os anos de graduação e me fizeram não desistir. Em especial a minha amiga/irmã Heloisa Barbosa, que mesmo de longe me auxiliou e sempre me apoiou em qualquer situação.

Ao Gabriel Gobatto, uma das pessoas que mais me incentivou e me fez acreditar em mim mesma.

Ao pessoal da ATQ pela parceria e amizade.

Ao pessoal do meu grupo de pesquisa, o LabEC, por todo aprendizado compartilhado, toda ajuda e principalmente amizade.

A Universidade Federal de Santa Catarina por permitir este sonho ser real.

A CNPq pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

E por último e não menos importante ao meu orientador Gustavo e minha co-orientadora Lizandra por acreditarem em mim, por toda paciência e ensinamentos compartilhados.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Revisão da literatura.....	13
2.1 Radiação solar	13
2.2 Protetores solares	14
2.2.2 Filtros orgânicos.....	15
2.3 Estabilidade de protetores solares	16
2.4 Fotoestabilidade da Avobenzona.....	18
2.4.1 Fotoestabilidade da avobenzona em diferentes condições.....	20
2.5 Pilarareno (sistema hóspede-hospedeiro)	24
2.6 Metodologias para estudo da fotoestabilidade da avobenzona.....	25
2.6.1 Ressonância Magnética Nuclear de ¹Hidrogênio (RMN de ¹H).....	26
2.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	26
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivos gerais.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. Material e métodos.....	27
4.1 Materiais	27
4.1.1 Reagentes	28
4.1.2 Equipamentos	28
4.2 Métodos	28
4.2.1 Teste de solubilidade avobenzona	28
4.2.2 Teste de solubilidade imidazol-Pilar[5]areno.....	29
4.2.3 Avaliação da fotoestabilidade da avobenzona por espectroscopia UV-Vis	30

4.2.4 Avaliação da fotoestabilidade do imidazol-pilar[5]areno por espectroscopia UV-Vis	30
4.2.5 Promoção do sistema hóspede-hospedeiro entre o imidazol-pilar[5]areno e a avobenzona	31
4.2.6 Avaliação da fotoestabilidade do sistema entre o imidazol-pilar[5]areno e a avobenzona	31
4.2.7 Desenvolvimento de um método em HPLC-DAD para determinação e quantificação das duas espécies presente no equilíbrio da avobenzona...	31
4.2.8 Parâmetros de mérito	32
4.2.9 Segurança no laboratório	33
5. Resultados e discussão	34
5.1 Teste de solubilidade avobenzona.....	34
5.3 Avaliação da fotoestabilidade da avobenzona por espectroscopia de UV-Vis	35
5.4 Avaliação da fotoestabilidade do P5imi por espectroscopia UV-Vis	39
5.5 Promoção de um sistema hóspede-hospedeiro entre o P5 _{IMI} e a avobenzona.....	39
5.6 Avaliação da fotoestabilidade do sistema formado.....	42
5.7 Desenvolvimento de um método em HPLC-DAD para determinação e quantificação das duas espécies presente no equilíbrio da avobenzona	44
5.8 Parâmetros de mérito	45
5.8.1 Linearidade.....	45
5.8.2 Limites de detecção e quantificação.....	46
5.8.3 Precisão.....	47
6. Conclusão.....	48
7. Referências.....	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Transição eletrônica das radiação UV e conversão VIS-IV pelos fotoprotetores orgânicos.....	16
FIGURA 2	Isomerização OMC	17
FIGURA 3	Equilíbrio ceto(K)-enólico(E) da avobenzona.....	18
FIGURA 4	Diferentes caminhos envolvidos no decaimento da AVO.....	19
FIGURA 5	Espectro de absorção da AVO em acetonitrila.....	20
FIGURA 6	Espectro UV AVO em solventes analíticos.....	23
FIGURA 7	Formação de ligações intermoleculares de hidrogênio entre AVO(E) e solventes polares	23
FIGURA 8	Espectro de absorção de AVO em miristato isopropílico (a) e óleo mineral (b).....	24
FIGURA 9	Estrutura do pilar[5]areno	25
FIGURA 10	Estrutura “cesta de basquete” presente nos pilararenos.	25
FIGURA 11	Estrutura molecular do P5 _{MI}	29
FIGURA 12	Variação da absorção da avobenzona após irradiação de luz UVA/UVB	36
FIGURA 13	Variação absorbância em diferentes tempos de irradiação UVA/UVB	37
FIGURA 14	Cinética para o equilíbrio da avobenzona na presença de luz.....	38
FIGURA 15	Espectro de absorção do P5 _{MI} sem levar a luz UVA/UVB e depois de irradiação de 2h de luz UVA/UVB	39

FIGURA 16 Espectro de RMN de ^1H do P5_{IMI} (DMSO-D_6 ; 200 MHz; 25,0 $^\circ\text{C}$)	41
FIGURA 17 Espectro sucessivos da titulação de RMN de ^1H em diferentes equivalentes de $[\text{AVO}]/[\text{P5}_{\text{IMI}}]$ (DMSO-D_6 ; 200 MHz; 25,0 $^\circ\text{C}$)	41
FIGURA 18 Grafico de $\Delta\delta$ vs. $[\text{AVO}]_0/[\text{P5}_{\text{IMI}}]_0$ para o hidrogenio H 1 (DMSO-D_6 ; 200 MHz; 25,0 $^\circ\text{C}$)	42
FIGURA 19 Avaliação da fotoestabilidade do sistema formando pela avobenzona e o P5_{IMI}	42
FIGURA 20 Variação da absorvância em diferentes tempos de irradiação UVA/UVB para o sistema entre avobenzona e P5_{IMI}	43
FIGURA 21 Cromatograma obtido para separação das duas formas de equilíbrio da avobenzona	44
FIGURA 22 Espectro obtido para os picos observados na separação das formas de equilíbrio da avobenzona	45
FIGURA 23 Curva de calibração em 270 nm	46
FIGURA 24 Curva de calibração em 360 nm	46

LISTA DE TABELAS

TABELA	1	Concentração	teste	de	solubilidade	
avobenzona.....						29
TABELA	2	Concentrações	teste	de	solubilidade	
.....						30
TABELA 3		Solubilidade da avobenzona nos solventes testados.				
.....						34
TABELA 4		Solubilidade do P5 _{IMI} nos solventes testados.				34
TABELA 5		Coeficiente de determinação (R ²) obtidos para linearização do gráfico da figura 13				37

LISTA DE ABREVIATURAS

AVO – Avobenzona

OMC – metoxicinamato de octila

AVO(E) – Forma enólica da avobenzona

AVO(K) – Forma dicetona da avobenzona

UV – Ultravioleta

HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodos

VIS-IV – Visível–infravermelho

nm – Nanômetros

P5_{IMI} – imidazol-pilar[5]areno

RESUMO

Este trabalho visou a criação de distintas metodologias através de três diferentes técnicas analíticas: a espectroscopia de UV/Vis, a cromatografia líquida de alta eficiência e a ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o estudo de uma molécula fotoprotetora, na região do UVA, amplamente utilizada na formulação de protetores solares, a avobenzona.

É de suma importância a criação de maneiras de estudar esta molécula, pois ela é bastante fotoinstável e na presença de luz apresenta um equilíbrio ceto-enólico, que reduz a sua proteção, podendo ainda se degradar em moléculas radicais permeáveis na pele.

Através das metodologias implementadas foi possível estudar o equilíbrio da avobenzona na presença de luz, através de espectroscopia. Foi possível concluir que a molécula após ser levada ao sol gera diversos subprodutos e separar as duas moléculas presentes no equilíbrio da avobenzona através de cromatografia líquida de alta eficiência. Os estudos com RMN de ^1H tornaram possível identificar como a avobenzona interage com outras moléculas que podem ser usadas para o aumento da sua fotoestabilidade, no presente trabalho o pilar[5]areno, um macrocíclico pertencente a classe dos pilararenos, que pode, através de um sistema hóspede-hospedeiro proteger a avobenzona da degradação.

Palavras-chave: avobenzona, pilar[5]areno, cromatografia líquida de alta eficiência, RMN de ^1H , espectroscopia de UV/Vis.

1. Introdução

É de conhecimento geral que a alta incidência de raios solares e a sua intensidade pode causar doenças, como o câncer de pele. Esses raios também causam sérias queimaduras na pele humana. Para minimizar esses danos a solução encontrada é o uso de protetores solares.

Protetores solares apresentam filtros solares em sua composição que absorvem e/ou emitem a radiação a fim de proteger a pele. Porém, sabe-se que estes filtros quando expostos a radiação solar não apresentam a estabilidade desejada (se degradam rapidamente) e geram subprodutos prejudiciais que podem ser absorvidos pela pele humana.

Estudos sobre a fotoestabilidade 1-(4-*t*-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)-1,3-propadiona, conhecida como avobenzona, vem há anos sendo feitos a fim de entender como o equilíbrio desta molécula ocorre, quais os subprodutos formados e obter combinações mais fotoestáveis, que não gerem subprodutos tóxicos que podem ser absorvidos pela pele. Para buscar uma solução para esta problemática este trabalho tem o intuito de buscar dados na literatura, estudar a fotoestabilidade da avobenzona e desenvolver metodologias capazes de estudar a fotoestabilidade da avobenzona em diferentes condições.

O trabalho consiste na aplicação de diferentes metodologias para o estudo do equilíbrio e produtos formados na degradação da avobenzona. A primeira metodologia criada foi por espectroscopia de UV-Vis a fim de se entender o equilíbrio da avobenzona após irradiação de luz. A segunda metodologia consiste em estudos através de RMN de ^1H para entender as interações que a avobenzona faz com outros compostos que podem aumentar sua fotoestabilidade. Uma maneira de aumentar a fotoestabilidade da avobenzona é a introdução de macrocíclos, em um sistema hóspede-hospedeiro, como já relatado na literatura o uso da ciclodextrina para esse fim, no caso deste trabalho se utilizou o imidazol-pilar[5]areno, molécula que faz parte de uma nova classe de macrocíclos, os pilararenos. Por fim, a criação de uma metodologia em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de

diodos (HPLC-DAD) para estudo do equilíbrio da avobenzona e seus produtos de degradação.

2. Revisão da literatura

2.1 Radiação solar

O Sol é essencial para a vida terrestre. A energia solar está diretamente relacionada com os processos químicos, físicos e biológicos. A radiação solar é o fluxo de energia emitida pelo sol e transmitida sob a forma de radiação eletromagnética (GOMÉZ et al., 2018)⁵. A mesma pode ser benéfica ou tóxica para a pele humana. Seus efeitos dependem de características individuais da pele exposta, intensidade, frequência e tempo de exposição. Entre os benefícios estão a sensação de bem-estar físico, estímulo à produção de melanina, tratamento de icterícia (cor amarela da pele e do branco dos olhos de bebês, causada pelo excesso de bilirrubina no sangue), entre outros. Porém caso não sejam tomados cuidados em relação ao tempo de exposição solar ela pode trazer malefícios ao organismo (FLOR et al., 2007)¹.

Somos aquecidos pelos raios solares e capazes de vê-los através da porção visível do espectro da luz solar (400 a 760 nm). A exposição a luz solar é um problema crescente no mundo, pois ela pode causar queimaduras, envelhecimento precoce e câncer de pele. A radiação UV danifica o DNA e o material genético, oxida lipídeos e produz radicais livres perigosos, causa inflamação, rompe a comunicação celular e modifica a expressão dos genes em resposta ao stress (DE ARAUJO et al., 2008)³. Para reduzir os efeitos negativos que ela pode causar na pele se faz necessário o uso de protetores solares para a proteção das radiações ultravioleta, que podem ser divididas em UVA, UVB e UVC (JUCHEM et al., 1998)².

A radiação UVA se dá entre 320 a 400 nm; frequentemente, ela causa vermelhidão na pele. São radiações que penetram fortemente na pele, atingindo a derme (DE ARAUJO et al., 2008)³. Ela induz a pigmentação da pele promovendo bronzeamento por meio do escurecimento da melanina pela fotoxidação da leuco melanina, localizada nas camadas externas da epiderme. Pode agir de maneira indireta formando os radicais livres e dependendo do tipo de pele, do tempo, frequência e intensidade da exposição induz o câncer de pele. É a radiação mais abundante na superfície terrestre (FLOR et al., 2007)¹.

A radiação UVB se dá entre 280 a 320 nm; ela possui alta energia e, com isso, grande frequência, ocasionando queimaduras solares. Tem um menor poder de penetração na pele, sendo intensamente absorvida pela epiderme (DE ARAUJO et al., 2008)³. É responsável pela transformação do ergosterol epidérmico em vitamina D, e causa envelhecimento precoce. A exposição frequente e intensa à radiação UVB pode causar lesões no DNA, além de suprimir a resposta imunológica da pele. Desta forma, além de aumentar o risco de mutações letais, manifestado sob a forma de câncer de pele, sua atividade reduz a chance de uma célula maligna ser reconhecida e destruída pelo organismo (FLOR et al., 2007)¹.

A radiação UVC se dá entre 100 a 280 nm, ela é conhecida como região germicida ou bactericida. Devida ao menor comprimento de onda, possui uma alta energia, sendo assim altamente prejudicial ao homem, com efeitos carcinogênicos e mutagênicos (DE ARAUJO et al., 2008)³. Esta radiação é absorvida em grande parte pela camada de ozônio, não chegando à superfície da terra (SILVA et al., 2015)⁴.

2.2 Protetores solares

Os protetores solares têm como objetivo principal formar uma barreira físico-química para proteger a pele das radiações solares. Eles reduzem a quantidade de radiação UV absorvida pela pele humana, por absorção e/ou reflexão desta radiação, servindo como uma barreira protetora (DE ARAUJO et al., 2008)³.

A eficiência dos protetores solares depende da sua capacidade de absorção da energia radiante, que é proporcional a sua concentração, intervalo de absorção e comprimento de onda onde ocorre a máxima absorção. Para aumentar o espectro em que o protetor solar protege, uma boa estratégia é a associação de diferentes filtros, que protegem das radiações UVA e UVB. Outras características que o protetor deve ter para apresentar grande eficiência é ser estável na pele humana e ao calor, e ser fotoestável, sob a luz solar, para garantir mais horas de proteção. Além disso eles não podem ser irritantes, sensibilizantes ou fototóxicos (FLOR et al., 2007)¹.

Na preparação de um protetor solar dois ingredientes são essenciais: os ingredientes ativos (filtros orgânicos e/ou inorgânicos) e os veículos, como: loções hidroalcoólicas, cremes, loções emulsionadas e géis (SILVA et al., 2015)⁴.

Os ativos, que podem ser divididos em orgânicos e inorgânicos são classificados rotineiramente respectivamente como: filtros de efeitos químicos (filtros químicos ou orgânicos) e filtros de efeitos físicos (filtros físicos ou inorgânicos). (FLOR et al., 2007)¹.

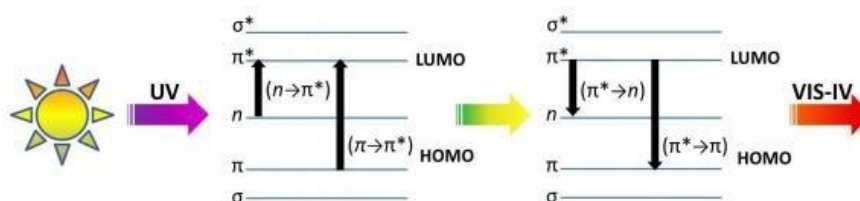
2.2.1 Filtros inorgânicos

Os processos de proteção dos filtros inorgânicos envolvem tanto a absorção como o espalhamento de luz de radiação, não apresentando especificidade quanto às radiações UVA e UVB. Os protetores inorgânicos agem como uma barreira física que não permite a passagem da radiação (DE ARAUJO et al., 2008)³. Eles apresentam a forma mais segura e eficaz de proteção a pele, pois apresentam um baixo potencial de irritação, sendo recomendado na preparação de fotoprotetores para crianças e pessoas com pele sensível. Os filtros inorgânicos mais utilizados são o óxido de zinco e o dióxido de titânio, estes são materiais semicondutores, seu mecanismo de absorção e de desativação envolvem transições entre bandas de valência e de condução de sólido (FLOR et al., 2007)¹.

2.2.2 Filtros orgânicos

De maneira geral os filtros orgânicos agem através da absorção de faixas de comprimentos de onda específicas. Estas moléculas são geralmente compostos aromáticos com grupos carboxílicos, apresentando na maioria das vezes um grupo doador de elétrons, na posição orto ou para do anel aromático (SILVA et al., 2015)⁴. Ao absorver radiação UV, os elétrons que estão no orbital π HOMO são excitados para o π^* LUMO e ao retornarem ao orbital π , o excesso de energia é liberado na forma de calor (Figura 1). As benzofenonas e as avobenzonas são filtros orgânicos que protegem somente em UVA, já salicilatos e cinamatos agem exclusivamente na proteção da radiação UVB (NASCIMENTO et al., 2014)⁶.

Figura 1. Transição eletrônica das radiação UV e conversão VIS-IV pelos fotoprotetores orgânicos.



Fonte: NASCIMENTO et al. 2014⁶.

Uma problemática bastante atual ligada aos filtros orgânicos é a sua penetração na pele, podendo chegar à corrente sanguínea. Desde 2001 diversos estudos evidenciaram a presença de filtros solares orgânicos na circulação sanguínea, sendo encontrado em amostras de sangue, urina e leite após a sua determinação cutânea (PRADO et al., 2016)¹⁹. Recentemente, Katta et al. (2019)²⁸ realizaram estudos que comprovaram a presença de filtros orgânicos na corrente sanguínea. Neste estudo 24 pessoas foram divididas em grupos que recebiam a cada quatro dias filtros com composições diferentes, tendo que ser passados quatro vezes durante o dia. Ao final dos estudos foram analisadas amostras sanguíneas dos participantes, comprovando a presença de filtros na corrente sanguínea. Desta maneira o estudo de novas tecnologias para evitar a permeação em pele destes compostos é bastante relevante, tendo em vista que não se sabe os efeitos destes compostos no organismo.

2.3 Estabilidade de protetores solares

Um dos principais fatores que ditam a eficácia de protetores solares é sua fotoestabilidade, que é a capacidade que o produto tem de permanecer na pele por grande tempo sem degradar na presença de luz solar (CRUZ et al., 2005)⁷. As moléculas quando excitadas através da absorção da radiação UV voltam ao estado fundamental por diferentes mecanismos de decaimento radiativos e não-radiativos. Alguns destes mecanismos podem afetar a sua atividade, levando à formação de novos compostos por reações de fotoadição, substituição, cicloadição, isomerização e fotofragmentações. Estes novos compostos podem ser inativados (não absorver a

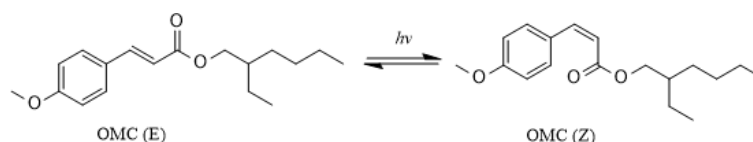
radiação UV) ou podem favorecer a degradação de biocomponentes na pele pela fotossensibilização, o que pode ser perigoso para a pele humana (VALLEJO et al., 2010)⁸.

É possível também que os filtros exibam alguma ação fototóxica, como é o caso do TiO₂, que quando fotoativado pela radiação UV gera radicais hidroxilas que são altamente oxidantes (PARIS et al., 2009)¹⁰. Dessa maneira, o estudo da fotoestabilização de moléculas usadas na formulação de filtros químicos é de grande importância (VALLEJO et al., 2011)⁸. A fotoestabilidade dos filtros solares é dependente de diversos fatores, dentre eles: o solvente em que ele é preparado e a combinação de filtros usada (KOCKLER et al., 2012)⁹.

Na maioria dos protetores solares, pelo menos dois filtros de proteção UV são utilizados na formulação: um que protege da radiação UVA e outro que protege da radiação UVB. Uma combinação de filtros utilizada nas formulações de protetores solares é a 1-(4-*t*-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)-1,3-propadiona, conhecida como avobenzona (AVO) e o metoxicinamato de octila (OMC) (LHIAUBET-VALLET et al., 2010)¹¹.

O OMC é um filtro que protege da radiação UVB. Estudos mostraram que quando exposto à luz solar este filtro muda de *p*-metoxi-*trans*-cinamato de octila (E-OMC) para *p*-metoxi-*cis*-cinamato de octila (Z-OMC) (Figura 2). Da mesma forma, o espectro de absorção dele mostrou que ele também pode ser afetado pelos solventes (PATTANAARGSON et al., 2004)¹².

Figura 2. Isomerização OMC.

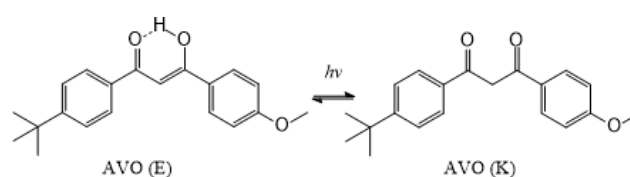


Fonte: próprio autor

A avobenzona é um dos filtros solares orgânicos mais utilizados na proteção de radiação UVA. Ela pode absorver a radiação UVA devido a sua estrutura altamente

conjugada. A avobenzona em contato com a radiação solar apresenta um equilíbrio ceto-enólico, mostrado na figura 3. A fotoestabilidade da avobenzona em diferentes solventes tem sido fonte de estudos e foi descoberto que ela é altamente dependente da polaridade e se o solvente é prótico ou aprótico (VALLEJO et al., 2011)⁸. Reações fotoalérgicas e citotóxicas tem sido associadas a avobenzona devido aos seus produtos de fotodegradação, tais como aril glicóis e benzilas (AFONSO et al., 2014)¹⁴.

Figura 3. Equilíbrio ceto(K)-enólico(E) da avobenzona.



Fonte: próprio autor

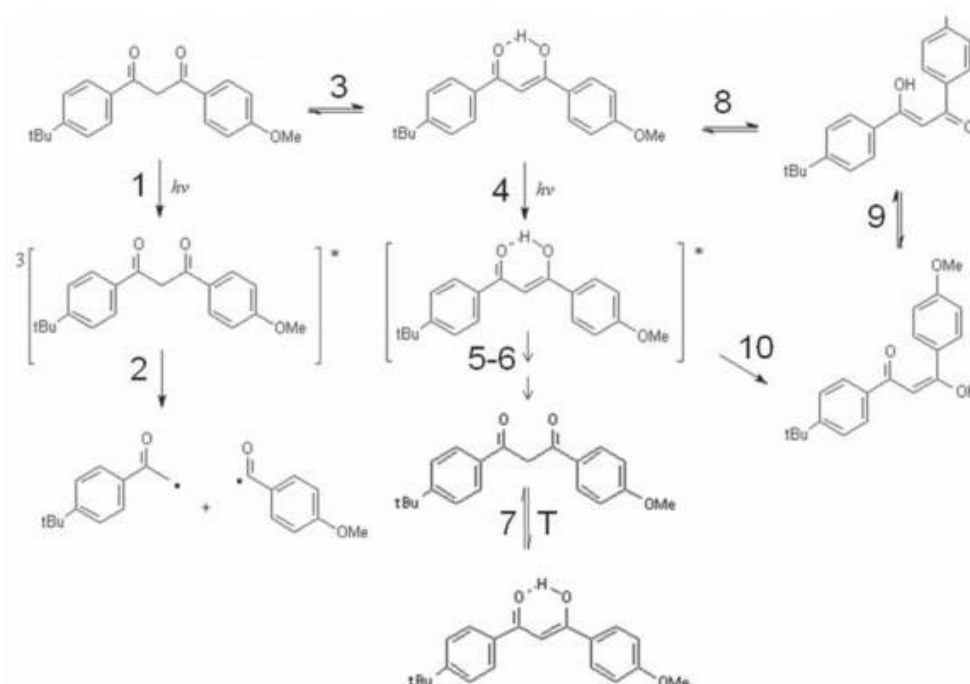
A combinação faz com que o protetor solar proteja em uma região maior do espectro, porém a fotoestabilidade das moléculas pode diminuir, fazendo com que elas se degradem mais rápido quando combinadas. A inativação fotoquímica da combinação AVO-OMC é um fator limitante para a formulação de produtos de proteção solar fotoestáveis de amplo espectro (protegem de UVA e UVB) (SCALIA et al., 2010)¹³.

Estudos fotoquímicos desta mistura que mostraram que além das fotorreações unimoleculares dos componentes isolados (isomerização e fragmentação), podem ocorrer outras reações que levam a diferentes produtos. Dessa maneira entende-se que as interações filtro-filtro nem sempre irão resultar em um aumento na fotoestabilidade dos filtros solares (LHIAUBET-VALLET et al., 2010)¹². Por isso, muitos estudos estão sendo realizados acerca da fotoestabilidade da avobenzona em diversas condições, a fim de encontrar uma combinação que torne mais estável sua estrutura química.

2.4 Fotoestabilidade da Avobenzona

Como já citado anteriormente a avobenzona é o filtro UVA mais utilizado comercialmente, porém seu uso apresenta algumas desvantagens, pois na presença de luz ela apresenta um equilíbrio ceto-enólico (Figura 3) e a sua forma dicetona é passível de degradação, podendo formar produtos radicais que podem penetrar na pele (Figura 4) (GOVINDU et al. 2019²⁰; VALEJO et al. 2011⁸).

Figura 4. Diferentes caminhos envolvidos no decaimento da AVO.

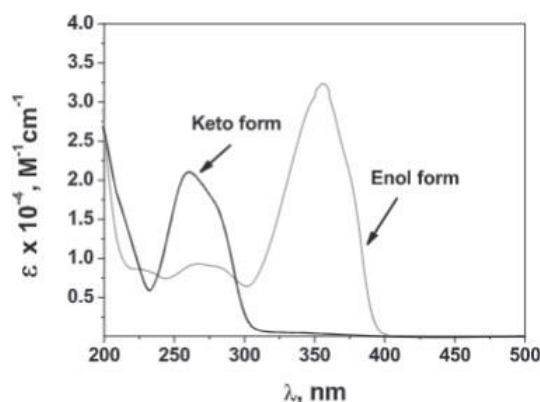


Fonte: VALLEJO et al. 2011⁸.

As formas cetona e enol absorvem em comprimentos de onda diferente do espectro de absorção (Figura 5). A forma cetona tem uma absorção máxima em 260 nm e devido à presença de um hidrogênio ácido entre as duas carbonilas é menos estável e pode reagir gerando uma forma triplete da avobenzona (Reação 1, Figura 4) e em seguida produtos radicais. A forma enólica, tem uma absorção máxima em 355 nm e é a forma mais estável da avobenzona, devida sua estrutura altamente conjugada, sendo de maior interesse para a proteção que esta forma permaneça

(PARIS et al., 2009)¹⁰. Por esses motivos nos últimos anos tem sido realizados muitos estudos procurando maneiras de favorecer a forma enólica deste composto.

Figura 5. Espectro de absorção da AVO em acetonitrila.



Fonte: PARIS et al. 2009¹⁰.

2.4.1 Fotoestabilidade da avobenzona em diferentes condições

Diversas condições foram testadas experimentalmente a fim de aumentar a fotoestabilidade da avobenzona, como mistura de filtros, diferentes solventes, adição de compostos nas formulações.

LHIAUBET-VALLET et al. (2010)¹¹, estudaram a fotodegradação da avobenzona com diferentes filtros de proteção UVB. Para avaliar a fotodegradação, as amostras foram levadas a radiação, e a fotodegradação foi avaliada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para determinar cada componente na mistura. De maneira geral, para os filtros avaliados, a fotodegradação da avobenzona decaiu com a combinação. A partir dos resultados obtidos foi criada uma metodologia sistemática, representada no esquema 1, para entender a fotoestabilidade dos protetores solares.

Esquema 1 - Diferentes processos envolvidos na fotoestabilidade de filtros UV.

1. $AVO(E) + h\nu \rightarrow AVO(K)$
2. $AVO(K) + h\nu \rightarrow {}^3AVO(K)$

3. ${}^3\text{AVO}(\text{K}) \rightarrow \text{Produtos}$
4. ${}^3\text{AVO}(\text{K}) + \text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2$
5. $\text{AVO}(\text{E}) + {}^1\text{O}_2 \rightarrow \text{Produtos}$
6. ${}^3\text{AVO}(\text{K}) + \text{Filtro} \rightarrow \text{AVO}(\text{K}) + {}^3\text{Filtro}$
7. ${}^3\text{Filtro} \rightarrow \text{Produtos}$
8. $\text{Filtro} + {}^1\text{O}_2 \rightarrow \text{Quenching}$
9. $\text{Filtro} + {}^1\text{O}_2 \rightarrow \text{Produtos}$

Fonte: adaptado de LHIAUBET-VALLET et al., 2010¹¹.

A avobenzona em seu estado fundamental apresenta um equilíbrio ceto enólico, onde a forma enólica AVO(E) é predominante. Após a radiação o equilíbrio é deslocado para a formação do isômero β -dicetona AVO(K). Este tautômero então absorve luz gera uma forma tripleto ${}^3\text{AVO}(\text{K})$, este estado é o responsável pela maior parte dos efeitos nocivos da AVO. Esta forma ainda reage com o oxigênio molecular formando oxigênio singleto, que reage com a forma AVO enólica, formando produtos oxigenados radicalares. A ideia do autor Lhiaubet-Vallet (2010)¹¹ consiste na adição de um filtro sacrifício na mistura, que preveniria a formação da ${}^3\text{AVO}(\text{K})$ e, dessa maneira, não ocorresse a formação de subprodutos tóxicos oriundos da degradação.

Uma estratégia usada para a redução da instabilidade em luz solar da AVO é baseada na adição de agentes fotoestabilizadores. Estas substâncias têm como objetivo agir extinguindo os estados tripletos em filtros solares, e na prevenção ou redução dos danos dos radicais livres e oxigênios singletes. No entanto, os efeitos destas substâncias são reduzidos quando há a combinação dos filtros AVO-OMC. (SCALIA et al., 2010)¹³.

Uma alternativa à fotoinstabilidade deste composto é a adição de antioxidantes nas formulações de protetores solares. Afonso et al. (2014)¹⁴ realizaram estudos da degradação da AVO em presença dos antioxidantes vitamina C, vitamina E e ubiquinona e obtiveram resultados por espectroscopia de UV-Vis. Os resultados mostraram que os antioxidantes podem melhorar a fotoestabilidade da AVO, porém apenas em certas concentrações. Dessa maneira o uso de antioxidantes é uma

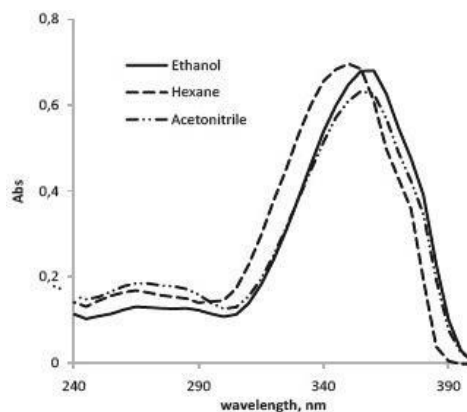
maneira viável de melhorar a estabilidade dos filtros químicos e reduzir danos à pele causados pelos raios UV.

Um excelente antioxidante que pode auxiliar na estabilização de protetores solares é o flavonoide quercetina. Scalia et al. (2010)¹³ relataram que a adição de baixas concentrações de quercetina à formulação de protetores solares é uma maneira simples e eficaz de aumentar a fotoestabilidade da mistura de filtros AVO-OMC. Além de melhorar a ação protetora da mistura, desativando os radicais gerados pela exposição à radiação.

Outro composto que pode ajudar na estabilidade da avobenzona é a glutathione. Govindu et al. (2019)²⁰ estudaram o seu efeito através de espectroscopia UV e HPLC apresentando resultados bastante promissores, já que a glutathione pode apresentar um caráter duplo na formulação de protetores solares: ser uma fotoestabilizadora da avobenzona e um agente clareador de pele.

Como já citado anteriormente, outro fator que pode alterar a estabilidade da avobenzona é o solvente. Vallejo et al. (2011)⁸ estudaram a fotoestabilidade da avobenzona em diferentes solventes analíticos e usados na formulação de cosméticos. Os estudos concluíram que a fotoestabilização em solventes é dependente de diversos fatores como: estrutura, viscosidade e a capacidade de absorção de radiação UVA. Inicialmente os solventes testados foram etanol, hexano e acetonitrila, o espectro de absorção (figura 6) mostrou um deslocamento batocrômico para o comprimento de onda máximo à medida que a polaridade do solvente aumenta, o que confirma a transição $\pi-\pi^*$ característica de moléculas tipo enona. Este deslocamento ocorre devido às interações dipolo-dipolo entre a forma enol excitada e o solvente (figura 7). Dessa forma, espera-se que as interações sejam mais fortes com os solventes acetonitrila e etanol.

Figura 6. Espectro UV AVO em solventes analíticos



Fonte: Vallejo et al. (2011)⁸

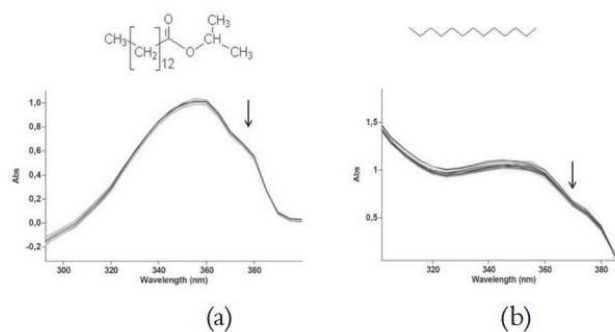
Figura 7. Formação de ligações intermoleculares de hidrogênio entre AVO(E) e solventes polares.



Fonte: Vallejo et al. (2011)⁸

Vallejo et al. (2011)⁸ também estudaram o equilíbrio da AVO com irradiação nos solventes. Os resultados mostraram que solventes polares causam uma menor e mais lenta diminuição na absorvância, ou seja, a avobenzona é mais fotoestável em solventes polares. Para os estudos em solventes cosméticos, os solventes que apresentaram diminuição mais lenta na absorção foram o óleo mineral e o miristato isopropílico (figura 8). A grande estabilidade da AVO nestes solventes não era esperada devida sua natureza química, dessa forma não é possível explicar este comportamento. Provavelmente as impurezas e viscosidade podem estar relacionadas com o aumento da fotoestabilidade.

Figura 8. Espectro de absorção de AVO em miristato isopropílico (a) e óleo mineral (b)



Fonte: Vallejo et al. (2011)⁸

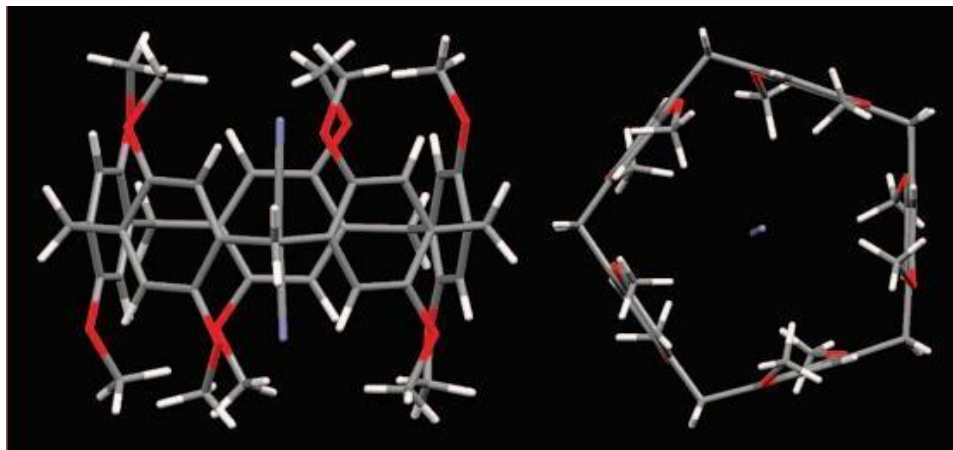
Uma forma de proteger moléculas fotoinstáveis é a introdução de um sistema hópede-hospedeiro, através de moléculas macrocíclicas como éteres de coroa, calixarenos e pilararenos. Yuan et al. (2019)²⁴ testaram um sistema hópede-hospedeiro (2-hidroxil)propil- β -ciclodextrina, os estudos comprovaram que o macrocíclo pode além de aumentar a fotoestabilidade do filtro, é capaz de aumentar sua solubilidade em água.

Uma nova classe de moléculas macrocíclicas bastante promissora para incorporações de sistemas hópede-hospedeiro são os pilararenos.

2.5 Pilarareno (sistema hópede-hospedeiro)

Os pilararenos (figura 9), como descrito por Tokomi Ogosh (2008)¹⁵, constituem uma nova classe das moléculas macrocíclicas. Eles são formados a partir de unidades de hidroquinona ligadas por um metileno na posição *para* (XUE et al., 2012)¹⁶. Estas moléculas apresentam certa vantagem quando comparadas a outros macrociclos como por exemplo, éteres de coroa e calixarenos, graças a sua grande simetria e rigidez, que resultam em uma maior seletividade na complexação de moléculas hópede. Outras vantagens dos pilararenos comparados a outros hospedeiros é a sua fácil funcionalização com diferentes substituintes do anel benzênico, o que permite o ajuste das suas propriedades de ligação hópede-hospedeiro. (OGOSH et al., 2008)¹⁵ e a sua solubilidade em água e em solventes orgânicos.

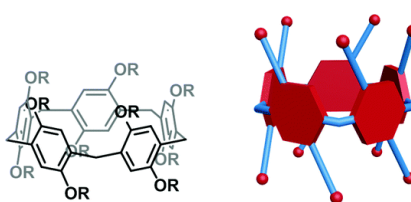
Figura 9. Estrutura do pilar[5]areno.



Fonte: XUE et al., 2012¹⁶.

Estes macrociclos apresentam uma estrutura denominada por Ogosh como “cesta de basquete” (figura 10) por causa da sua organização (OGOSH et al., 2010)¹⁷. Devido a sua estrutura são hábeis para o recebimento de moléculas menores, tendo como principal função o encapsulamento destas moléculas, assim formando um bom sistema hóspede-hospedeiro (NISHIMURA et al., 2013)¹⁸.

Figura 10. Estrutura “cesta de basquete” presente nos pilararenos.



Fonte: CHEN et al. 2019²².

2.6 Metodologias para estudo da fotoestabilidade da avobenzona

Para melhor entendimento de como a avobenzona, seu equilíbrio e sua interação com outras moléculas ocorrem é de suma importância a criação de metodologias analíticas capazes disso. Dentre as diversas técnicas disponíveis duas

se destacam: a ressonância magnética nuclear de ^1H (RMND de ^1H) que é capaz de determinar como a avobenzona interage com outras moléculas e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que é capaz de separar as duas formas de equilíbrio da avobenzona e seus subprodutos.

2.6.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

O RMN de ^1H é uma técnica espectroscópica onde o sinal de ressonância é diretamente proporcional ao número de núcleos ressonantes, no caso, número de hidrogênios (PINTO, 2014)²⁵. Desta forma ela pode ser utilizada para determinar como a avobenzona, substância em estudo, interage com outras moléculas através de uma titulação. A avobenzona pode ser titulada na solução contendo a molécula com que vai interagir e a variação dos sinais dos hidrogênios presentes identifica como e por qual local as duas moléculas interagem.

2.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O HPLC é uma técnica cromatográfica, ou seja, é um método de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, uma móvel e uma estacionária (COLLINS et al. 2007)²⁶. Desta forma é uma técnica que pode ser utilizada no estudo do equilíbrio e degradação da avobenzona, pois através dela pode-se separar as duas formas de equilíbrio da avobenzona e os produtos radicais formados pela degradação.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

O presente projeto visa estudar a fotoestabilidade do filtro químico UVA amplamente utilizado na formulação de protetores solares, a avobenzona, frente a luz emitida por uma fonte UVA/UVB. O objetivo principal é a criação de metodologias para estudar a fotoestabilidade de um filtro químico por diferentes técnicas, sendo elas: espectroscopia de UV-Vis, RMN de ^1H e HPLC-DAD.

3.2 Objetivos específicos

Os estudos a serem realizados apresentam os seguintes objetivos específicos:

- (i) Testar a solubilidade da avobenzona em DMSO, ésteres de ácidos graxos e nanoemulsão
- (ii) Testar a solubilidade do P5_{IMI} em DMSO, ésteres de ácidos graxos e nanoemulsão
- (iii) Testar a fotoestabilidade da avobenzona em DMSO através de espectroscopia UV/Vis
- (iv) Testar a fotoestabilidade do P5_{IMI} em DMSO através de espectroscopia UV/Vis
- (v) Promover um sistema hóspede-hospedeiro a partir da complexação do avobenzona e o P5_{IMI}. Analisar o sistema formado por RMN de ^1H
- (vi) Testar a fotoestabilidade do sistema formado através de espectroscopia UV/Vis
- (vii) Criar uma metodologia em HPLC-DAD para determinação de das duas formas de equilíbrio da avobenzona e seus possíveis subprodutos

4. Materiais e métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Os reagentes cosméticos utilizados avobenzona, nanocare®, bioesteroil de amêndoa, éster de amêndoa e tribocare® foram cedidos por uma empresa do setor privado.

O DMSO usado foi de grau P.A. da marca Vetec.

O P5_{IMI} foi sintetizado pela doutora Lizandra.

4.1.2 Equipamentos

O HPLC usado foi modelo Agilent 1200 series, com detector de arranjo de diodos UV-Vis. Os comprimentos de onda monitorados foram 260 nm e 370 nm. A coluna e pré-coluna utilizadas foram Synergi Polar RP, com dimensões de 2,1 x 150 mm e tamanho de partícula de 4 µm.

Os espectros de RMN de ¹H foram realizados em um espectrômetro Bruker AC 200 MHz.

As medidas de absorvância foram feitas em um espectrofotômetro UV/Vis modelo Varian Cary 50 – Agilent. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200 a 800 nm. A cubeta utilizada foi de quartzo, com caminho óptico de 1 cm.

4.2 Métodos

4.2.1 Teste de solubilidade avobenzona

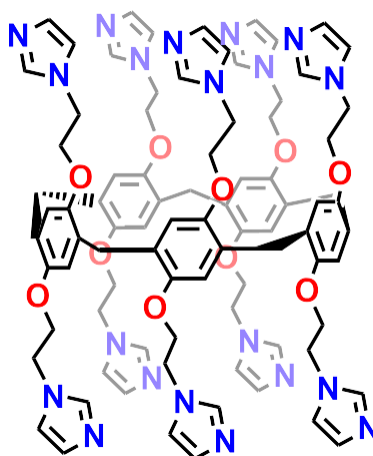
A solubilidade da avobenzona foi testada em diferentes solventes. Para isso pesou-se cerca de 5 g do filtro solar e 5 g dos solventes: nanoemulsão, DMSO, bioesteroil de amêndoa e tribocare®. As misturas foram colocadas em tubos de ensaio e mantidas sob agitação. As misturas que não foram solúveis apenas sob agitação foram levadas a aquecimento em 115°C. A tabela 1 mostra a concentração de cada mistura.

Quadro 1. Concentração teste de solubilidade avobenzona

Mistura	Massa filtro (g)	Massa solvente (g)	% (m/m)
AVO:nanocare®	0,5023	4,70	9,65
AVO:DMSO	0,5063	5,52	8,40
AVO:tribocare®	0,5052	4,89	9,40
AVO:éster de amêndoa	0,0108	5	0,216

4.2.2 Teste de solubilidade imidazol-Pilar[5]areno

A solubilidade do P5_{IMI} (Figura 11) foi testada em diferentes solventes. Os solventes utilizados foram: nanocare®, DMSO, tribocare® e bioesteroil de amêndoa®. As misturas foram colocadas em tubos de ensaio e mantidas sob agitação. A tabela 2 mostra a concentração de cada mistura.

Figura 11. Estrutura molecular do P5_{IMI}.

Quadro 2. Concentrações teste de solubilidade P5_{IMI}.

Combinação	P5_{IMI} (mg)	Solvente (mL)	P5_{IMI} (m/v)
P5 _{IMI} :nanocare®	100,2	2	5,01
P5 _{IMI} :DMSO	98,8	1	9,88
P5 _{IMI} :tribocare®	100,8	2	5,04
P5 _{IMI} :bioesteroil de amêndoa®	50	2	2,5

4.2.3 Avaliação da fotoestabilidade da avobenzona por espectroscopia UV-Vis

A partir de uma solução estoque 3,38 mM de avobenzona em DMSO se preparou 50 mL de uma solução 0,01 mM de avobenzona a fim de fazer um teste de fotoestabilidade.

A solução foi levada a uma placa de pétri e colocada em uma caixa contendo uma lâmpada UVA/UVB (280-320nm) por 3 horas e 24 minutos, tempo no qual a absorvância parou de variar. Alíquotas da solução foram retidas em diferentes tempos. As alíquotas retiradas foram em seguida lidas no espectrofotômetro. Como branco se utilizou DMSO. As leituras foram feitas na faixa de comprimento de onda 200-800 nm. Os dados foram plotados no *software Origin*.

4.2.4 Avaliação da fotoestabilidade do imidazol-pilar[5]areno por espectroscopia UV-Vis

A fotestabilidade do P5_{IMI} foi determinada a partir de uma solução estoque 20 ppm de P5_{IMI}:DMSO colocada em uma placa de pétri e levada a uma luz UVA/UVB (280-320 nm) por 1h. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro de UV-Vis nos tempos zero e 1h na faixa de comprimento de onda 200-800 nm. Como branco se utilizou DMSO. Os dados foram plotados no *software Origin*.

4.2.5 Promoção do sistema hóspede-hospedeiro entre o imidazol-pilar[5]areno e a avobenzona

Para a promoção do sistema entre o P5_{IMI} e a avobenzona foi utilizada titulação de RMN de ¹H. A titulação de RMN de ¹H foi realizada num espectrômetro Bruker AC 200 MHz. Para a titulação, no tubo de RMN contendo o P5_{IMI} (11,71 mmol·L⁻¹ em DMSO-D₆) e TMS⁺ como referência, foram adicionadas alíquotas de uma solução da avobenzona (90,0 mmol·L⁻¹ em DMSO-D₆) e, após total solubilização, o espectro foi adquirido.

4.2.6 Avaliação da fotoestabilidade do sistema entre o imidazol-pilar[5]areno e a avobenzona

A partir de uma solução estoque 0,254 mM de P5_{IMI} e 3,38 mM de avobenzona se preparou uma solução contendo 1,42x10⁻³ mM de P5_{IMI} e 5,15x10⁻³ mM de avobenzona, essa mistura foi colocada em uma placa de petri e levada a uma luz UVA/UVB (280-320 nm) por 2h e 38 minutos, retirando alíquotas em diferentes tempos. As leituras foram feitas na faixa de comprimento de onda 200-800 nm. Os dados foram plotados no *software Origin*.

4.2.7 Desenvolvimento de um método em HPLC-DAD para determinação e quantificação das duas espécies presente no equilíbrio da avobenzona

As análises para determinação das duas formas da avobenzona foram feitas usando um equipamento modelo HPLC Agilent 1200 series, com detector de arranjo de diodos UV-Vis, foi analisado nos comprimentos de onda 260 nm e 370 nm. O comprimento de onda 260 nm foi escolhido pois nele é possível ver as duas formas da avobenzona e o padrão interno utilizado. O comprimento de onda 370 nm foi utilizado pois é próximo da máxima absorção da AVO(E). A coluna e pré-coluna utilizadas foram Synergi Polar RP, com dimensões de 2,1 x 150 mm e tamanho de partícula de 4 µm. Como fase móvel foi utilizada 62% de uma solução 95ACN:H₂O e 38% de uma solução HCOOH pH 3,0 (0,1% NH₄OH 1,54 mM + 31,59 mmol·L⁻¹ HCOONH₄) com eluição isocrática. O volume de injeção foi de 5 µL. Como padrão interno foi utilizada uma solução 10 ppm de butilparabeno. Os dados foram tratados utilizando o *software Chemstation* e plotados no programa *excel*.

4.2.8 Parâmetros de mérito

4.2.8.1 Linearidade

Para a verificação da linearidade foi construída de uma curva de calibração externa utilizando soluções de 5, 10, 20, 40, 60 e 80 ppm AVO:DMSO, todas contendo 10 ppm do padrão interno. Os parâmetros das curvas de calibração foram obtidos através de regressão linear. Os comprimentos de onda monitorados foram 260 e 370 nm.

4.2.8.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados baseados nos parâmetros da curva analítica, sendo:

Equação 1. Limite de detecção

$$LD = 3,3 \times \frac{S}{S}$$

Equação 2. Limite de quantificação

$$LQ = 10 \times \frac{S}{S}$$

Fonte: Ribani, et al. 2004²⁹

onde: s é a estimativa do desvio da equação da linha de regressão e S é a inclinação da curva analítica.

4.2.8.3 Precisão

A precisão foi avaliada a partir da leitura de cinco vezes de uma amostra contendo 40 ppm de avobenzona e 10 ppm do padrão interno, pela estimativa do desvio padrão absoluto da área do pico (s).

4.2.9 Segurança no laboratório

Para garantir a segurança ao longo dos experimentos o laboratório conta com capelas, luvas, máscaras e óculos de proteção, além do uso obrigatório de jaleco para a realização dos experimentos.

Os resíduos líquidos e sólidos, foram previamente tratados quando necessário. Em seguida, todo resíduo gerado foi descartado no sistema de resíduos líquidos e sólidos presente no laboratório.

5. Resultados e discussão

5.1 Teste de solubilidade avobenzona

A solubilidade da avobenzona foi testada em diversos solventes para encontrar a melhor condição para realização dos experimentos posteriores. A tabela 3 mostra os resultados obtidos.

Tabela 3. Solubilidade da avobenzona nos solventes testados.

Mistura	Solubilidade
AVO:tribocare®	Insolúvel
AVO:DMSO	Solúvel
AVO:nanocare®	Insolúvel
AVO:bioesteroil de amêndoa®	Solúvel

Observa-se que avobenzona não apresenta solubilidade em tribocare® e nanocare® devida a grande quantidade de água presente nos solventes, sendo a avobenzona insolúvel. Dessa forma o solvente escolhido para realização dos ensaios foi o DMSO.

5.2 Teste de solubilidade imidazol-pilar[5]areno

A solubilidade do P5_{IMI} foi testada a fim de encontrar um solvente que o solubilize em comum com a avobenzona. Os resultados estão expressos na tabela 4.

Tabela 4. Solubilidade do P5_{IMI} nos solventes testados.

Mistura	Solubilidade
P5 _{IMI} :nanocare®	Solúvel

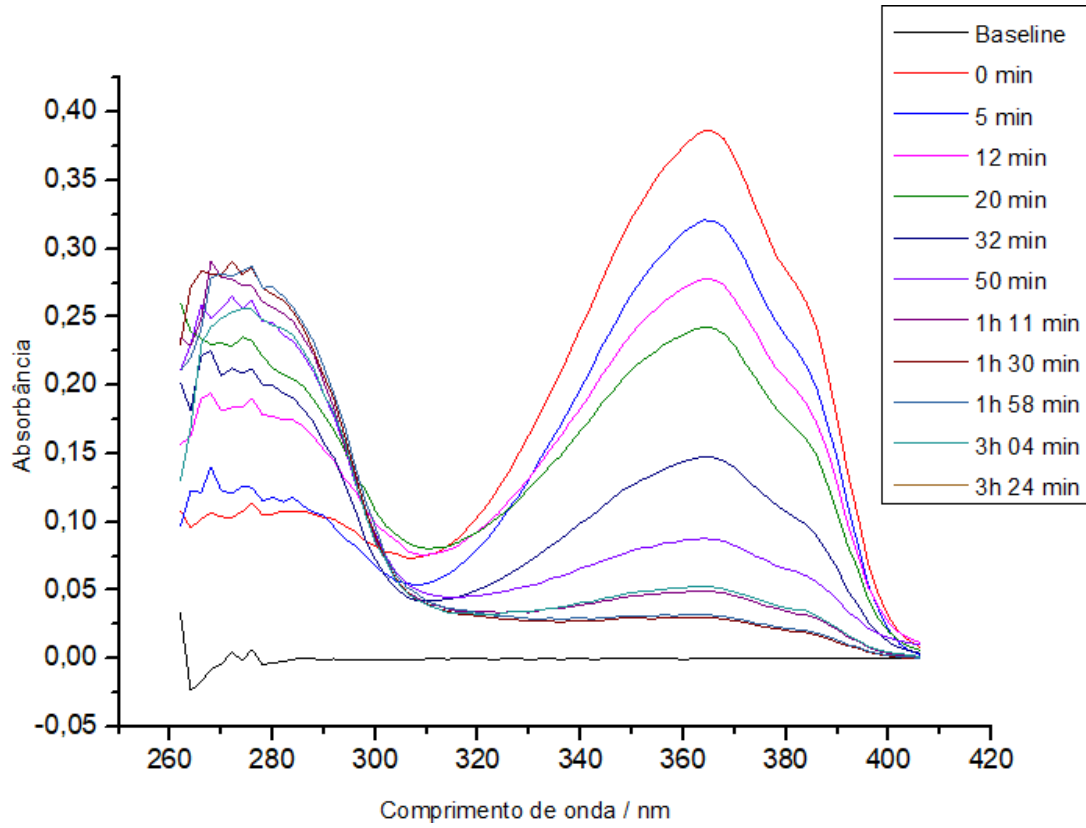
P5 _{IMI} :DMSO	Solúvel
P5 _{IMI} :tribocare®	Insolúvel
P5 _{IMI} :bioesteroil de amêndoa®	Solúvel

Avaliando a solubilidade do P5_{IMI} escolheu-se o DMSO como solvente para realização dos experimentos.

5.3 Avaliação da fotoestabilidade da avobenzona por espectroscopia de UV-Vis

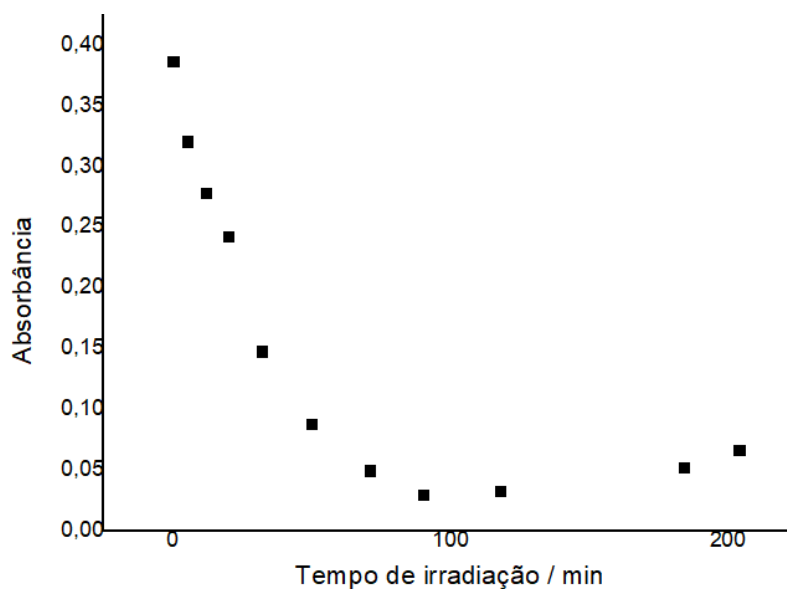
A figura 12 mostra o espectro de absorção para as alíquotas de avobenzona irradiadas por luz UV por diferentes tempos. De maneira geral, é possível concluir que quanto mais tempo a molécula fica exposta a luz, mais o equilíbrio se desloca para a formação da avobenzona na forma dicetona, que tem absorção máxima em 270 nm. Observa-se que o pico em 360 nm (forma enol) diminui, enquanto o pico em 270 nm (forma dicetona) aumenta. O que condiz com o relatado na literatura.

Figura 12. Variação da absorção da avobenzona após irradiação de luz UVA/UVB.



Através da absorbância obtida em cada tempo no comprimento de onda máxima absorção (em 363 nm) é possível plotar um gráfico que relaciona absorbância e o tempo de irradiação e avaliar o equilíbrio. A Figura 13 mostra o gráfico obtido.

Figura 13. Variação dos dados de absorbância em função de diferentes tempos de irradiação UVA/UVB.



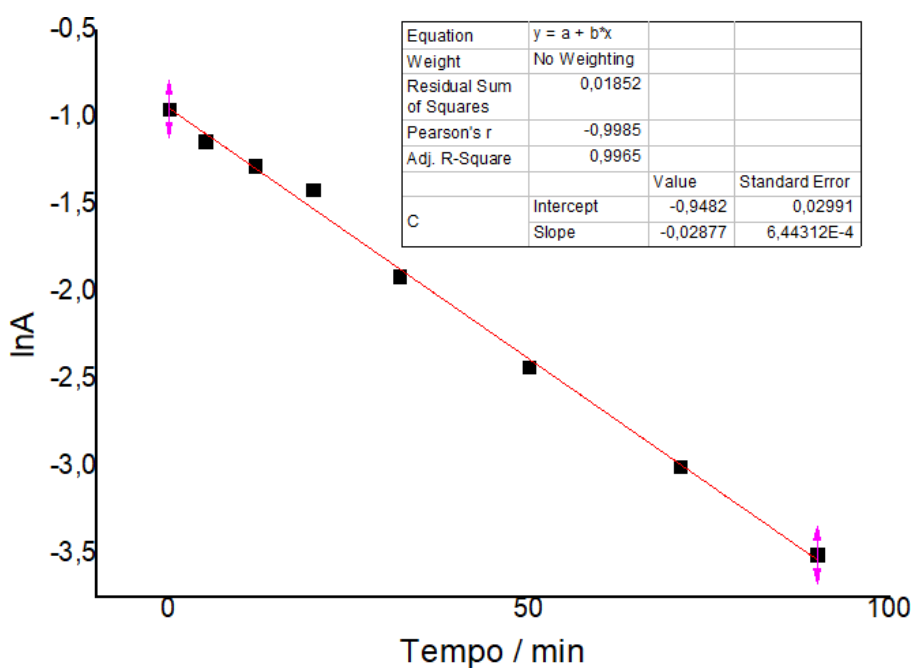
Observa-se que a absorbância após os 80 primeiros minutos apresenta uma menor variação, assim, pode-se fazer a cinética do equilíbrio da avobenzona. A tabela 3 mostra os coeficientes de determinação obtidas para os plotes de cinética de ordem zero, primeira e segunda ordem.

Tabela 5. Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para linearização do gráfico da figura 13.

Ordem	R^2
0	0,9228
1	0,9965
2	0,8983

Através dos coeficientes de determinação obtidos pode-se observar que a cinética que melhor explica o equilíbrio da avobenzona é a de primeira ordem. O gráfico obtido está expresso na figura 14.

Figura 14. Cinética para o equilíbrio da AVO(E) na presença de luz.



A equação para uma reação cinética de primeira ordem é:

$$\ln A_t = \ln A_0 - k.t$$

A equação da reta obtida para a linearização da figura 14 foi $y = - 0,9482 - 0,02877x$. Desta forma tem-se o coeficiente angular igual a constante de equilíbrio, que neste caso é igual a $k = 0,02877 \text{ min}^{-1}$. A partir da constante de velocidade consegue-se também calcular o tempo de meia vida, ou seja, tempo necessário para chegar na metade da absorbância inicial, da AVO(E), pela seguinte equação:

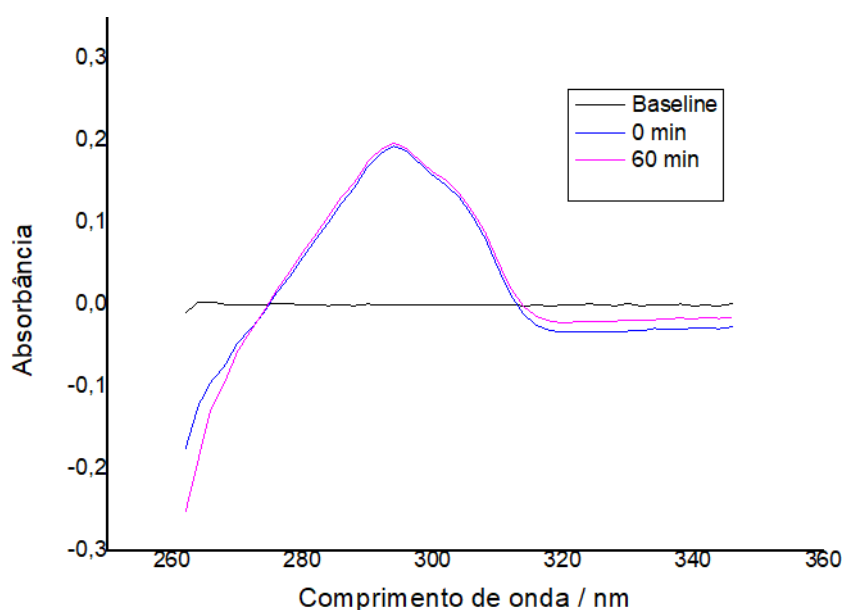
$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

O tempo de meia vida encontrado para a AVO(E) foi de aproximadamente 24 minutos.

5.4 Avaliação da fotoestabilidade do P5_{IMI} por espectroscopia UV-Vis

A fotoestabilidade do P5_{IMI} foi determinada por espectroscopia de UV-Vis. O espectro apresentado na figura 15 mostra que após uma hora de irradiação de luz UV não ocorre modificação na absorbância máxima para o composto, nem mudança no comprimento de onda de máxima absorção, o que prova que ele é um composto fotoestável.

Figura 15. Espectro de absorção do P5_{IMI} sem levar a luz UVA/UVB e depois de irradiação de 1h por luz UVA/UVB.



5.5 Promoção de um sistema hóspede-hospedeiro entre o P5_{IMI} e a avobenzona

A Figura 16 mostra o espectro de RMN de ¹H do P5_{IMI} antes do início da titulação. Os deslocamentos químicos para cada hidrogênio estão enumerados na imagem.

A Figura 17 mostra o espectro sucessivos da titulação de RMN de ^1H em diferentes proporções de avobenzona e P5_{IMI} . A partir deste espectro é possível observar que ocorre uma variação espectral quase nula nos diferentes equivalente de $[\text{AVO}]/[\text{P5}_{\text{IMI}}]$, o que indica que a inclusão da avobenzona na cavidade do P5_{IMI} não ocorre. Isto indica que ocorre uma segregação por fora da cavidade (maior distância entre os componentes), o que resulta em uma pequena influência magnética entre os hidrogênios dos compostos. Mesmo com a pequena variação espectral a Figura 18 mostra a formação de uma isoterma até $[\text{AVO}]/[\text{P5}_{\text{IMI}}] = 1$, o que indica associação em estequiometria 1:1. Após isso ocorre uma reorganização no modo de associação sem alcance de patamar até 14,1 equivalente de avobenzona, o que indica a formação de agregados entre o macrociclo e o filtro solar.

Desta maneira, sugere-se dois motivos para a não formação do complexo: o tamanho da cavidade do P5_{IMI} pode não acomodar a avobenzona e o ambiente químico em que a avobenzona se encontra.

O P5_{IMI} possui uma cavidade de $5 \text{ \AA}^{[23]}$, estudos feitos por Yuan et al. (2019)²⁵ comprovaram que a (2-hidroxil)propril- β -ciclodextrina é capaz de acomodar a avobenzona, porém ela apresenta uma cavidade maior que a do pilar[5]areno, de cerca de 6 \AA . Uma alternativa a essa problemática seria testar o pilar[6]areno para a formação do sistema hóspede-hospedeiro, já que ele possui um anel a mais e desta forma uma cavidade maior.

A formação do complexo também pode não ter ocorrido devido ao ambiente químico que a avobenzona se encontra, já que ela é muito solúvel em DMSO, solvente em que os ensaios foram realizados, não entrando assim na cavidade do macrociclo. Melhores resultados possivelmente seriam observados em diferentes solventes, preferencialmente em que a avobenzona seja menos solúvel, para que seja favorável sua inclusão na cavidade do P5_{IMI} .

Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do P5_{IMI} (DMSO-D₆; 200 MHz; 25,0 °C).

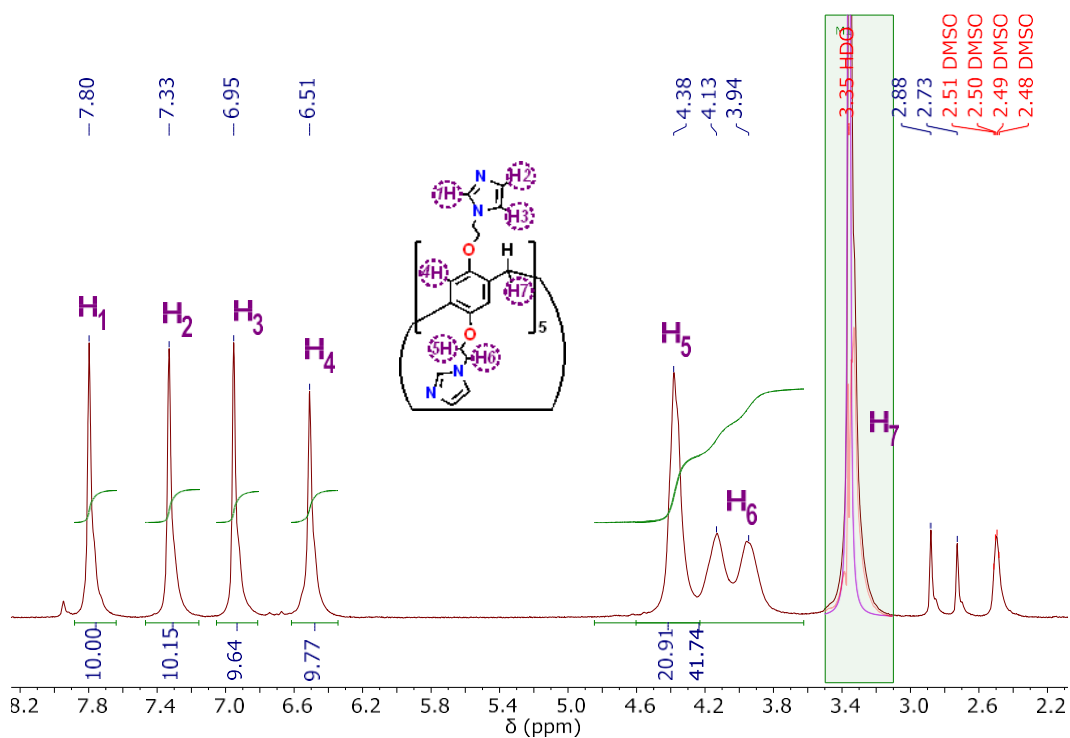


Figura 17. Espectro sucessivos da titulação de RMN de ^1H em diferentes equivalentes de [AVO]/[P5_{IMI}] (DMSO-D₆; 200 MHz; 25,0 °C).

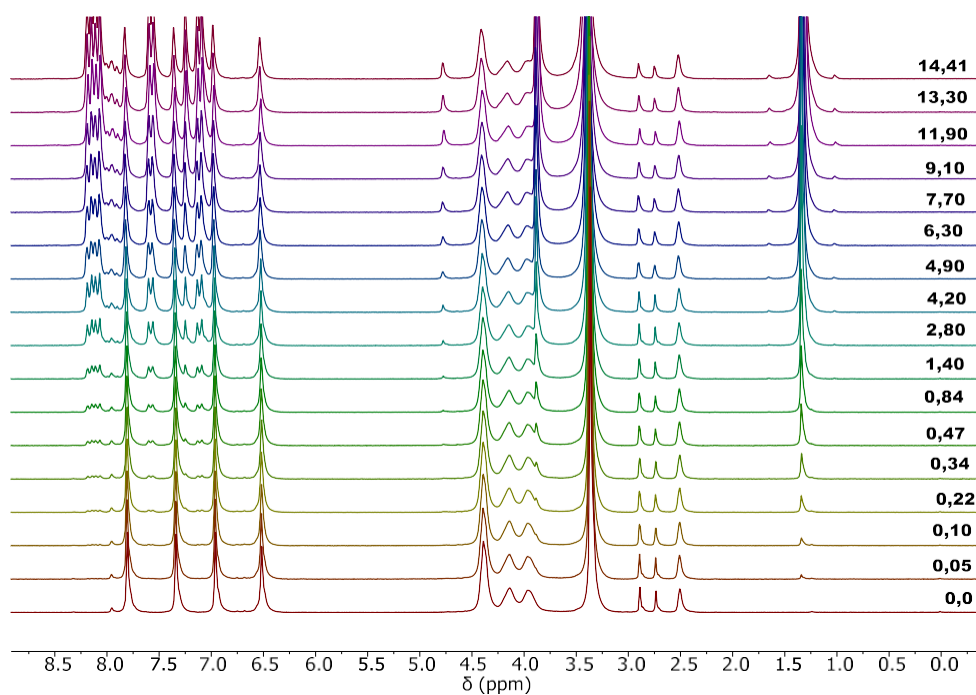
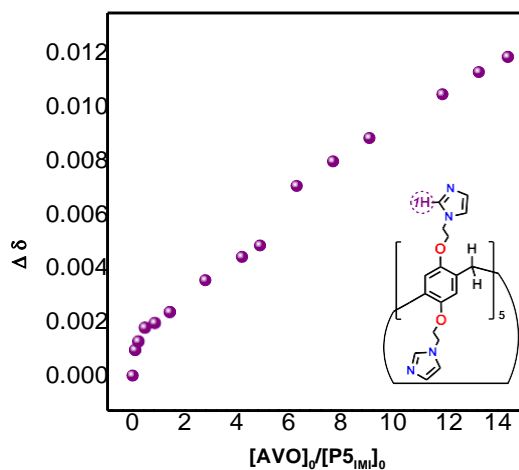


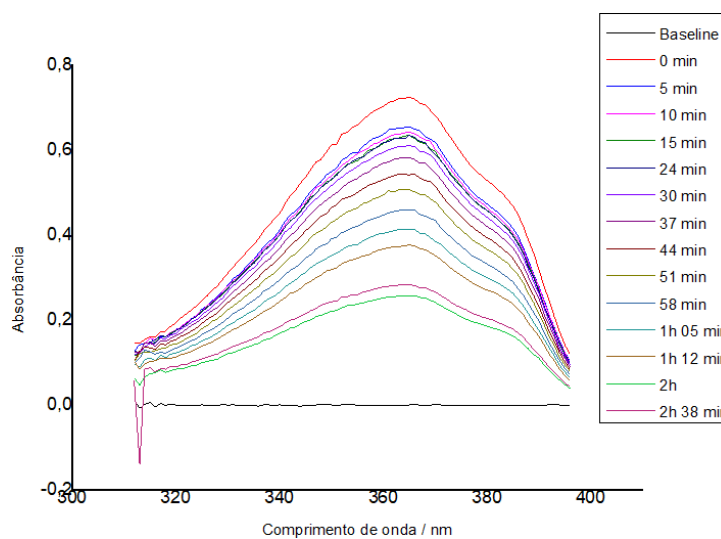
Figura 18. Gráfico de $\Delta\delta$ vs. $[AVO]_0/[P5_{IMI}]_0$ para o hidrogênio H 1 (DMSO- D_6 ; 200 MHz; 25,0 °C).



5.6 Avaliação da fotoestabilidade do sistema formado

O sistema formado com a imi-P5 em excesso e a avobenzona foi levado a luz UVA/UVB e o espectro obtido está representado na figura 19.

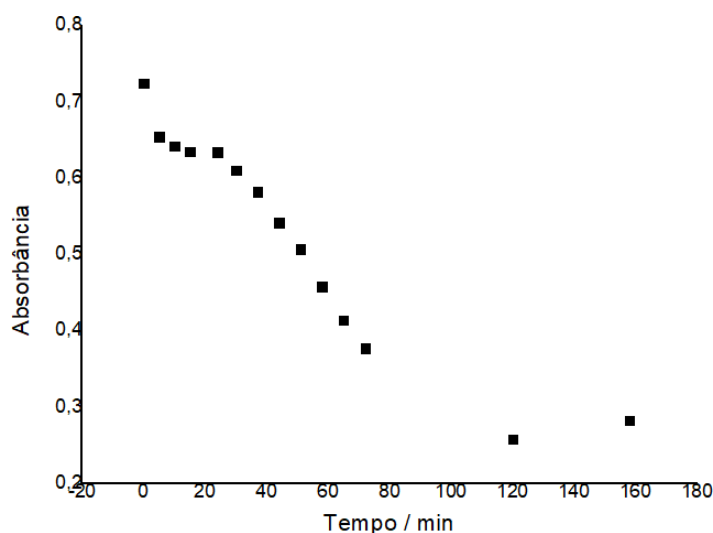
Figura 19. Avaliação da fotoestabilidade do sistema formado pela avobenzona e o $P5_{IMI}$.



Como o P5_{IMI} estava em excesso e absorve entre 200 e 250 nm não foi possível acompanhar a variação da forma ceto, que tem comprimento de absorção máximo em 270 nm, devida a alta concentração. Entretanto, pode-se observar através da figura 18 que a absorbância máxima da forma enólica da avobenzona diminui mais lentamente que quando ela é levada sozinha a luz. Este fato pode ser explicado pela possível associação entre uma das porções aro do avobenzona (provavelmente a de menor tamanho) com os grupos imidazóis de um dos portais do macrociclo. A avobenzona deve se associar lateralmente com o macrociclo formando agregados maiores, o que explica a proteção.

Através do comprimento de absorção (365 nm) máximo é possível plotar um gráfico de absorbância vs. tempo de irradiação para acompanhar a cinética da reação (Figura 20).

Figura 20. Variação da absorbância em diferentes tempos de irradiação UVA/UVB para o sistema entre avobenzona e P5_{IMI}.



O gráfico apresentado na Figura 20 mostra que a degradação da avobenzona na presença do P5_{IMI} se dá de forma mais lenta, que quando ela está isolada, principalmente nos 30 minutos iniciais de radiação.

5.7 Desenvolvimento de um método em HPLC-DAD para determinação e quantificação das duas espécies presente no equilíbrio da avobenzona

Através da metodologia criada por HPLC-DAD foi possível determinar as duas formas de equilíbrio da avobenzona, como mostra na figura 21, em uma corrida de apenas seis minutos. O pico um é referente a forma dicetona e o pico dois é referente a forma enólica do composto.

Avaliando o espectro mostrado na figura 22 é possível observar que os comprimentos de onda máximo observados para cada forma do equilíbrio condizem com os resultados encontrados por espectroscopia de UV/Vis.

Figura 21. Cromatograma obtido para separação das duas formas de equilíbrio da avobenzona.

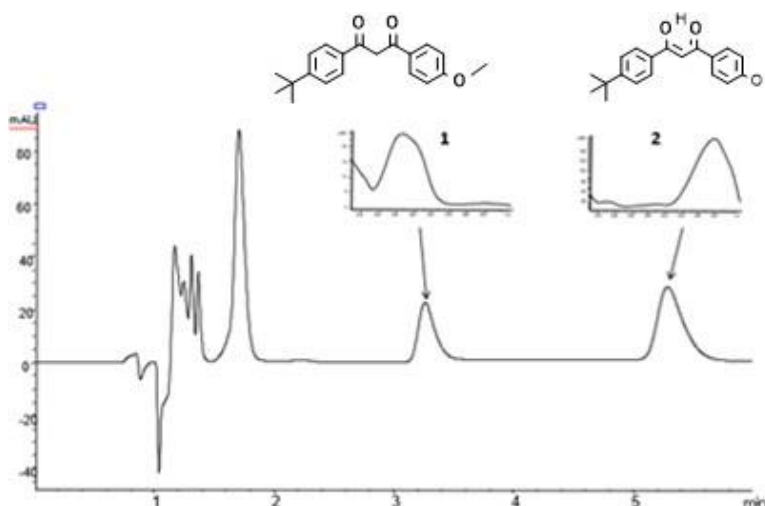
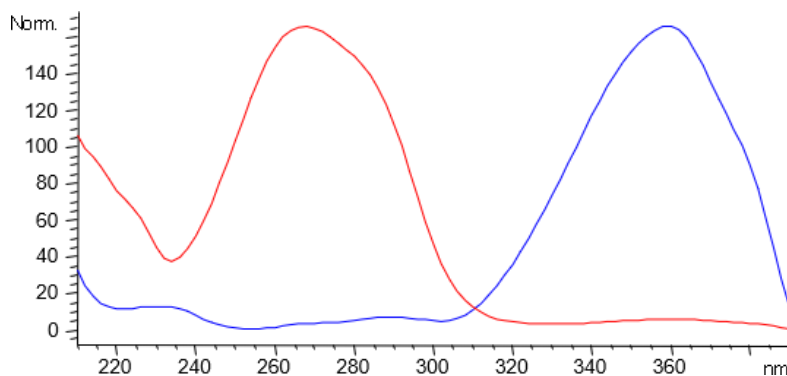


Figura 22. Espectro de absorção obtido para os picos observados na separação das formas de equilíbrio da avobenzona. Sendo: vermelho forma dicetona; azul forma enólica.



5.8 Parâmetros de mérito

5.8.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método analítico fornecer respostas diretamente proporcionais à concentração da substância a ser determinada. A faixa de trabalho utilizada foi de 5 a 80 ppm. As figuras 23 e 24 mostram as curvas de calibração e as respectivas equações da reta obtidas para os dois comprimentos de onda monitorados. Para ambas as curvas os coeficientes de determinação encontrados (R^2) foram superiores a 0,999, desta maneira o modelo pode ser considerado linear.

Figura 23. Curva de calibração em 270 nm. Curva azul corresponde a forma dicetona; curva laranja corresponde a forma enólica

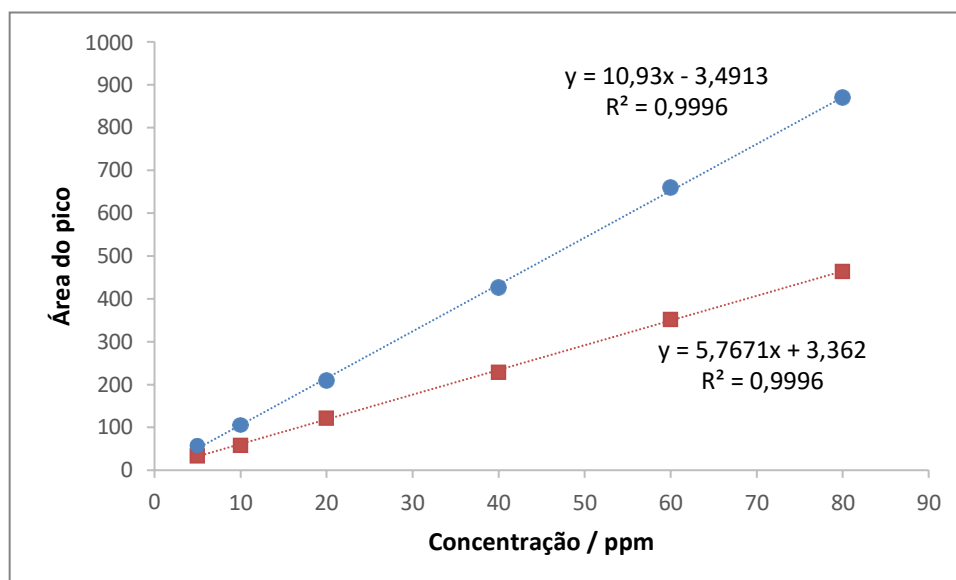
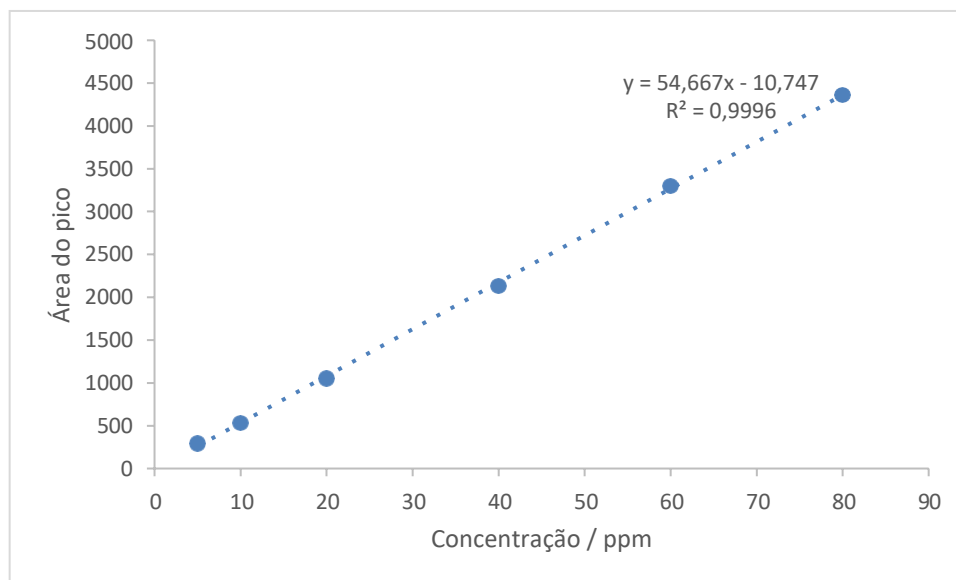


Figura 24. Curva de calibração em 360 nm



5.8.2 Limites de detecção e quantificação

Os cálculos de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizados através dos parâmetros das curvas de calibração.

No comprimento de onda de 270 nm se encontrou um LD = 0,75 ppm e LQ = 2,25 ppm.

No comprimento de onda de 360 se encontrou um LD = 1,40 ppm e LQ = 4,21 ppm.

5.8.3 Precisão

A precisão foi definida através de cinco corridas de uma amostra contendo 40 ppm de avobenzona através da estimativa do desvio padrão absoluto da área do pico (s). Para o comprimento de onda de 270 nm se encontrou $s = 0,9$. Para o comprimento de onda de 360 nm se encontrou $s = 2,6$.

6. Conclusão

A criação de metodologias para o estudo da fotodegradação da avobenzona é de grande importância, principalmente por se tratar de um filtro solar amplamente utilizado em formulações cosméticas para a proteção da pele contra os raios solares.

Através do estudo do equilíbrio da avobenzona na presença de luz por espectroscopia de UV/Vis foi possível observar que na presença de luz a molécula apresenta um equilíbrio ceto-enólico, como relatado na literatura e quanto mais tempo ela passa exposta a luz, mais o equilíbrio se desloca para a forma AVO(K). Determinou-se o equilíbrio na avobenzona como sendo uma cinética de primeira ordem, desta forma foi possível encontrar o tempo de meia vida da forma enólica do composto como 24 minutos, desta forma, sabe-se que após 24 minutos de exposição ao sol a AVO(E) se reduz a metade de sua concentração inicial. Isto se dá pelo fato da molécula ser bastante fotoinstável e na presença de luz a forma AVO(K) é favorecida.

Os estudos por RMN de ^1H mostraram que não houve a inclusão da avobenzona no pilar[5]areno, como era esperado, já que as alterações dos sinais dos hidrogênios do P5_{IMI} foram muito pequenas, o que sugere uma segregação fora da molécula, já que os sinais apresentados não são típicos de um sistema hóspede-hospedeiro. Isto pode ocorrer devido ao ambiente químico em que a avobenzona se encontra, já que ela é muito solúvel em DMSO. Para que o sistema hóspede-hospedeiro aconteça pode-se sugerir duas alternativas: tentativa de inclusão em um solvente em que a avobenzona não seja tão solúvel e que a inclusão no macrociclo seja favorecida ou a tentativa de inclusão em um macrociclo de maior cavidade, como o pilar[6]areno, que acomodaria melhor a molécula da avobenzona. Porém, mesmo não ocorrendo a inclusão da avobenzona no macrociclo ao analisar a fotoestabilidade do sistema formado através de espectroscopia UV/Vis observou-se que a avobenzona manteve suas propriedades protetoras por mais tempo na presença do P5_{IMI}, o que pode ser explicado pela ligação da avobenzona pela parte de fora do macrociclo, o imidazol, formando um agregado, reduzindo assim o deslocamento do equilíbrio para a forma AVO(K).

Por fim, foi possível criar uma metodologia eficiente e rápida, com uma corrida em modo isocrático de apenas seis minutos, em fase reversa, para a separação das duas formas de equilíbrio da avobenzona por HPLC-DAD. Observou-se que a forma de equilíbrio que saiu em um menor tempo, próximo de 3,3 minutos foi a AVO(K) e em seguida a forma AVO(E) saiu com um tempo de 5,3 minutos.

7. Referências

- ¹FLOR, J.; DAVOLOS, M. & CORREA, M. Protetores Solares. **Quim. Nova**, 30: 153-158, 2007.
- ²JUCHEM, P; HOCHBERG, J.; WINOGRON A.; ARDENGHY M. & ENGLISH R. Riscos a Saúde da Radiação Ultravioleta. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.** 13: 31-60, 1998.
- ³DE ARAUJO, T. S. & DE SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **SCIENTIA PLENA**, 4 (11), 2008.
- ⁴SILVA, A.; SOUSA, K.; SILVA, A.; FERNANDES, A.; MATIAS, V. & COLARES, V. A importância do uso de protetores solares na prevenção do fotoenvelhecimento e câncer de pele. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, 3 (1), 2015.
- ⁵GÓMEZ, J.M. RODRÍGUEZ, CARLESSO, F., VIEIRA, L.E., & DA SILVA, L. A irradiância solar: conceitos básicos. **Rev. Bras. Ensino Fís.**, São Paulo, 40 (3), 2018.
- ⁶NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, E. P. & AGUIAR, P. A. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese Orgânica. **Rev. Virtual Quim.**, 6 (2): 190-223, 2014.
- ⁷CRUZ, V.; ACOSTA-AVALOS, D. & BARJA, P. Estudo da fotoestabilidade de protetores solares por espectroscopia fotoacústica. V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba (EPG/2005), p.1505-1508, 2005.
- ⁸VALLEJO, J.; MESA, M. & GALLARDO, C. Evaluation of the Avobenzene photoestability in solvents used in cosmetic formulations. **Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmaceutica**, 18 (1): 63-71, 2011.
- ⁹KOCKLER, V.; OELGEMOLLER, M.; ROBERTSON, S. & GLASS, B. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Review**, 13: 91-110, 2012.
- ¹⁰PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMENEZ, O.; TRULLAS, C. & MIRANDA, M. A blocked diketo form of avobenzene: Photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter. **Photochem. Photobiol. Sci.** 85 (1): 178-184, 2009.
- ¹¹LHIAUBET-VALLET, V.; MARIN, M.; JIMENEZ, O.; GORCHS, O.; TRULLAS, C. & MIRANDA, M. Filter-filter interactions. Photoestabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochem. Photobiol Sci.** 9: 552-558, 2010.
- ¹²PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P. & LUANGTHONGARAM, P. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.** 161: 269–274, 2004.

- ¹³SCALIA, S. & MEZZENA, M. Photostabilization Effect of Quercetin on the UV Filter Combination, Butyl Methoxydibenzoylmethane–Octyl Methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, 86: 273-278, 2010.
- ¹⁴AFONSO, S.; HORITA, K.; SOUSA E SILVA, J.P.; ALMEIDA, I.F.; AMARAL, M.H.; LOBÃO, P.A.; COSTA, P.C.; MIRANDA, M.S.; ESTEVES DA SILVA, J.C.G. & SOUSA
- ¹⁵LOBO, J.M. Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 140: 36–40, 2014.
- ¹⁶OGOSHI, T.; KANAI, S.; FUJINAMI, S.; YAMAGISHI, T. & NAKAMOTO, Y. para-Bridged Symmetrical Pillar[5]arenes: Their Lewis Acid Catalyzed Synthesis and Host–Guest Property. **Journal of the American Chemical Society**, 130 (15): 5022-5023, 2008.
- ¹⁷XUE, M.; YANG, Y.; CHI, X.; ZHANG, Z. & HUANG, F. Pillararenes, A New Class of Macrocycles for Supramolecular Chemistry. **Accounts of Chemical Research**, 45 (8): 1294-1308, 2012.
- ¹⁸OGOSHI, T.; HASHIZUME, M.; YAMAGISHI, T. & NAKAMOTO, Y. Synthesis, conformational and host–guest properties of water-soluble pillar[5]arene. **Chemical Communications**, 46(21), 3708, 2010.
- ¹⁹NISHIMURA, T.; SANADA, Y.; MATSUO, T.; OKOBIRA, T.; MYLONAS, E.; YAGI, N. & SAKURAI, K. A bimolecular micelle constructed from amphiphilic pillar[5]arene molecules. **Chemical Communications**, 49(29), 3052, 2013.
- ²⁰PRADO, A. H.; CALIXTO, G. M. F.; BERNEGOSI, J.; RIGON, R. B. & CHORILLI, MARLUS. Nanotecnologia como estratégia para incorporação do filtro solar p-metoxicinamato de octila. **Rev Ciên Farm Básica Apl., Araraquara**, 37(1), 2016.
- ²¹GOVINDU, P. C. V.; HOSAMANI, B.; MOI, S.; VENKATACHALAM, D.; SABREDDY, A.; JOHN, V. N. & GOWD, K. H. Glutathione as a photo-stabilizer of avobenzone: An evaluation under glass-filtered sunlight using UV-spectroscopy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 18, 198-207, 2019.
- ²²PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C. & MIRANDA, M. Á. A Blocked Diketo Form of Avobenzone: Photostability, Photosensitizing Properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, 85(1), 178–184, 2009.
- ²³CHEN, L.; CAI, Y.; FENG, W & YUAN, L. Pillararenes as macrocyclic hosts: a rising star in metal ion separation. **Chemical Communications**, 55(55), 7883-7898, 2019.
- ²⁴OGOSHI, T.; YAMAGISHI, T.. Pillar[5]- and pillar[6]arene-based supramolecular assemblies built by using their cavity-size-dependent host–guest interactions. **Chem. Commun.**, 50(47): 4776-4787, 2014.

- ²⁵YUAN, L; SHUJING, L; DONGHAO, H; ZHOU, W; WANG, X; BAI, D & HU, J. Studies on the preparation and photostability of avobenzone and (2-hydroxy)propyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal Of Photochemistry And Photobiology A: Chemistry**, [s.l.], 369: 174-180, jan. 2019.
- ²⁶PINTO, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira. **Influência da rutina na fotoestabilidade da avobenzona (filtro UVA) e do p-metoxicinamato de octila (filtro UVB)**. 237 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- ²⁷COLLINS, C.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. 1ª reimpressão. Editora da UNICAMP - Campinas: Editora da UNICAMP, 2007.
- ²⁸MATTA MK, ZUSTERZEEL R, PILLI NR, et al. Effect of Sunscreen Application Under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**. 321(21):2082–2091, 2019.
- ²⁹RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.