



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Camila Pesenato Magrin

**Desenvolvimento de método para análise de Avobenzona em cosméticos por
Cromatografias Eletrocínética em Microemulsão e Líquida de Alta Eficiência**

Florianópolis

2021

Camila Pesenato Magrin

**Desenvolvimento de método para análise de Avobenzona em cosméticos por
Cromatografias Eletrocínética em Microemulsão e Líquida de Alta Eficiência**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Magrin, Camila Pesenato

Desenvolvimento de método para análise de Avobenzona em cosméticos por Cromatografias Eletrocínética em Microemulsão e Líquida de Alta Eficiência / Camila Pesenato Magrin ; orientador, Gustavo Amadeu Micke, 2021. 80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. Avobenzona. 3. Protetor Solar . 4. Eletroforese Capilar. 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Camila Pesenato Magrin

Desenvolvimento de método para análise de Avobenzona em cosméticos por Cromatografias Eletrocínética em Microemulsão e Líquida de Alta Eficiência

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alessandra Vincenzi Jager Dra.

Universidade de São Paulo – USP

Prof. Cristiane Luisa Jost, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Vera Lucia Azzolin Frescura Bascunan Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química.

Prof. Giovanni Finoto Caramori Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Pela vida, saúde e sabedoria. Pela força que me mantém apta a enfrentar as dificuldades do dia a dia. Pela proteção. Senhor, muito obrigada.

Aos meus pais, Edio e Elaine, por todo apoio, carinho e amor incondicional. A minha irmã Edilaine, pela pessoa maravilhosa que é e por ter me dado o melhor sobrinho do mundo, Miguel. Ao meu companheiro Fabrício, pelas palavras de incentivo, pela compreensão nos momentos difíceis, por estar sempre ao meu lado. Agradeço por não medirem esforços para que eu possa realizar meus sonhos. Vocês são meu maior exemplo e fonte de inspiração.

Ao professor Gustavo, meu orientador, primeiramente por ter aceitado me instruir ao longo deste trabalho. Pela paciência em me ensinar (mesmo a distância). Por ser esta pessoa espetacular, sempre disposto a me auxiliar, pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos de desânimo. Por ser este professor/pesquisador tão apaixonado que nos contagia.

Aos demais professores do programa, pelos ensinamentos compartilhados e que certamente farão de mim uma pessoa e profissional melhor.

Às professoras Alessandra, Cristiane e Vera, da banca examinadora, pelo tempo despendido em ler e avaliar este trabalho e pelas valorosas contribuições.

Ao LabEC, especialmente aos colegas que tão bem me acolheram desde o primeiro dia. Vocês, certamente tornaram a convivência no laboratório melhor. Agradeço a amizade construída ao longo deste período, pelos momentos compartilhados, pelos cafés, pelas trocas e pela empatia que tiveram em me auxiliar e sanar minhas dúvidas.

À Dra. Juliana Dreyer e ao LCME – UFSC pelas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Aos colegas do LacFI, pelo auxílio prestado, especialmente as meninas do Lab 203, Catiunaiara e Yasmin pela ajuda com o DLS.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Química. Ao CNPq pela bolsa concedida. Agradeço a oportunidade e privilégio de ter um ensino público e de qualidade.

Por fim, agradeço o caminho até aqui percorrido e por todas as pessoas que tornaram esta caminhada mais agradável, pois, no fim, percebemos que o destino não é tão importante e sim as pessoas que nos acompanharam ao longo da jornada. Assim sendo, agradeço a todos que colaboraram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

O que faço é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano será menor.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Apesar de toda a importância que o sol tem para a manutenção da vida na Terra, a radiação ultravioleta, responsável por estimular a produção de vitamina D na nossa pele, também pode causar efeitos colaterais como o envelhecimento precoce, aparecimento de rugas, manchas e até o câncer. Com o intuito de mitigar estes danos o uso de protetores solares é indicado. A Avobenzona atualmente é utilizada com o objetivo de fotoproteção, pois ela absorve a radiação ultravioleta devido a sua estrutura altamente conjugada. Contudo, a Avobenzona apresenta um equilíbrio do tipo ceto-enol, responsável pela diminuição da sua capacidade fotoprotetora de acordo com o tempo de exposição. Por isso, neste trabalho propusemos um método analítico barato, simples e rápido, baseado em Eletroforese Capilar. No método, microemulsões foram utilizadas como eletrólito de corrida, para determinação de Avobenzona em produtos de proteção solar, bem como para monitorar a conversão dos isômeros ceto e enol. O eletrólito de corrida consistiu na mistura de dodecil sulfato de sódio, n-heptano, n-butanol e tampão fosfato (pH = 2,5). Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas para avaliar a morfologia e estabilidade das microemulsões desenvolvidas para o eletrólito de corrida, sendo que o diâmetro das esferas obtidas é da ordem de 50 nm. A separação dos isômeros ceto e enol foi possível através da adição de 20% de acetonitrila ao eletrólito. O *t*-Anetol foi utilizado como padrão interno. Os comprimentos de onda monitorados para detecção dos analitos foram de 254 nm para a forma ceto e o padrão interno e de 360 nm para a forma enol. A separação ocorre em menos de 2,5 minutos. O método foi aplicado para monitorar a estabilidade das formas ceto e enol no padrão de Avobenzona, apresentando resultados que corroboram com os relatados na literatura. Os parâmetros de validação não foram considerados satisfatórios no que tange a precisão e seletividade para aplicação em amostras de produtos destinados a proteção solar, portanto, o método precisa de modificações e aprimoramentos. Por isso, um método em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi desenvolvido utilizando uma fase móvel composta por gradiente de acetonitrila:água e tempo de separação de 12 minutos. Os resultados encontrados para a concentração de Avobenzona nas amostras analisadas estão de acordo com a legislação. Como perspectiva, visto a importância do desenvolvimento de metodologias para o estudo da fotoestabilidade da Avobenzona em cosméticos e devido às vantagens dos métodos eletroforéticos, o método proposto em Eletroforese Capilar pode ser aperfeiçoado para aplicação em amostras de protetor solar para quantificar os isômeros ceto-enol da Avobenzona e outros componentes presentes nos fotoprotetores.

Palavras-chave: Avobenzona. Protetor Solar. Eletroforese Capilar.

ABSTRACT

Despite all the sun's importance for the maintenance of life on Earth, ultraviolet radiation, responsible for stimulating the production of vitamin D in our skin, can also cause side effects such as premature aging, the appearance of wrinkles, spots, and even cancer. To mitigate these damages, the use of sunscreens is indicated. Avobenzone is currently used for photoprotection purposes, as it absorbs ultraviolet radiation due to its highly conjugated structure. However, Avobenzone presents a balance of the keto-enol type, responsible for the reduction of its photoprotective capacity according to the exposure time. Therefore, in this work, we used a cheap, simple, and fast analytical method, based on Capillary Electrophoresis. In the method, microemulsions were used as running electrolyte, for the determination of Avobenzone in sun protection products, as well as to monitor the conversion of keto and enol isomers. The running electrolyte consisted of a mixture of sodium dodecyl sulfate, n-heptane, n-butanol, and phosphate buffer (pH = 2.5). Transmission Electron Microscopy analyzes were performed to evaluate the morphology and stability of the microemulsions developed for the running electrolyte, and the diameter of the spheres obtained is around 50 nm. The separation of keto and enol isomers was possible by adding 20% acetonitrile to the electrolyte. *t*-Anethole was used as an internal standard. The monitored wavelengths for the detection of the analytes were 254 nm for the keto form and the internal standard and 360 nm for the enol form. Separation takes less than 2.5 minutes. The method was applied to monitor the stability of the keto and enol forms in the Avobenzone standard, presenting results that corroborate those reported in the literature. The validation parameters were not considered satisfactory in terms of precision and selectivity for application in samples of products for sun protection, thus, the method needs to be modified and improved. Therefore, a High Performance Liquid Chromatography method was developed using a mobile phase composed of acetonitrile:water gradient and separation time of 12 minutes. The results found for the concentration of Avobenzone in the analyzed samples are following legislation. As a perspective, given the importance of developing methodologies for the study of the photostability of Avobenzone in cosmetics, and due to the advantages of electrophoretic methods, the method proposed in Capillary Electrophoresis can be improved for application in sunscreen samples to quantify the Avobenzone keto-enol isomers and other components present in sunscreens.

Keywords: Avobenzone. Sunscreen. Capillary Electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equilíbrio ceto – enol da AVO.....	21
Figura 2 – Espectro de absorção molecular da AVO (100 mg L ⁻¹) em ACN.....	22
Figura 3 – Eletroferograma da solução padrão de AVO em MEEKC.	40
Figura 4 – Determinação da janela de separação do método.	41
Figura 5 – Eletroferogramas da solução padrão de AVO em MEECK com BGE ácido.	42
Figura 6 – Comparação entre as separações* em BGE básico e ácido, pelo <i>inlet</i> e <i>outlet</i>	43
Figura 7 – Comparação entre os eletroferogramas da solução padrão de AVO em MEEKC com ME ácida e ME mista.	44
Figura 8 – (a) Eletroferogramas da solução de AVO em MEEKC com ME ácida e diferentes concentrações de ACN. (b) Resolução dos picos para diferentes concentrações de ACN.	45
Figura 9 – Comparação entre os eletroferogramas da solução padrão de AVO em MEEKC com ME ácida e 20% de ACN adicionados durante o preparo e após o preparo da ME.	45
Figura 10 – Eletroferograma da solução padrão de AVO em MEKC.....	46
Figura 11 – Imagens de TEM das amostras de BGE (barra de escala de 50 nm).	47
Figura 12 – Eletroferograma da solução padrão de AVO e <i>t</i> -Anetol como padrão interno.	49
Figura 13 – Eletroferogramas da solução padrão de AVO e <i>t</i> -Anetol como padrão interno com aplicação da ferramenta do <i>Software Chemstation</i> [®] para verificação da pureza de pico.....	50
Figura 14 – Curva de calibração (com padrão interno) para o método CE.....	51
Figura 15 – Gráficos dos resíduos da regressão linear para o método CE.....	52
Figura 16 – Imagens dos capilares entupidos com poli-imida.	55
Figura 17 – (a) Eletroferograma de amostra de PS. (b) Comparação entre os espectros* do padrão de AVO e da amostra de PS.	56
Figura 18 – Cromatogramas de amostra de PS com diferentes gradientes de eluição.	57
Figura 19 – Cromatograma de amostra de PS.	58
Figura 20 – Cromatograma da amostra de PS com aplicação da ferramenta do <i>Software Chemstation</i> [®] para verificação da pureza de pico.	59
Figura 21 – Curva de calibração para o método HPLC.....	60
Figura 22 – Gráficos dos resíduos da regressão linear para o método HPLC.	62
Figura 23 – Cromatogramas referentes a amostra AS30.....	65
Figura 24 – Comparação entre os espectros da AVO padrão e DHHB em amostra de AS30.	65
Figura 25 – Conversão dos isômeros da AVO, em solução exposta à radiação UV.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Regiões do Espectro UV e seus respectivos efeitos biológicos.....	16
Tabela 2 – Modos de Eletroforese Capilar e suas principais características.	26
Tabela 3 – Principais formulações utilizadas.	43
Tabela 4 – Parâmetros de conformidade do sistema CE.	49
Tabela 5 – Valores de <i>Purity factor</i> e <i>Threshold</i> dos picos em CE.	50
Tabela 6 – Parâmetros da curva de calibração padrão de AVO para o método CE.	51
Tabela 7 – Teste F para o método CE.	52
Tabela 8 – Teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para o método CE.....	53
Tabela 9 – Precisão em termos de coeficiente de variação (%) para o método CE.	53
Tabela 10 – Parâmetros de conformidade do sistema HPLC.	58
Tabela 11 – Valores de <i>Purity factor</i> e <i>Threshold</i> dos picos em HPLC.	59
Tabela 12 – Parâmetros da curva de calibração padrão de AVO para o método HPLC.	61
Tabela 13 – Teste F para o método HPLC.	61
Tabela 14 – Teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para o método HPLC.	62
Tabela 15 – Precisão em termos de coeficiente de variação (%) para o método HPLC.	63
Tabela 16 – Exatidão para o método HPLC.	63
Tabela 17 – Concentração de AVO (forma enol) encontrada nas amostras analisadas.	64
Tabela 18 – Amostras de Protetor Solar.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AVO	Avobenzona
CE	Eletroforese Capilar, do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>
CMC	Concentração Micelar Crítica
CV	Coefficiente de Variação
CZE	Eletroforese Capilar de Zona, do inglês <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos, do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DEM	Dose Eritematosa Mínima
DHHB	<i>Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate</i>
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EOF	Fluxo Eletrosmótico, do inglês <i>Electroosmotic flow</i>
FA	Fase Aquosa
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase Móvel
FO	Fase Orgânica
FPS	Fator de Proteção Solar
H ₂ O	Água Ultrapura obtida de Sistema Milli-Q® com resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>inlet</i>	Extremidade mais distante do detector
IR	Radiação Infravermelha, do inglês <i>Infrared radiation</i>
k	Fator de retenção
LD	Limite de Detecção
L _{det}	Comprimento do capilar até o detector
logP _{o/w}	Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
LQ	Limite de Quantificação

L _{tot}	Comprimento total do capilar
ME	Microemulsão
MECK	Cromatografia Eletrocinética Micelar, do inglês <i>Micellar Electrokinetic Chromatographic</i>
MEEKC	Cromatografia Eletrocinética de Microemulsão, do inglês <i>Microemulsion Electrokinetic Chromatographic</i>
MeOH	Metanol
N	Número de pratos
NaOH	Hidróxido de Sódio
OCR	Octocrileno, do inglês <i>Octocrylene</i>
outlet	Extremidade mais próxima ao detector
PABA	Ácido Para-Aminobenzoico
PDI	Índice de Polidispersividade, do inglês <i>Polydispersity Index</i>
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PS	Protetor Solar
R ²	Coefficiente de determinação
RP	Fase Reversa, do inglês <i>Reverse Phase</i>
Rs	Resolução
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFC	Cromatografia de Fluido Supercrítico, do inglês <i>Supercritical Fluid Chromatography</i>
TBS	Tetraborato de Sódio
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TLC	Cromatografia em Camada Fina, do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>
UV	Radiação ultravioleta, do inglês <i>Ultraviolet radiation</i>
UVA I	Radiação ultravioleta A I (340 – 400 nm)
UVA II	Radiação ultravioleta A II (320 – 340 nm)
UVB	Radiação ultravioleta B (290 – 320 nm)
UVC	Radiação ultravioleta C (100 – 290 nm)
VIS	Radiação visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	PROTETORES SOLARES	18
2.2	AVOBENZONA.....	21
2.3	ELETROFORESE CAPILAR.....	24
2.3.1	MEEKC	27
2.4	MICROEMULSÕES	28
2.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	30
2.6	OBJETIVOS	31
2.6.1	Objetivo Geral.....	31
2.6.2	Objetivos Específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	32
3.2	AMOSTRAS	32
3.3	INSTRUMENTAÇÃO	33
3.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
3.4.1	Eletroforese Capilar	33
3.4.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	34
3.4.3	Caracterização das ME	34
3.4.3.1	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz</i>	34
3.4.3.2	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	35
3.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	35
3.5.1	Conformidade do sistema.....	35
3.5.2	Seletividade.....	36
3.5.3	Linearidade	36
3.5.4	Precisão e Exatidão.....	37

3.5.5	Limite de detecção e quantificação	38
3.6	SEGURANÇA E RESÍDUOS	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1	ELETROFORESE CAPILAR	39
4.1.1	Desenvolvimento do método	39
4.1.1.1	<i>Caracterização das ME</i>	46
4.1.2	Padrão interno	48
4.1.3	Conformidade do sistema	49
4.1.4	Seletividade	50
4.1.5	Linearidade	51
4.1.6	Precisão	53
4.1.7	Amostras	55
4.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	56
4.2.1	Desenvolvimento do método	56
4.2.2	Conformidade do sistema	57
4.2.3	Seletividade	59
4.2.4	Linearidade	60
4.2.5	Precisão	62
4.2.6	Exatidão	63
4.2.7	Amostras	64
4.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO CE	66
5	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE A – Amostras de Protetor Solar	77

1 INTRODUÇÃO

De toda extensão do espectro eletromagnético, somos aquecidos pela porção infravermelha dos raios solares, capazes de ver através da porção visível do espectro e, a porção do ultravioleta da luz solar é responsável por provocar reações fotoquímicas em nossa pele. A radiação ultravioleta se estende de 100 a 400 nm, sendo parcialmente impedida de atingir a superfície da Terra pela camada de ozônio. Mesmo assim, os raios que chegam até nós podem trazer benefícios como estimular a produção de vitamina D ou inconvenientes como envelhecimento precoce da pele, rugas, manchas e em casos mais graves até o câncer.

Devido a importância da luz solar em nossas vidas, deve haver um equilíbrio entre a exposição que se dá de forma benéfica e a que pode ocasionar prejuízos. Como forma de prevenir possíveis danos, o uso de protetores solares é bem difundido, especialmente por atuarem como barreira físico-química que protege o ser humano dos raios ultravioleta. Ao longo dos anos diferentes compostos foram utilizados com o objetivo de fotoproteger a pele. Estes compostos podem ser inorgânicos, que atuam como barreira física ou orgânicos, que atuam como barreira química. Dentre os fotoprotetores orgânicos, um de particular importância é a Avobenzona.

A Avobenzona possui estrutura altamente conjugada, que lhe confere boa capacidade de absorção, principalmente dos maiores comprimentos de onda (320 a 400 nm) e por isso é um dos filtros orgânicos mais utilizados. Porém, sua capacidade de proteção é diminuída com a exposição, devido a presença de um equilíbrio do tipo ceto-enol. Além de prejudicar a fotoproteção, a presença do equilíbrio torna o composto foto instável, com diferentes processos de decaimento que podem levar a formação de produtos inativos ou até radicais de toxicidade desconhecida.

A fim de ampliar a concepção sobre a atuação da Avobenzona, busca-se desenvolvimento de metodologias analíticas para monitorar e quantificar os isômeros ceto-enol. Os métodos mais comuns baseiam-se em cromatografia líquida. No entanto, neste trabalho optou-se por utilizar também a eletroforese capilar como método de separação, devido as vantagens da técnica e especialmente por se tratar de uma alternativa mais verde. O modo escolhido baseia-se na utilização de surfactantes e é conhecido como cromatografia eletrocínica por microemulsão. O princípio da separação baseia-se interação diferencial dos analitos com as microemulsões, na presença de um campo elétrico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O Sol é essencial para a vida terrestre. A energia solar está relacionada com processos químicos, físicos e biológicos e os raios do sol que atingem a superfície terrestre são fundamentais para que haja vida em nosso planeta. Apesar de toda extensão do espectro eletromagnético há uma faixa predominante que compreende: as radiações infravermelhas (IR, do inglês *Infrared radiation*), percebidas pela sensação de calor durante o aumento da temperatura; a região do visível (VIS) detectada pelas diferentes cores através do sistema óptico e, os raios ultravioletas (UV) mais energéticos, promovem reações fotoquímicas na pele humana (GÓMEZ et al., 2018; INMETRO, [s.d.]; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014). O espectro do UV divide-se em três regiões de acordo com o comprimento de onda e os diferentes efeitos biológicos que provocam, conforme tabela 1:

Tabela 1 – Regiões do Espectro UV e seus respectivos efeitos biológicos.

Região	Comprimento de onda (nm)	Efeitos biológicos
UVC	100 a 290	Apesar de ser a mais energética, é totalmente absorvida pela camada de ozônio, não chegando à superfície terrestre.
UVB	290 a 320	Atinge a epiderme e é responsável pela produção de vitamina D e causa de eritema (<i>vermelhidão</i>).
UVA II UVA I	320 a 340 340 a 400	Penetra nas camadas mais profundas da pele (derme e hipoderme), pode provocar envelhecimento das fibras elásticas de colágeno e alterar o DNA dos melanócitos

Fonte: Elaborada pela autora (2021), baseada em Santos, Sobrinho e Oliveira (2018); Abid *et al.* (2017); Bindaco, Benz e Neto (2017); e ANVISA (2012).

Apesar de todas as benesses que os raios solares nos proporcionam, a exposição excessiva à luz solar pode ser um problema crescente no mundo e, especialmente no Brasil, por ser um país de elevada incidência de raios UV, devido a sua localização geográfica. A exposição ao sol é um fator que contribui para acelerar o processo natural de envelhecimento, pois é agressiva a superfície da pele, sendo responsável pelo aparecimento precoce de rugas e manchas e, em casos mais graves, até o próprio câncer de pele. Segundo o *Global Burden of Cancer* (2018), o câncer é a segunda principal causa de mortes no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. No Brasil, o câncer de pele é a neoplasia com maior índice, quando comparada as demais neoplasias e é definido como o crescimento anormal e descontrolado

das células que compõem a pele (GLOBAL BURDEN OF CANCER, 2018; INCA, 2018a, 2018b; INMETRO, [s.d.]; SANTOS; SOBRINHO; OLIVEIRA, 2018; SILVA A. *et al.*, 2015).

A radiação UV é a principal responsável pelo desenvolvimento de tumores cutâneos e a maioria dos casos está associada à exposição excessiva ao sol ou ao uso de câmaras de bronzeamento. A população em geral submete-se as radiações UV de maneira direta e/ou indireta de maneira excessiva quase que diariamente. Algumas vezes esta exposição se dá de forma voluntária, em busca de um corpo bronzeado que, segundo estudo de Andrew e colaboradores (2016), está diretamente relacionado a maior satisfação com a imagem corporal. Dessa forma, menos atenção é direcionada a comportamentos de proteção solar (GLOBAL BURDEN OF CANCER, 2018; ANDREW; TIGGEMANN; CLARK, 2016; SILVA A. *et al.*, 2015).

Se por um lado, para os ocidentais, ter uma pele bronzeada é desejável, por outro, nota-se um maior interesse das pessoas por uma pele jovem, isenta de rugas e manchas. Embora seja conhecido que o envelhecimento é um processo natural, fatores ambientais (como a exposição ao sol) podem estimular este processo. Ainda que existam produtos cosméticos prometendo resultados milagrosos e, mesmo com diversos avanços alcançados, a melhor maneira de se combater o fotoenvelhecimento e o câncer de pele continua sendo a prevenção. Os efeitos negativos que as radiações UV podem causar na pele, podem ser reduzidos pelo uso de protetores solares. Eles têm como objetivo principal a formação de uma barreira físico-química protetora contra os raios UV, reduzindo a quantidade de radiação que atinge a pele humana, através da absorção, reflexão e/ou dispersão da radiação, atenuando assim os efeitos desta. Também é importante salientar que a exposição à luz solar é necessária para a produção de vitamina D, importante para prevenção de doenças cardíacas, autoimunes, virais e depressão. A vitamina D é induzida de maneira natural pela radiação UVB na pele, por isso, deve haver um equilíbrio entre o nível de exposição e a prevenção de maneira benéfica (SANTOS; SOBRINHO; OLIVEIRA, 2018; FERREIRA; OLIVEIRA; BARZOTTO, 2017; ANDREW; TIGGEMANN; CLARK, 2016; SILVA A. *et al.*, 2015; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014; NAIR; MASEEH, 2012; ARANOW, 2011).

2.1 PROTETORES SOLARES

O primeiro protetor solar (PS) foi comercializado nos Estados Unidos em 1928 e consistia em uma emulsão composta com salicilato e cinamato de benzila como agentes fotoprotetores. Com a ocorrência dos primeiros relatos correlacionando problemas de pele à exposição solar em 1930 e através da constatação de que tais produtos prolongavam a exposição ao sol e preveniam queimaduras na pele, o uso do protetor solar foi se difundindo. Inicialmente, apenas os filtros UVB eram utilizados devido a concepção de que apenas esta radiação era perigosa para a pele humana. Posteriormente foi demonstrado que a radiação UVA também produz danos à pele e, por isso, filtros UVA também foram incluídos nas formulações (NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014; SCHALKA; REIS, 2011; VALLEJO; MESA; GALLARDO, 2011).

Em menos de um século, muitos avanços aconteceram. Durante a Segunda Guerra Mundial, devido à necessidade de proteção solar adequada para os soldados, seu uso foi intensificado. Em 1943 o ácido para-aminobenzoico (PABA) foi patenteado como o primeiro filtro solar. Nos anos da década de 1970, diferentes filtros UVB foram incorporados a cremes e loções e seu uso foi popularizado. Em 1972 a *Food and Drug Administration* (FDA) passou a recomendar o uso de produtos para proteção solar e, a partir de 1978, o conceito de fotoprotetores passou a ser adotado (NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014; SCHALKA; REIS, 2011).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), atualizou, em 2012, a classificação de protetor solar como sendo “qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação”. Segundo a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019, p. 30), cosméticos são produtos de uso externo, destinados à proteção ou ao embelezamento das diferentes partes do corpo. Os preparados antissolares pertencem à classe de cosméticos e são barreiras protetoras responsáveis por diminuir a quantidade de radiação UV que a pele pode absorver (ANVISA, 2012, 2019; BINDACO; BENZ; NETO, 2017; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

De maneira geral, o protetor solar é um produto comercial, vendido para proteger a pele humana da radiação ultravioleta. Além dos filtros UV, eles contêm muitas outras substâncias em sua composição, como emolientes, conservantes ou estabilizantes, emulsificantes, fragrâncias e compostos corantes. Os compostos ativos dos filtros solares são os responsáveis por absorver, refletir ou espalhar os raios nocivos do sol, alterando assim a

resposta fisiológica normal à radiação solar. Esses compostos também ajudam a prevenir queimaduras solares, reduzir a chance de envelhecimento prematuro da pele, câncer de pele e outros efeitos prejudiciais devido à exposição ao sol (FIVENSON *et al.*, 2021).

Os fotoprotetores são classificados em duas categorias principais: filtros inorgânicos e orgânicos. Os inorgânicos, também conhecidos como filtros físicos, são inertes e opacos, insolúveis em água, apresentam alto índice de refração de partícula, e, portanto, alta capacidade de refletir a luz. Eles formam uma barreira sobre a pele, o que pode deixá-la esbranquiçada, efeito considerado esteticamente desfavorável. As substâncias inorgânicas mais comumente empregadas para proteção solar são óxido de zinco e dióxido de titânio, considerados inertes e não tóxicos. Já os filtros orgânicos, também chamados de filtros químicos, geralmente são compostos aromáticos, conjugados, com grupos carboxílicos, apresentando na maioria das vezes um grupo doador de elétrons. Atuam por absorção da radiação de faixas de comprimentos de onda específicas (FIVENSON *et al.*, 2021; SANTOS; SOBRINHO; OLIVEIRA, 2018; ABID *et al.*, 2017; BINDACO; BENZ; NETO, 2017; RODRIGUES; STANIFORTH; STAVROS, 2016; SILVA A. *et al.*, 2015; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014; VALLEJO; MESA; GALLARDO, 2011).

Até o presente momento, nenhuma molécula única fornece fotoproteção em toda a faixa de radiação UVA e UVB. Uma boa estratégia para aumentar o espectro em que o protetor solar atua, é a associação de diferentes filtros, que protegem das radiações UVA e UVB. Sendo assim, frequentemente pelo menos dois absorvedores químicos são usados em conjunto na formulação para garantir que o filtro solar atenda as especificações das agências reguladoras. Apesar de os preparados antissolares serem extensivamente testados dermatologicamente e quanto a sua capacidade fotoprotetora, os fenômenos que ocorrem a nível molecular após a absorção da radiação ainda não foram completamente elucidados (SANTOS; SOBRINHO; OLIVEIRA, 2018; RODRIGUES; STANIFORTH; STAVROS, 2016; AFONSO *et al.*, 2014; LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010).

Predominantemente, o Fator de Proteção Solar (FPS) é o aspecto analisado em produtos que visam à proteção solar. Por definição, conforme proposto pelo FDA em 1978, o FPS é a razão numérica entre a Dose Eritematosa Mínima (DEM) da pele protegida pelo fotoprotetor, e a DEM da pele não protegida. A DEM é o tempo que a pele leva para ficar avermelhada. De acordo com a RDC nº 30, de 1º de junho de 2012 (ANVISA), é imprescindível estudos que comprovem a eficácia fotoprotetora dos produtos comercializados

com esta finalidade e a determinação do FPS deve ser realizada de acordo com os métodos da FDA 1999 e/ou COLIPA 2006 (ANVISA, 2012; SCHALKA; REIS, 2011).

Por outro lado, deve-se considerar que o FPS é uma medida de proteção UVB e não reflete a taxa de proteção UVA do produto, pois deve ser considerado o marcador biológico relacionado ao efeito de proteção. O FPS é aplicado exclusivamente às radiações UVB, pois estas são as causadoras de eritemas, ou seja, a proteção contra a queimadura solar é quantificada. Portanto, não se pode afirmar qual é o percentual de proteção contra o desenvolvimento de neoplasias cutâneas ou mesmo em relação aos efeitos da radiação UVA. Além disso, na escolha de um agente fotoprotetor, os dados relativos à substantividade (resistência à água) e a fotoestabilidade também devem ser considerados para uma correta fotoproteção (AFONSO *et al.*, 2014; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014; SCHALKA; REIS, 2011).

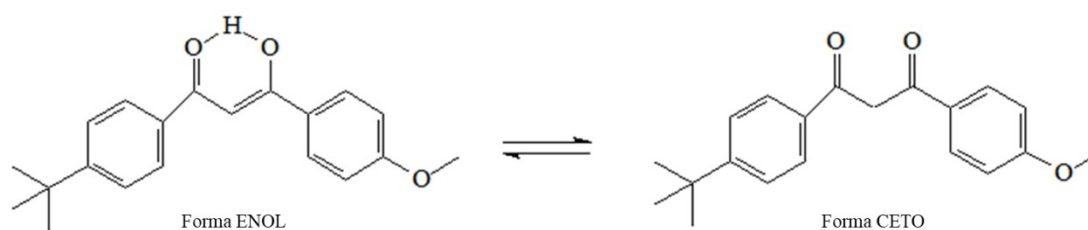
Um dos principais fatores que ditam a eficácia de protetores solares é sua fotoestabilidade, que é a capacidade que o produto tem de permanecer na pele por longos períodos sem degradar na presença de luz solar. Eles não podem ser irritantes, sensibilizantes ou fototóxicos. Também devem ser resistentes à água e ao calor, além de apresentar estabilidade quando aplicados sob a pele humana, garantindo assim mais horas de proteção. 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. Além disso, a presença de diferentes filtros UV leva a efeitos sinérgicos quanto ao desempenho final e à sua fotoestabilização (SANTOS; SOBRINHO; OLIVEIRA, 2018; AFONSO *et al.*, 2014; SCHALKA; REIS, 2011).

Do ponto de vista da sua fotoestabilidade, as interações filtro a filtro podem ser positivas ou negativas. O ideal seria que a loção de filtro solar não apenas absorvesse fortemente as radiações, como também fosse capaz de dissipar o excesso de energia por meio de mecanismos que não causem alterações químicas, restaurando a molécula ao seu estado original sem formação de quaisquer espécies potencialmente prejudiciais. Isso porque os compostos formados e que são produtos desta fotodegradação, podem ser inativos, mas também favorecer a degradação de biocomponentes da pele pela fotossensibilização, causar alergias e produzir radicais livres (RODRIGUES; STANIFORTH; STAVROS, 2016; VALLEJO; MESA; GALLARDO, 2011; LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010; SCALIA; MEZZENA, 2010).

2.2 AVOBENZONA

Devido a sua estrutura altamente conjugada, a 1-(4-metoxifenil)-3-(4-terc-butilfenil) propano-1,3-diona também conhecida como butil metoxi dibenzoilmetano, sob nomes comerciais Eusolex 9020[®], Neo Heliopan 357[®], Parsol 1789[®], ou simplesmente Avobenzona (AVO) é um dos filtros solares orgânicos mais utilizados para proteger a pele da radiação UVA. Apesar de possuir alta absorção na faixa de UVA I, a AVO tem sua capacidade fotoprotetora diminuída de 50% a 60% após uma hora de exposição à luz solar. Isto porque a AVO está propensa a degradação, quando exposta a radiação, devido a um equilíbrio ceto – enólico, conforme representado na figura 1 (GOVINDU *et al.*, 2019; AFONSO *et al.*, 2014; KOCKLER *et al.*, 2013; VALLEJO; MESA; GALLARDO, 2011; SCALIA; MEZZENA, 2010).

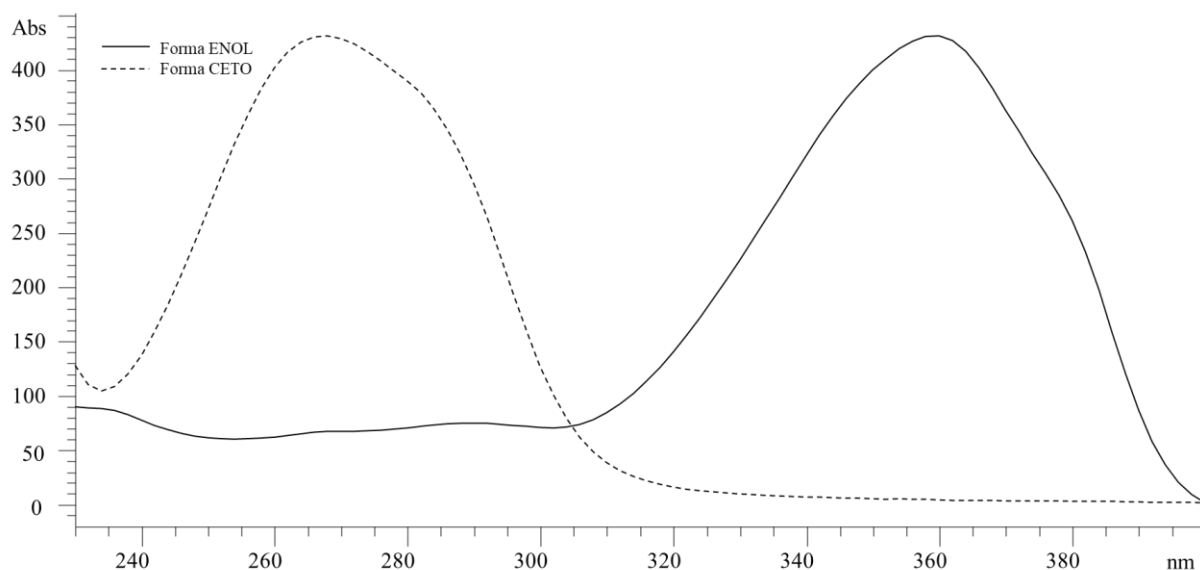
Figura 1 – Equilíbrio ceto – enol da AVO.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As formas ceto e enol absorvem em diferentes comprimentos de onda do espectro de absorção, como pode ser observado na figura 2. A forma cetona tem uma absorção máxima em 265 nm e, devido à presença de um hidrogênio ácido entre as duas carbonilas, torna-se menos estável. Por possuir diferentes caminhos envolvidos no seu processo de decaimento, a forma ceto pode formar radicais. A forma enol, tem uma absorção máxima em 355 nm e é a forma mais estável da Avobenzona, devido a sua estrutura altamente conjugada. Para efeitos de proteção solar, é de maior interesse que a forma enol permaneça (BERENBEIM *et al.*, 2020; ABID *et al.*, 2017; AFONSO *et al.*, 2014; KOCKLER *et al.*, 2012).

Figura 2 – Espectro de absorção molecular da AVO (100 mg L⁻¹) em ACN.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A presença do equilíbrio ceto-enol torna a AVO um composto com baixa fotoestabilidade. O fato de ser fotoquimicamente instável prejudica a absorção da radiação pela AVO após a exposição aos raios UV e esta é a principal desvantagem associada ao seu uso. Os produtos de fotodegradação da Avobenzona podem ser inativos, diminuindo a eficácia do filtro solar; causar efeitos deletérios na pele, como danos oxidativos causados pelos radicais formados; interagir com biocomponentes, causando reações de fotoalergia e fototoxicidade; interagir com outros filtros UV e outros compostos presentes na formulação, levando à formação de compostos com toxicidade desconhecida (GOVINDU *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2016; AFONSO *et al.*, 2014).

Com o intuito de alcançar a fotoproteção esperada, a capacidade dos filtros de absorver a radiação deve permanecer durante o período de exposição solar mencionado no rótulo dos produtos. Porém, embora os filtros ideais permaneçam inalterados após a irradiação com UV, a maioria dos filtros químicos exibe alguma foto-reatividade. Uma molécula que sofre tautomerismo do tipo ceto-enol pode ser classificada como um protetor solar fotolábil. Se a absorvância ou a faixa de comprimento de onda de absorção diminuir, o risco de danos à pele aumenta (LI *et al.*, 2016; AFONSO *et al.*, 2014; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014; LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010).

A fotoestabilidade da AVO em diferentes solventes orgânicos tem sido fonte de estudos e foi descoberto que ela é altamente dependente da polaridade e proticidade do solvente. No estado fundamental, a AVO é encontrada principalmente em sua forma enol devido à ligação de hidrogênio intramolecular estabilizadora. A tautomerização é detectada

em solventes não polares e polares apróticos como ciclo-hexano, iso-octano, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetonitrila (ACN). Em solventes polares próticos, como o metanol (MeOH), o equilíbrio de tautomerização é reduzido (BERENBEIM *et al.*, 2020; HANSON *et al.*, 2020; MURPHY *et al.*, 2020; AFONSO *et al.*, 2014; CERESOLE *et al.*, 2013; VALLEJO; MESA; GALLARDO, 2011; LHIAUBET-VALLET *et al.*, 2010).

Questões relacionadas à proteção solar e fotoestabilidade, bem como a penetração na pele de filtros UV orgânicos são de particular interesse para garantir que o produto seja seguro. Dessa forma, além do FPS, medidas da fotoestabilidade e permeação cutânea também são importantes. A capacidade de absorção da radiação UV deve permanecer inalterada sob a exposição aos raios UV e a penetração percutânea deve ser mínima. A AVO, apesar de ser o filtro mais eficaz usado como proteção UVA (devido alto coeficiente de absorção molar entre os comprimentos de onda de 320 a 400 nm) e a única molécula de filtro UVA I aprovada pela FDA, mostrou-se fotoinstável e exibiu significativa permeação no estrato córneo e epiderme viável (HANSON *et al.*, 2020; KAVITHA; LAKSHMI, 2017; LI *et al.*, 2016).

Kavitha e Lakshmi (2017) demonstram evidências de que a Avobenzona, quando exposta à luz solar libera radicais livres, que podem causar câncer, além de problemas relacionados à infertilidade e disfunções congênitos. Outros estudos demonstram que as concentrações de Avobenzona aumentam conforme a substância se bioacumula e que há uma penetração significativa de produtos de degradação em até 10 µm na pele. Também foi identificada a presença desses produtos de degradação no plasma e urina humanos e em amostras de leite materno. Frente a estes dados, surge a necessidade de monitorar e quantificar componentes nocivos presentes em produtos de cuidado pessoal (ADLER; DELEO, 2020; COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018; TIPPAVAJHALA; MENDES; MARTIN, 2018; KAVITHA; LAKSHMI, 2017).

Um estudo de revisão realizado por Lores *et al* (2016) reúne e organiza os métodos utilizados para a determinação analítica de componentes cosméticos, dentre os quais estão os filtros UV. No que tange a AVO, ela pode ser analisada tanto em produtos cosméticos em geral como em protetores solares propriamente ditos. Geralmente, os métodos mais utilizados são os cromatográficos, como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), cromatografia de camada fina (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*) e cromatografia em fluido supercrítico (SFC, do inglês *Supercritical Fluid Chromatography*) acoplados a diversos detectores (KAVITHA; LAKSHMI, 2017; LORES *et al.*, 2016; CERESOLE *et al.*, 2013).

Galimany-Rovira e colaboradores (2016), ao analisarem simultaneamente seis componentes de um creme clareador da pele por RP-HPLC (RP é fase reversa, do inglês *reverse phase*) obtiveram um pico adicional no cromatograma. Após análise, os autores concluíram que o pico extra tinha a mesma fórmula molecular da AVO e se tratava do tautômero ceto. Abid *et al* (2017) utilizaram-se do fato dos isômeros poderem ser separados por HPLC para avaliar a fotoestabilidade da AVO em diferentes condições. No cromatograma obtido, o primeiro componente a eluir trata-se da forma ceto e em seguida o isômero enol. Ambas as separações foram realizadas utilizando-se como eluente acetonitrila:água (ABID *et al.*, 2017; GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de diferentes métodos de separação vai ao encontro das frequentes atualizações na legislação de cosméticos. Por isso, torna-se importante melhorar as ferramentas analíticas utilizadas para atender aos requisitos de segurança exigidos pelas agências reguladoras. Além da otimização dos parâmetros analíticos de validação, a utilização de métodos considerados “verdes” está cada vez mais ganhando espaço. Nesse sentido, diferentes propostas baseadas em eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) foram relatadas e tornam-se cada vez mais importantes, com potencial a ser explorado, tanto para abordagem de um único analito, como para multianalitos (LORES *et al.*, 2016; HSIAO *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2015).

2.3 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é um método de separação desenvolvido inicialmente por Arne Wilhelm Kaurin Tiselius nos anos 1930. Baseia-se nas diferentes velocidades de migração de espécies carregadas sob ação de um campo elétrico. Ao longo dos anos, foi sendo aperfeiçoada e, em 1983, Jorgenson e Lukacs introduziram a utilização de capilares no sistema eletroforético. O uso do capilar oferece vantagens sobre os outros meios utilizados, como permitir a realização de separações com a aplicação de altas voltagens, resultando em um aumento de eficiência, resolução e velocidade de análise. Portanto, a eletroforese capilar é definida como uma técnica de separação baseada na diferença de migração dos compostos na presença de um campo elétrico (SKOOG *et al.*, 2014; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; JORGENSON; LUKACS, 1983).

Algumas vantagens da técnica fazem com que ela seja uma ferramenta importante para a solução de problemas analíticos envolvendo separações, a saber: a simplicidade instrumental, facilidade de automação e possibilidade de desenvolvimento rápido de métodos.

Outros pontos positivos são consumo mínimo de reagentes e solventes, pouco volume de amostra requerida para análise, baixa geração de resíduos, tempos de análise curtos e compatibilidade com diversos sistemas de detecção. A CE também oferece a possibilidade de alcançar alta frequência analítica com alta eficiência, fazendo com que atenda a diversos pressupostos da Química Verde (SKOOG et al., 2014; PIÑERO; BAUZA; ARCE, 2011; ALTRIA; MARSH; GRIEND, 2006;).

As separações em CE que utilizam mecanismos e seletividade característica podem ser chamadas de modos. Existem diferentes modos de CE, baseados principalmente na natureza do meio de separação introduzido no capilar e nas características dos analitos a serem separados. Entre os modos mais populares, destaca-se a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*). Nos últimos anos, vem ganhando espaço a cromatografia eletrocínética, que é um modo híbrido entre HPLC e CE, oferecendo algumas das melhores características dos dois métodos. Nesta modalidade, fluxo eletrosmótico (EOF), devido à dupla camada elétrica que se desenvolve na interface entre a sílica e a solução, se comporta como a fase móvel (FM) que carrega os analitos em direção ao detector. Durante o processo os analitos também podem interagir com a fase pseudo-estacionária que preenche o capilar. Dentre as vantagens, ressaltam-se separações altamente eficientes empregando microvolumes de solução da amostra, o bombeamento eletrosmótico produz um perfil plano em vez do parabólico, resultando em bandas estreitas e, assim, altas eficiências de separação. A tabela 2 destaca as principais características da CZE e dos modos de cromatografia eletrocínética (ÁLVAREZ-RIVERA; CIFUENTES; CASTRO PUYANA, 2018; SAKO, 2015; SKOOG et al., 2014; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Tabela 2 – Modos de Eletroforese Capilar e suas principais características.

Modo	Características
CZE Eletroforese capilar de zona	É o modo mais utilizado. A amostra é injetada dentro da coluna capilar previamente preenchida com o eletrólito de corrida e o potencial é aplicado gerando um campo elétrico, fazendo com que os analitos migrem dentro do capilar em zonas distintas, sendo separados de acordo com as diferentes mobilidades efetivas.
MEKC Cromatografia eletrocinética micelar	Aplicada principalmente para a análise de compostos neutros, o mecanismo de separação se baseia na partição diferenciada dos analitos entre a fase móvel e uma fase pseudo-estacionária composta por micelas. A mobilidade efetiva será resultante da mobilidade do EOF e da mobilidade da própria micela.
MEEKC Cromatografia eletrocinética em microemulsão	Neste modo o princípio de separação se baseia na partição dos solutos entre a fase móvel e a fase pseudo-estacionária composta com microemulsões. Em comparação a MEKC, apresenta maior aplicabilidade, pois os solutos penetram mais facilmente na superfície de uma gota que na superfície de uma micela, que é mais rígida.

Fonte: Elaborada pela autora (2021), baseada em Sako (2015) e Spudeit, Dolzan e Micke (2012)

As separações em cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*) foram desenvolvidas inicialmente por Terabe *et al* (1984) para resolver a limitação relacionada à separação de compostos neutros em CE. Essa técnica envolve a introdução de um tensoativo em concentração na qual micelas são formadas, ou seja, acima da chamada concentração micelar crítica (CMC). As micelas podem incorporar compostos não-polares em seu interior, solubilizando-os. A separação baseia-se na partição diferenciada dos analitos entre o eletrólito e a “pseudo-fase” composta pelas micelas. A mobilidade efetiva é resultante da mobilidade do fluxo eletrosmótico e da mobilidade da própria micela. O surfactante mais utilizado em MEKC é o dodecil sulfato de sódio (SDS), com carga negativa, tendendo a migrar para o ânodo. Os analitos neutros irão interagir com as micelas, dependendo do seu coeficiente de partição específico (ÁLVAREZ-RIVERA; CIFUENTES; CASTRO PUYANA, 2018; SKOOG *et al.*, 2014; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; TERABE *et al.*, 1984).

Entretanto, devido ao seu mecanismo de separação, moléculas altamente apolares (logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, $\log P_{o/w} > 5$) podem não ser bem resolvidas pela técnica, sendo necessário aprimorar a mesma. Por isso, outro modo que se baseia na utilização de surfactantes é a cromatografia eletrocinética por microemulsão (MEEKC, do inglês *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*), relatada pela primeira vez por Watarai em 1991. A microemulsão (ME) é uma mistura opticamente transparente de líquidos

imiscíveis, composta por uma fase oleosa (FO) e uma fase aquosa (FA), estabilizadas por um surfactante em conjunto com co-surfactantes. O princípio de separação em MEEKC combina o mecanismo eletroforético com o cromatográfico, pela interação diferencial dos analitos nas microemulsões, consideradas como fase pseudo-estacionária. Os analitos podem particionar entre a gota de óleo e a fase aquosa, de acordo com a sua polaridade. A separação dos analitos neutros se dá de acordo com o coeficiente de particionamento entre as duas fases. Devido à composição das microemulsões, MEEKC pode ser usado para separar, ao mesmo tempo, compostos polares, apolares, iônicos e neutros (AMĂRIUTEI *et al.*, 2015; DERBINA *et al.*, 2015; SILVA J. *et al.*, 2015; GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013; CAO; SHENG, 2010; PYELL, 2006; WATARAI, 1991)

2.3.1 MEEKC

Desde que foi desenvolvida, MEEKC vem ganhando espaço como modo de separação eletroforética. Exibe separações rápidas e eficientes de uma ampla gama de compostos carregados e neutros, solúveis e insolúveis em água. Em comparação a MEKC, apresenta maior aplicabilidade, pois os solutos penetram mais facilmente na superfície de uma gota que na superfície de uma micela, que é mais rígida. Variando a composição da microemulsão, vários parâmetros podem ser explorados para otimizar a resolução e reduzir o tempo de análise. Sua gama de aplicações se estende para análises ambientais, de alimentos, produtos farmacêuticos e naturais, biomoléculas e separações quirais. Avanços vêm sendo desenvolvidos nas etapas de pré-concentração on-line e off-line, bem como na etapa de detecção, com o acoplamento ao detector de massas com fotoionização a pressão atmosférica, superando as desvantagens de uma matriz rica em surfactante (JAVED; AHSAN, 2019; YU *et al.*, 2012; WATARAI, 1991).

Nos últimos anos, as aplicações de MEEKC em produtos naturais abrangeram catequinas, ácidos fenólicos e flavonoides (WU *et al.*, 2018; CAO; DUN; QU, 2011), os curcuminoides: curcumina, desmetoxicurcumina e bis-desmetoxicurcumina (LI *et al.*, 2014), oito iso-flavonas (XIAO *et al.*, 2016), além da separação e quantificação das vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e D3 (colecalfiferol) (MOHORICĀ *et al.*, 2016), determinação de ligninas em amostras vegetais (CHU *et al.*, 2017) e separação de sesquiterpenos, incluindo curdina, curcumenol, germacrona, furanodieno e β -elemeno em medicamentos fitoterápicos (WEI *et al.*, 2018).

A diversidade de amostras analisadas por MEEKC vai desde medicamentos antidiabéticos: metformina e glibenclamida (AMĂRIUTEI *et al.*, 2015), aos conservantes ácido sorbico e ácido benzoico utilizados em maionese (DERBINA *et al.*, 2015). Felici e colaboradores (2016), desenvolveram método para a separação e determinação simultânea das lactonas macrocíclicas mais utilizadas como drogas antiparasitárias, ivermectina e moxidectina, em águas ambientais. A técnica também foi utilizada para determinar os fatores de capacidade de complexos de rutênio utilizados como agentes anticancer (GIRINGER *et al.*, 2018) e está inserida nas ciências forenses, como uma técnica promissora para exames de traço de batom (KRÓL *et al.*, 2020).

Outra aplicação importante da técnica consiste na determinação da lipofilicidade de compostos ácidos, neutros e básicos, utilizando a correlação entre o $\log P_{o/w}$ e o $\log K_{meekc}$ (razões de distribuição de massa) (SUBIRATS; REDÓN; ROSÉS, 2018; SUBIRATS *et al.*, 2016). O logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log P_{o/w}$) de solutos neutros também foi estimado pela técnica e o perfil do fator de retenção *versus* pH foi estabelecido. Atualmente, avalia-se a viabilidade de determinar a lipofilicidade de compostos ácidos parcialmente ionizados por MEEKC, bem como estimar seu coeficiente de partição octanol/água (FERNÁNDEZ-PUMAREGA *et al.*, 2018, 2019, 2020).

Além da ampla gama de aplicações, MEEKC se destaca pela versatilidade de matérias primas que podem ser utilizadas na composição das emulsões. Por exemplo, ciclodextrinas e nanotubos de carbono foram utilizados em associação com surfactantes e líquidos iônicos foram testados como fase oleosa (LIN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014; CAO; DUN; QU, 2011). Ainda, a inclusão de fosfatidilcolina torna a ME muito semelhante às membranas biológicas, sendo uma possível alternativa ao método de equilíbrio para avaliar solubilidade de fármacos (*shake flask*) (JAVED; AHSAN, 2019; XUAN *et al.*, 2015). Quanto a preocupação crescente e atual, que é a poluição ambiental, as metodologias desenvolvidas para MEEKC podem ser consideradas dentro do espectro da Química Analítica Verde (FELICI *et al.*, 2016).

2.4 MICROEMULSÕES

Dispersões coloidais ou emulsões são misturas de líquidos imiscíveis, compostas por gotas de um líquido (fase dispersa) em outro (fase contínua), estabilizadas por um surfactante, muitas vezes em conjunto com co-surfactantes. Sua aplicabilidade é difundida nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agroquímica e de cosméticos, principalmente para encapsular,

proteger e fornecer componentes ativos. Podem ser utilizadas como meio extrator, solubilizador e, seus usos e funcionalidades se estendem também ao campo de técnicas analíticas, como cromatografia, espectroscopia e eletroforese (VICENTINO *et al.*, 2020; DASGUPTA; RANJAN; GANDHI, 2019; FARAHIN *et al.*, 2019; HARWANS; DESHMUKH; RAHMAN, 2019; MARZUKI; WAHAB; HAMID, 2019; PAUL; MOULIK, 2001).

A formação destas estruturas foi documentada primeiramente por Hoar e Schulman (1943) ao observarem que, nas proporções corretas, água, óleo e surfactantes formaram dispersões transparentes e eletricamente neutras quando o óleo era a fase contínua ou, fortemente condutoras quando a fase contínua era uma solução aquosa. O termo microemulsão foi utilizado pela primeira vez em 1959, quando Schulman e colaboradores propuseram um mecanismo de formação e a estrutura das dispersões utilizando microscopia eletrônica. Por esta técnica foi estabelecido que tais dispersões consistem de gotículas esféricas uniformes de óleo ou água dispersas na fase contínua apropriada (SCHULMAN; STOECKENIUS; PRINCE, 1959; BOWCOTT; SCHULMAN, 1955; SCHULMAN; MATALON; COHEN, 1951; SCHULMAN; FRIEND, 1949; SCHULMAN; RILEY, 1948; SCHULMAN; MCROBERTS, 1946; HOAR; SCHULMAN, 1943).

Como principais características, as ME apresentam estabilidade termodinâmica, tensão interfacial reduzida (pelo emprego dos surfactantes), transparência óptica, isotropia, formação espontânea e diâmetro médio de gota de 10 a 200 nm. Entretanto, alguns conceitos são contraditórios na definição das ME, especialmente quanto ao seu tamanho. Normalmente, emulsões com tamanhos na faixa supracitada são chamadas de nanoemulsões (NE), porém, devido ao termo microemulsão ter sido usado primordialmente por Schulman, Stoeckenius e Prince em 1959, neste trabalho ME foi denominado para emulsões com diâmetro inferior a 200 nm (AUM *et al.*, 2021; SUJATHA *et al.*, 2020; JAVED; AHSAN, 2019; ROOHINEJAD *et al.*, 2018; SORADECH; KUSOLKUMBOT; THUBTHIMTHED, 2018; CALLENDER *et al.*, 2017; ALKRAD; MRESTANI; NEUBERT, 2016; AMĂRIUTEI *et al.*, 2015; DERBINA *et al.*, 2015; CAO; SHENG, 2010; PYELL, 2006; SCHULMAN; STOECKENIUS; PRINCE, 1959).

2.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Quando um novo método é proposto, ele deve passar por um processo de validação. Este processo é requerido para confirmar se as exigências específicas para o uso pretendido do método são atendidas, fornecendo evidências objetivas de que o método satisfaz os critérios preconizados. Diferentes protocolos de validação podem ser empregados e os parâmetros de validação, também conhecidos como figuras de mérito analítico, utilizados para relatar os resultados analíticos mais comuns são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (INMETRO, 2020; ANVISA, 2017; AOAC, 2016; SKOOG *et al.*, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

Antes mesmo de começar o processo de validação do método, deve-se verificar a conformidade do sistema, a fim de dar maior confiabilidade aos dados obtidos. Feito isso, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico. Caracteriza-se pela capacidade do método de identificar e/ou quantificar o analito de interesse, mesmo na presença de outros analitos, impurezas da amostra, componentes da matriz, diluentes ou produtos de degradação do próprio analito (INMETRO, 2020; ANVISA, 2017; SKOOG *et al.*, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade é a capacidade do método analítico fornecer respostas diretamente proporcionais a concentração do analito em uma amostra, dentro de uma determinada faixa de trabalho estabelecida, dependendo da aplicação a que se destina o método proposto. A correlação entre o sinal medido e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada é uma relação matemática, muitas vezes, expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão analisa a proximidade dos resultados obtidos exatamente da mesma forma. É avaliada pela dispersão dos resultados entre análises independentes e pode ser determinada pela repetição da análise em réplicas autênticas da amostra. Expressa por meio da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, em termos de parâmetros que demonstram o quanto cada resultado individual difere da média das réplicas. A exatidão mede a concordância entre o resultado obtido pelo método e o valor verdadeiro ou valor de referência aceito como verdadeiro, mensurada pelo erro absoluto ou relativo (INMETRO, 2020; ANVISA, 2017; SKOOG *et al.*, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito na amostra que pode ser distinguida com certo nível de confiança do ruído do equipamento, sendo detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se o método a ser validado. O limite de

quantificação (LQ) é a menor concentração de analito na amostra que pode ser quantificado pelo método utilizado. Na prática, é o limite inferior da faixa de concentração linear do método (INMETRO, 2020; ANVISA, 2017; SKOOG *et al.*, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

2.6 OBJETIVOS

2.6.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico para monitorar os isômeros ceto e enol da Avobenzona em produtos cosméticos, utilizando técnicas de separação em meio líquido.

2.6.2 Objetivos Específicos

- Realizar a separação dos isômeros da Avobenzona utilizando Cromatografia Eletrocínética por Microemulsão e Cromatografia Líquida.
- Caracterizar as microemulsões desenvolvidas pelas técnicas de espalhamento dinâmico da luz e microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar a estabilidade da Avobenzona frente a radiação UV pelo método MEEKC desenvolvido.
- Avaliar os parâmetros de mérito analítico das metodologias desenvolvidas para quantificação dos analitos em amostras de protetor solar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para preparo das soluções foi utilizada água ultrapura (H₂O), obtida em sistema *Milli-Q* da marca *Millipore*®, com resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. Utilizou-se acetonitrila, álcool metílico e dimetil sulfóxido grau HPLC da marca *Tédia*. Dodecil sulfato de sódio *dust-free pellets*, tetraborato de sódio (TBS), a fase oleosa n-heptano grau HPLC e o padrão interno *t*-Anetol da *Sigma Aldrich*®. Álcool n-butílico, fosfato de sódio monobásico anidro (NaH₂PO₄) e ácido o-fosfórico 85% da *Synth*®. Hidróxido de Sódio (NaOH) em micro pérolas P.A. da marca *Vetec*. O padrão cosmético de Avobenzona foi gentilmente fornecido por empresa do setor privado. A priori, foram preparadas soluções de NaOH 1,0 mol L⁻¹, TBS 0,1 mol L⁻¹ (tampão borato) e NaH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ (tampão fosfato). Soluções padrão de Avobenzona foram preparadas em DMSO e ACN na concentração de 1000 mg L⁻¹.

As microemulsões de óleo (fase dispersa) em água (fase contínua) foram preparadas baseando-se em Cao e Sheng (2010). Utilizou-se 3,3% (m/m) de SDS, 6,6% (m/m) de n-butanol e 0,8% (m/m) de n-heptano. O volume do balão foi completado com tampão fosfato 10 mM (pH 2,5). A mistura foi sonicada por 30 minutos, a fim de se obter uma solução opticamente transparente. Após, filtrada em um filtro PTFE de 0,45 µm, com o objetivo de remover possíveis partículas suspensas. A solução foi armazenada em frasco de cor âmbar sob temperatura ambiente para uso posterior.

3.2 AMOSTRAS

O apêndice A apresenta tabela com as amostras utilizadas neste trabalho, bem como sua respectiva lista de composição. Os compostos especificados correspondem aos listados nas embalagens adquiridas em 25 de março de 2021 em farmácia do Bairro Trindade, na cidade de Florianópolis/SC. Uma vez que as formulações podem ser ajustadas regularmente para incorporar novas descobertas científicas, a declaração de componentes especificada na embalagem se aplica em cada caso e pode não corresponder ao estado atual de produção.

O preparo das amostras se deu conforme Lin *et al* (2015), pesando-se 100 mg do cosmético e adicionando 1 mL de ACN. Em seguida, as amostras são agitadas em vórtex por 4 min e centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm. A alíquota do sobrenadante foi filtrada em um

filtro PTFE de 0,45 μm . Antes das análises, a amostra foi diluída no respectivo eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*) ou fase móvel dependendo do método empregado. A preparação e análise das amostras foi realizada em triplicata.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados para a realização deste trabalho foram:

- Agitador multiplataformas para tubos e placas modelo *K40-10208* marca *Kasvi*;
- Analisador de Potencial Zeta e tamanho de partícula modelo *NanoBrook 90Plus* da marca *Brookhaven Instruments Corporation* com unidade titulara BI-ZTU
- Balança analítica modelo *AX2008*, marca *Shimadzu*;
- Banho de ultrassom, frequência ultrassônica 42 kHz, marca *Cristófoli*;
- Centrífuga, modelo *MiniSpin Plus*, marca *Eppendorf*;
- Cromatógrafo Líquido modelo *1200 Series* marca *Agilent Technologies* equipado com detector de arranjo de diodos (DAD).;
- Eletroforese Capilar HP CE^{3D} marca *Agilent Technologies*, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD).
- Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) JEOL JEM1011 100 kV
- Microscópio óptico monocular modelo 640x 116/AL LED marca *OPTON*
- pHmetro, modelo *B-474*, marca *microNal*; com eletrodo de referência de Ag/AgCl.
- Sistema *Milli-Q*[®] de Água Ultrapura Tipo 1 marca *Merck*

O tratamento de dados, a análise estatística, confecção de gráficos e plotagem das curvas foi realizada utilizando os softwares *Past*, *Origin* e Pacote *Office 365*.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Eletroforese Capilar

As análises eletroforéticas foram realizadas em equipamento de eletroforese capilar modelo HP CE^{3D} fabricado pela *Agilent Technologies*, equipado com detector de arranjo de diodos (190-700nm). Foram utilizados capilares de sílica fundida da marca *NST*, com revestimento externo de poli-imida, com 375 μm de diâmetro externo, com 50 μm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total (L_{Tot}) e 40 cm de comprimento efetivo de separação (L_{Det}) quando a amostra é injetada pela extremidade mais distante do detector. Quando a amostra é injetada pela extremidade mais próxima ao detector, o comprimento

efetivo de separação é de 8,5 cm. O condicionamento inicial dos capilares foi realizado utilizando pressão de 940 mbar durante 30 minutos com NaOH 1,0 mol L⁻¹ seguido por 30 minutos de H₂O deionizada. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com 5 minutos de NaOH, 5 minutos de H₂O e 5 minutos com eletrólito de corrida, todos com 940 mbar de pressão. Os capilares foram mantidos a temperatura de 20 °C durante as análises. As amostras e os padrões foram inseridos no capilar pela extremidade mais próxima ao detector (*outlet*, L_{Det} = 8,5 cm) e também pela mais distante (*inlet* L_{Det} = 40 cm), por injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 5 segundos ou injeção eletrocínética, aplicando-se 10 kV por 5 segundos. Para a separação foi aplicada uma tensão de 20 kV com polaridade positiva (pelo *outlet*) ou negativa (pelo *inlet*). A detecção dos analitos foi realizada nos comprimentos de onda (λ) de 254 nm e 360 nm. Para aquisição e tratamento de dados foi utilizado o software *Chemstation*®, versão Rev. B.04.03 [16] fornecido pelo fabricante do equipamento.

3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As separações cromatográficas foram feitas empregando-se sistema HPLC-DAD *Agilent Technologies 1200 Series*, equipado com detector de arranjo de diodos, degaseificador online, bomba quaternária, que conduziu a fase móvel empregada em um gradiente de água e acetonitrila, de 0 a 5 minutos 60% de ACN e 40% de H₂O; entre 5 e 10 minutos 100% de ACN e; de 10 a 20 minutos, retorna para 60% de ACN e 40% de H₂O. O fluxo da fase móvel foi de 0,250 mL·min⁻¹ e pressão máxima de 400 bar. Utilizou-se coluna *Synergi Polar-RP* (150 mm x 2 mm), com tamanho de partícula de 4 µm e porosidade de 80 Å, marca *Phenomenex*. A temperatura da coluna durante a análise foi mantida em 30 °C. O volume de injeção das amostras foi de 5 µL, utilizando um amostrador automático. Os analitos foram monitorados em comprimento de onda 256 nm e 360 nm. Para aquisição e tratamento de dados foi utilizado o software *Chemstation*®, versão Rev. B.04.03 [16] fornecido pelo fabricante do equipamento.

3.4.3 Caracterização das ME

3.4.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz

Medidas de tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI, do inglês *Polydispersity Index*) foram realizadas por espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês

Dynamic Light Scattering), em equipamento *NanoBrook 90Plus* da marca *Brookhaven Instruments Corporation*, disponível no Laboratório de Fluorescência Molecular (Laboratório 203, Departamento de Química – UFSC). Este equipamento também foi utilizado para medidas de potencial zeta. Para as análises, foram utilizadas cubetas de quartzo e ângulo de medida 90°. As medidas foram realizadas em triplicata com duração de 30 segundos cada, na temperatura de 25 °C, utilizando água como solvente e índice de refração real 1,33. As amostras foram analisadas sem diluição, no dia do preparo (dia 0) e nos dias 07, 14, 21 e 28 após o preparo, com o objetivo de monitorar a estabilidade.

3.4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*) foram obtidas utilizando Microscópio JEM 1011, operando a voltagem de aceleração de 100 kV, disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME – UFSC). Grades (*grids*) de cobre revestidas com filme polimérico carbono/Formvar, 200 mesh da marca *Pelco* foram preparados 24 horas antes das análises. As amostras foram gotejadas sobre os *grids* e aguarda-se a secagem à temperatura ambiente.

3.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

3.5.1 Conformidade do sistema

Neste trabalho, utilizaremos os parâmetros fator de retenção (k), resolução (R_s) e número de pratos (N), calculados de acordo com Skoog *et al* (2014), conforme apresentado nas equações 1, 2 e 3, respectivamente. Os valores de fator de retenção devem ser maiores que 2, indicando que o pico de interesse está bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido. Para a resolução valores acima de 1,5 que já indicam que houve separação entre os picos, embora um bom valor de resolução deva ser maior que 2 entre o pico de interesse e o interferente mais próximo. Para o número de pratos os valores calculados devem estar acima de 2000 (SKOOG *et al.*, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

onde t_R é o tempo de retenção do analito e t_0 é o tempo de retenção da fase móvel (ou tempo morto ou tempo de retenção de um composto não retido).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

onde t_R é o tempo de retenção e w é a largura do pico na linha de base

$$RS = 2 \left(\frac{t_{Rb} - t_{Ra}}{w_a + w_b} \right) \quad (3)$$

onde t_{Rb} e t_{Ra} são os tempos de retenção dos picos adjacentes e w_a e w_b são as larguras dos picos na linha de base.

3.5.2 Seletividade

A confirmação da pureza do pico deve ser realizada antes que as informações quantitativas do pico sejam usadas para cálculos adicionais. Os equipamentos da marca *Agilent Technologies*, possuem no software *Chemstation*® uma ferramenta que permite avaliar experimentalmente a pureza do pico, também conhecida como homogeneidade espectral do pico. Esta ferramenta foi utilizada para determinar a seletividade do método proposto, verificando se ocorre a sobreposição de picos pela análise dos espectros de UV coletados pelo detector de arranjo de diodos. Também foram avaliados os valores de *Purity factor* e *Threshold*.

3.5.3 Linearidade

Para verificar a faixa linear de trabalho, foram construídas curvas de calibração da solução padrão de AVO, em triplicata, com cinco níveis de concentração distribuídos de forma equidistante, na faixa de 20 a 100 mg L⁻¹ para HPLC e de 70 a 350 mg L⁻¹ para CE. Os parâmetros da curva foram obtidos pelo método matemático de regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2) foi avaliado com ajuste de valores acima de 0,99, conforme recomendado pela ANVISA (2016) pois, quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A sensibilidade (coeficiente angular da regressão linear) e a significância da

regressão foram validadas pelo teste F de *Fisher-Snedecor* e a normalidade da distribuição pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Todos os testes estatísticos foram realizados com um nível de significância de 5%.

3.5.4 Precisão e Exatidão

A precisão foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação (CV) conforme equação 4, tendo como parâmetro de resposta as áreas e os tempos de retenção dos picos referentes aos analitos.

$$CV (\%) = \frac{s}{x} * 100 \quad (4)$$

onde s é a estimativa do desvio padrão amostral e x é a média das replicatas.

A equação 5, também conhecida como equação de Horwitz (INMETRO, 2020), foi utilizada para calcular os valores de CV máximos, de acordo com a concentração de trabalho nas amostras analisadas.

$$CV (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (5)$$

onde C é a razão da concentração na amostra.

A precisão instrumental foi determinada através da injeção consecutiva de uma solução padrão do ponto médio da curva de calibração por dez vezes. A repetibilidade foi observada ao analisar três injeções consecutivas de soluções de padrões em três níveis de concentrações: 20, 60 e 100 mg L⁻¹ para HPLC e 71, 214 e 357 mg L⁻¹ para CE. A precisão intermediária foi verificada da mesma forma que a repetibilidade, por injeção dos padrões em três níveis de concentração em triplicata, porém em diferentes dias, ao longo de duas semanas.

A exatidão do método proposto foi verificada através de testes de recuperação das amostras fortificadas em três níveis de concentração da curva de calibração: 20, 60 e 100 mg L⁻¹ para HPLC e 71, 214 e 357 mg L⁻¹ para CE, preparadas em triplicata e injetadas de forma aleatória. A recuperação foi calculada conforme equação 6:

$$Rec (\%) = \frac{(C_{amostra\ fortificada} - C_{amostra\ não\ fortificada})}{C_{adicionada}} * 100 \quad (6)$$

sendo $C_{amostra\ fortificada}$ a concentração da amostra mais a concentração do padrão adicionado, $C_{amostra\ não\ fortificada}$ somente a concentração da amostra e, $C_{adicionada}$ a concentração do padrão adicionado.

3.5.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados pelo método baseado nos parâmetros da curva de calibração. O limite de detecção foi calculado conforme equação 7 e o limite de quantificação, de maneira semelhante ao LD, conforme equação 8,

$$LD = 3,3 \frac{s}{m} \quad (7)$$

$$LQ = 10 \frac{s}{m} \quad (8)$$

onde s é o desvio padrão do coeficiente linear e m o coeficiente angular ou inclinação da curva de calibração.

3.6 SEGURANÇA E RESÍDUOS

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, calçado fechado e calças para a realização dos experimentos. Os resíduos líquidos e sólidos, foram previamente tratados quando possível. Em seguida, todo resíduo gerado foi descartado no sistema de resíduos líquidos e sólidos presente no laboratório para destinação final.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

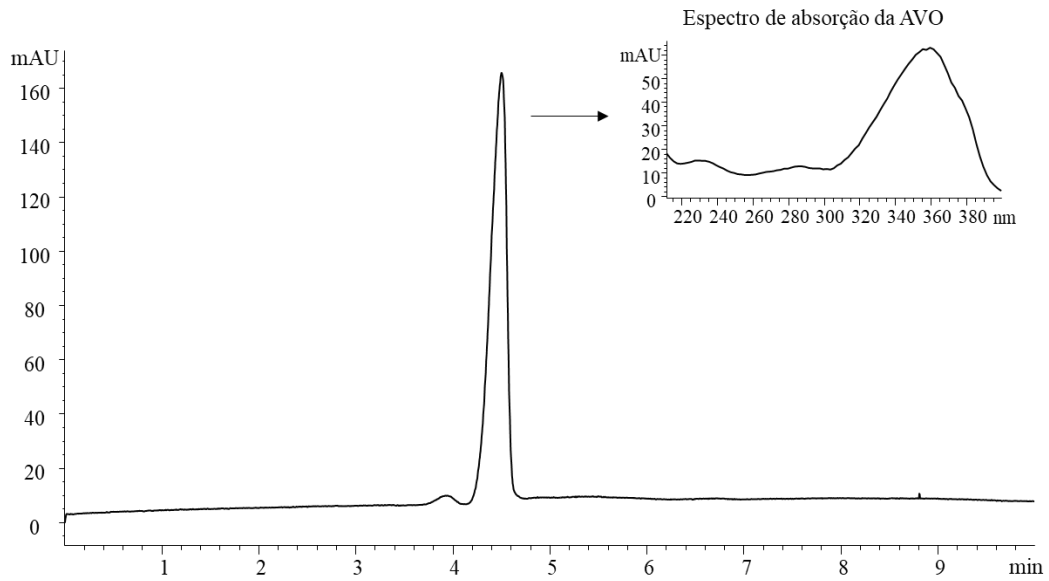
4.1 ELETROFORESE CAPILAR

4.1.1 Desenvolvimento do método

A partir da microemulsão proposta por Cao e Sheng (2010), obteve-se a primeira formulação, composta por 0,8% de n-heptano, 3,3% de SDS, 6,6% n-butanol e 89,3% de tampão borato 10 mM com pH = 9,2. Esta formulação foi chamada de ME Básica, a tabela 3 apresenta as principais formulações testadas neste trabalho. Como o surfactante utilizado no preparo é aniônico, a gota de óleo emulsionada fica negativamente carregada, migrando eletroforéticamente em direção ao ânodo (eletrodo positivo), direção oposta ao EOF (migra do ânodo para o cátodo). A velocidade de migração é a soma da velocidade do fluxo com a velocidade da ME e, neste caso elas são opostas. Porém, devido ao pH do BGE ser alcalino, espera-se que a migração ocorra na direção do cátodo (eletrodo negativo).

A primeira tentativa de separação com a ME desenvolvida foi executada sob as seguintes condições: capilar de 32,5 cm (L_{tot}) e 50 μ m de diâmetro interno, injeção hidrodinâmica (50 mbar/5 s) pelo *inlet* e voltagem aplicada de +20 kV. A amostra utilizada consistia em padrão de AVO na concentração de 100 mg L⁻¹. Como é possível observar no eletroferograma da figura 3, o pico referente a AVO aparece após 4,5 minutos, porém durante a corrida, a corrente medida era superior a 100 mA, o que poderia causar efeito Joule e reduzir a eficiência dos picos. Dessa forma, optou-se por substituir o capilar de 32,5 cm por um de 48,5 cm, com o propósito de reduzir o campo elétrico e, conseqüentemente, reduzir o efeito Joule, pois a dissipação de calor é maior e o sistema permanece mais estável.

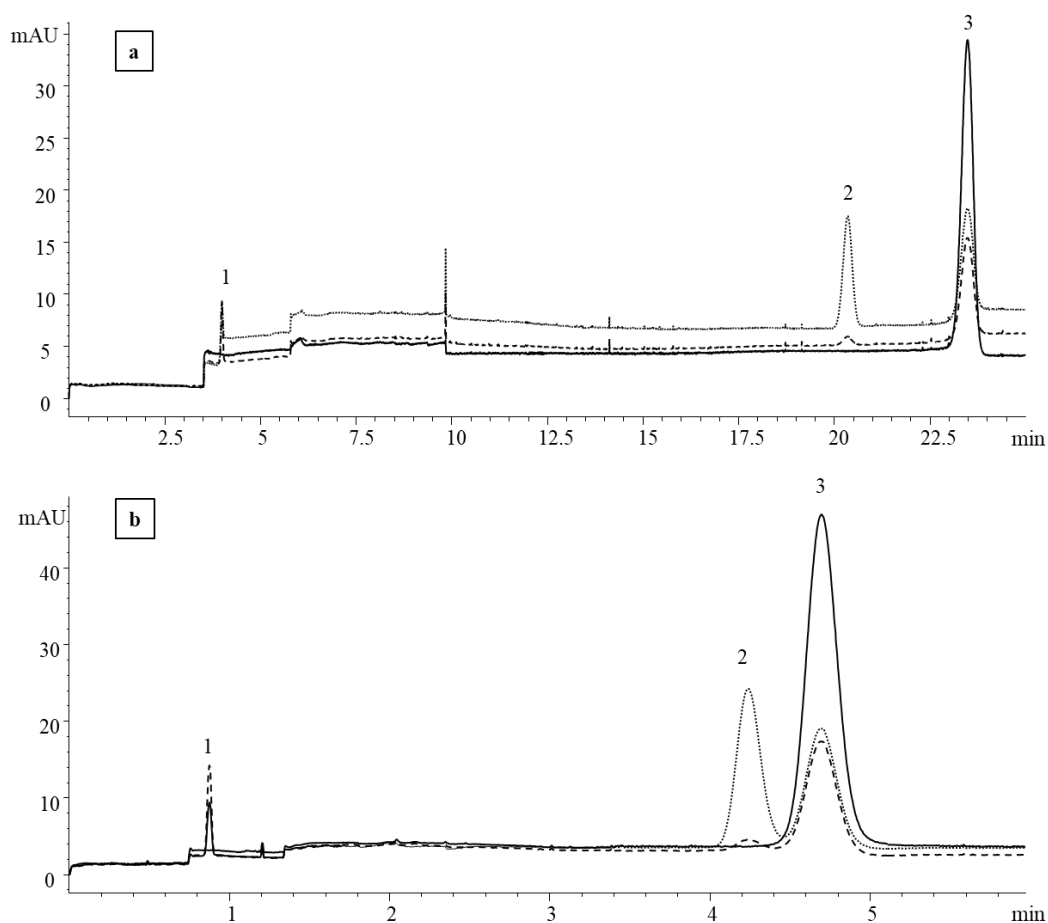
Figura 3 – Eletroferograma da solução padrão de AVO em MEEKC.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Utilizando um capilar de 48,5 cm (L_{tot}), mantendo-se as demais condições da separação anterior, ou seja, 50 μm de diâmetro interno, injeção hidrodinâmica (50 mbar/5 s) pelo *inlet* e voltagem aplicada de +20 kV, novamente a amostra padrão de AVO 100 mg L⁻¹ foi injetada. Desta vez dois compostos auxiliares foram utilizados, a fim de determinar a “janela de separação”. A tioureia foi escolhida como composto não retido, pois, devido sua elevada polaridade, interage com a fase aquosa e marca o início da janela de separação. O naftaleno foi o segundo composto selecionado. Por ser fortemente apolar, espera-se que o composto fique muito retido. Dessa forma, o naftaleno interage muito com a fase oleosa e marca o fim da janela de separação. O pico referente à AVO apareceu após o pico referente ao naftaleno, como podemos observar no eletroferograma da figura 4a, em uma separação de 25 minutos. A ordem dos picos pode ser justificada pelo $\log P_{o/w}$ do naftaleno ser igual a 3,3 e o $\log P_{o/w}$ da AVO ser 4,8. O $\log P_{o/w}$ estima a solubilidade das substâncias e, quanto maior seu valor, menos solúvel na fase aquosa.

Figura 4 – Determinação da janela de separação do método.



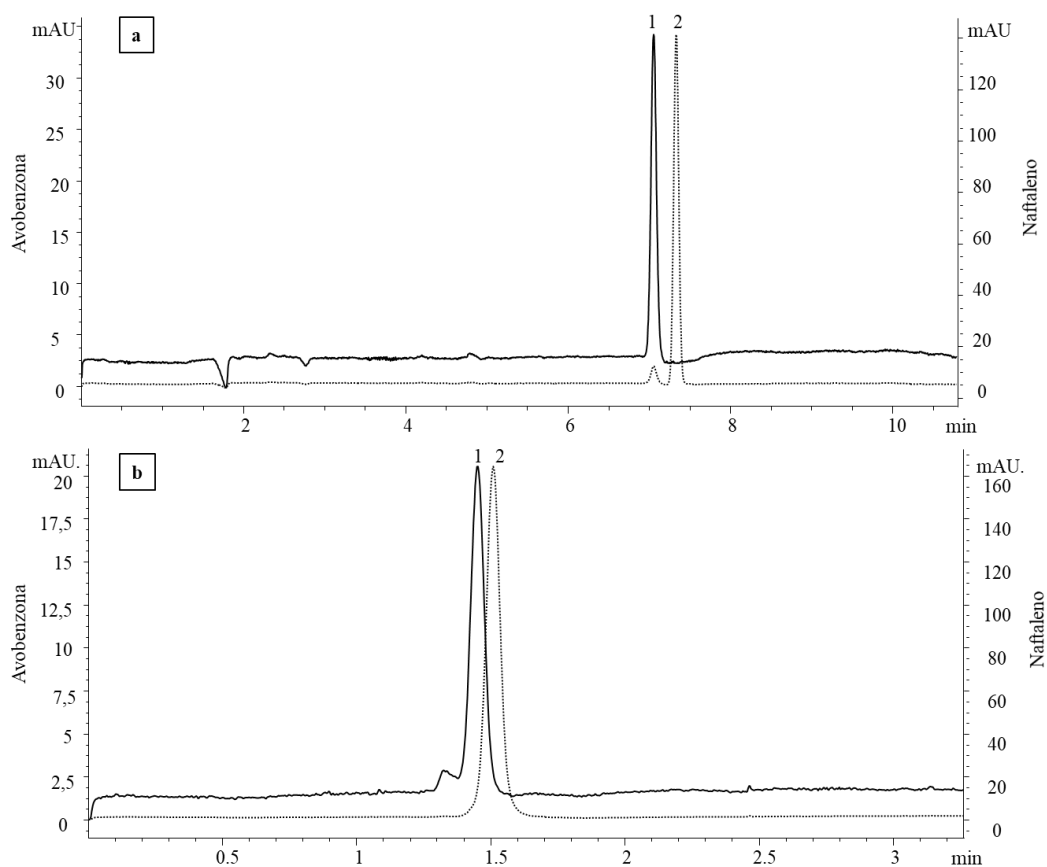
a) injeção pelo *inlet*; b) injeção pelo *outlet*. Pico 1: tiureia ($\lambda = 230$ nm). Pico 2: naftaleno ($\lambda = 220$ nm). Pico 3: avobenzona ($\lambda = 360$ nm). Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A separação também foi realizada pela extremidade mais próxima do detector, com as mesmas condições acima descritas, porém, aplicou-se -50 mbar/3 s para a injeção e a voltagem foi alterada para -20 kV. Devido a injeção da amostra ser realizada pela extremidade do capilar mais próxima ao detector, o tempo de separação diminui, por uma razão de 4,7 vezes, sendo inferior a 6 minutos, como observado no eletroferograma da figura 4b.

Como alternativa para melhorar a separação e deixá-la ainda mais rápida, uma segunda formulação foi preparada, de maneira semelhante a anterior, porém, desta vez, como a utilização de tampão fosfato 10 mM (pH = 2,5). Esta formulação foi chamada de ME Ácida (vide tabela 3). Devido ao pH ácido do eletrólito, a mobilidade do EOF é praticamente desprezível (VITALI *et al.*, 2014). Portanto, a migração dos analitos ocorre em direção ao ânodo (ou eletrodo positivo), pois a ME apresenta carga negativa ao mesmo tempo que a mobilidade do fluxo eletrosmótico pode ser considerada nula. Essa separação é diferente da

observada na formulação de ME Básica, onde o fluxo eletrosmótico carrega o meio na direção do eletrodo de carga negativa com intensidade suficiente para arrastar a ME e o analito em direção ao cátodo. Assim, mantiveram-se as condições das separações anteriores, com o capilar de 48,5 cm (L_{tot}) e 50 μm de diâmetro interno. O padrão de AVO 100 mg L^{-1} foi injetado pelo *inlet* de modo hidrodinâmico (50 mbar/5 s) e voltagem aplicada foi de -20 kV (para análise com BGE ácido). Pelo *outlet*, o padrão foi injetado de modo hidrodinâmico (-50 mbar/5 s) e voltagem aplicada foi de $+20$ kV na injeção. Os eletroferogramas podem ser observados na figura 5:

Figura 5 – Eletroferogramas da solução padrão de AVO em MEECK com BGE ácido.



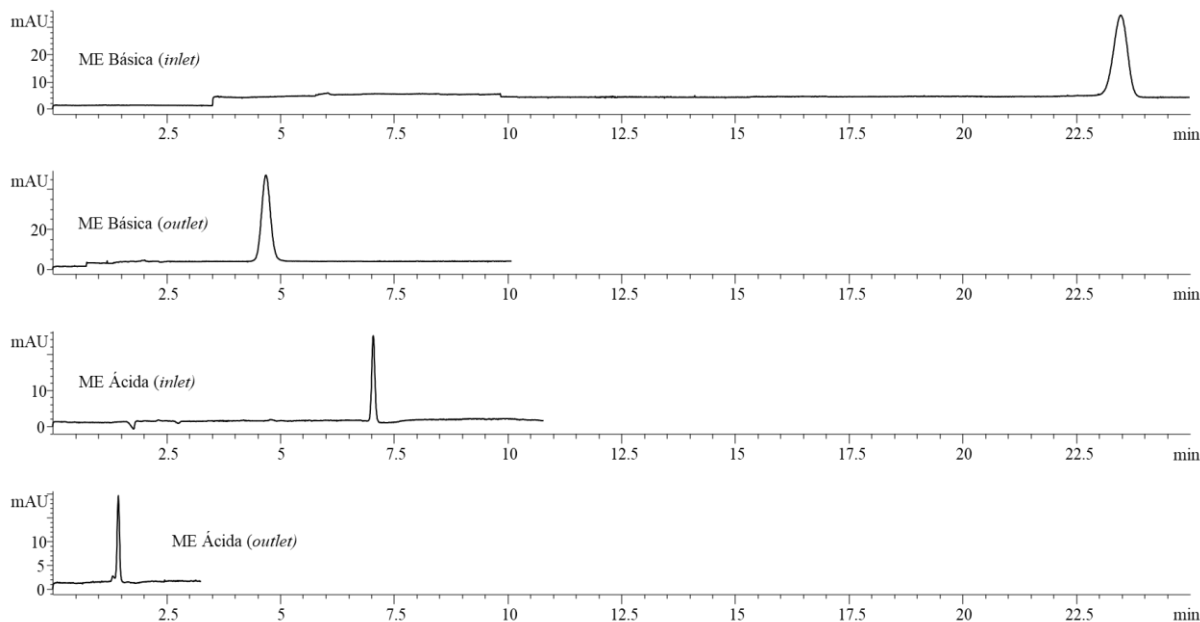
a) injeção pelo *inlet*; b) injeção pelo *outlet*. Pico 1: avobenzone ($\lambda = 360$ nm). Pico 2: naftaleno ($\lambda = 220$ nm).

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O pico referente à tioureia não aparece pois, devido a “ausência” do EOF, os analitos migram exclusivamente por interação com as ME e, como a tioureia não interage com as ME, ela não foi detectada. Além do fato de que o pico referente à AVO migrou antes que o pico do naftaleno, é possível observar uma diminuição no tempo de separação: pelo *inlet* diminui de 23 minutos com a ME Básica para 7 minutos com a ME Ácida e pelo *outlet* de 4,5 minutos

com a ME Básica para menos de 1,5 minutos com a ME Ácida. Na figura 6 podemos observar esta comparação:

Figura 6 – Comparação entre as separações* em BGE básico e ácido, pelo *inlet* e *outlet*.



*Pico referente a AVO. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

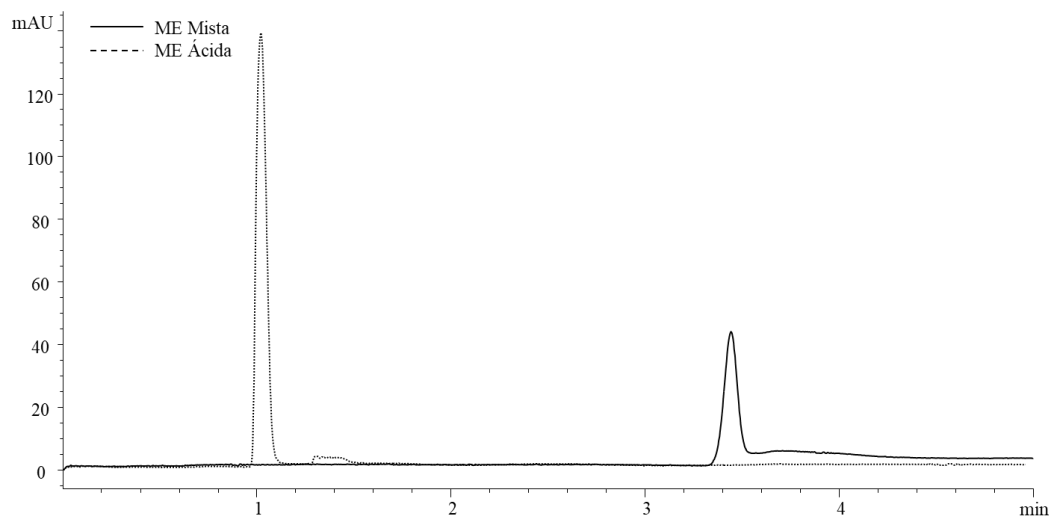
Tabela 3 – Principais formulações utilizadas.

Composição	%	Formulação 1 ME Básica	Formulação 2 ME Ácida	Formulação 3 ME Mista
Fase Oleosa	0,8	n-heptano	n-heptano	n-heptano
Surfactante	3,3	SDS	SDS	SDS + Pluronic® F127 (1:1)
Co-surfactante	6,6	n-butanol	n-butanol	n-butanol
Fase Aquosa	89,3	Tampão borato	Tampão fosfato	Tampão fosfato
pH		9,2	2,5	2,5

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Como o objetivo do trabalho é separar os isômeros ceto-enol da AVO, modificações na formulação da ME foram realizadas. Considerando por base a ME Ácida, foi realizada uma mistura de surfactantes: surfactante não iônico (Pluronic® F127) e surfactante aniônico (SDS) na mesma proporção, resultando na formulação que chamamos de ME Mista (vide tabela 3). Como observado na figura 7, a adição do surfactante não iônico, nas mesmas condições de separação, aumentou o tempo de migração do pico referente a AVO de 1 para 3,5 minutos e não houve a separação dos isômeros.

Figura 7 – Comparação entre os eletroferogramas da solução padrão de AVO em MEEKC com ME Ácida e ME Mista.

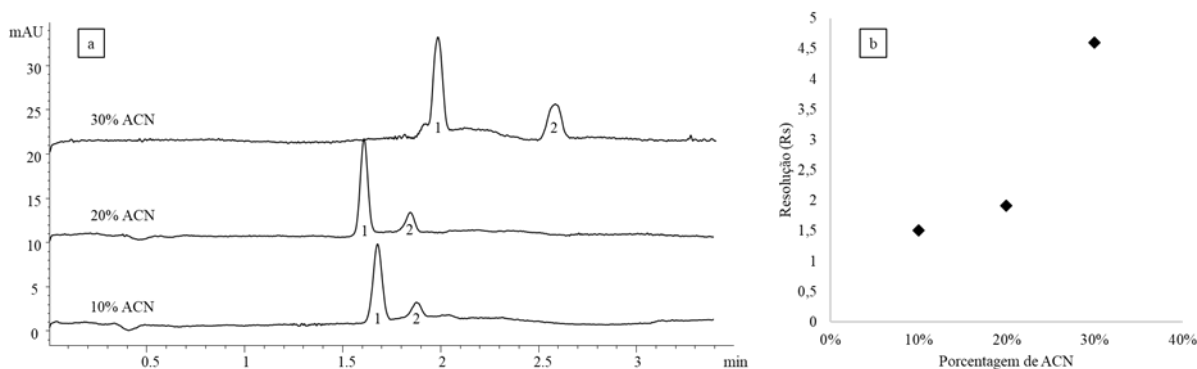


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Outras formulações também foram testadas, baseadas nos trabalhos de Klampfl, Leitner e Hilder (2002) e Hsieh, Wang e Wu (2013). Porém, não obtiveram sucesso na separação dos isômeros ceto-enol. Baseado em estudos de separação dos isômeros da AVO por HPLC (LEBEDEV *et al.*, 2020; ABID *et al.*, 2017; GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016), foram feitas adições de ACN ao BGE composto pela ME Ácida, mantendo-se as condições de separação citadas anteriormente. Os resultados obtidos podem ser observados nos eletroferogramas da figura 8a.

Inicialmente 10% de ACN foi adicionado ao BGE e foi possível observar um princípio de separação dos isômeros. Em seguida, ao adicionar 20% de ACN ao BGE, a separação dos isômeros foi completa. Quando adicionado 30% de ACN, a separação dos isômeros ocorre, porém há um aumento de ruído na linha de base. Outro parâmetro avaliado foi a resolução dos picos, conforme figura 8b. Com adição de 10% de ACN a R_s foi de 1,5. Ao adicionar 20% de ACN ao BGE, a R_s calculada é próxima a 2, sendo uma condição satisfatória, visto que, ao adicionar 30% de ACN a R_s é de 4,5 mas o tempo de separação é maior e o ruído da linha base tende a aumentar.

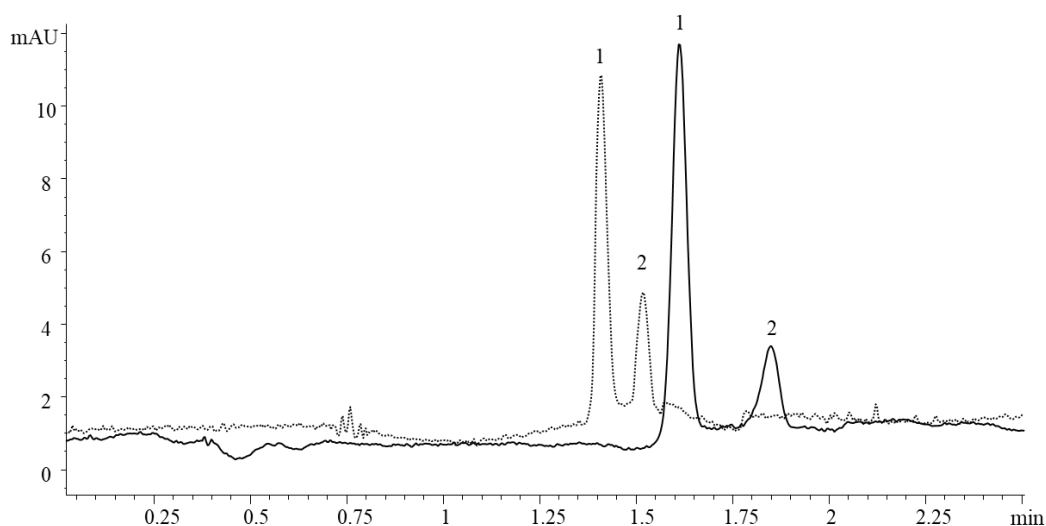
Figura 8 – (a) Eletroferogramas da solução de AVO em MEEKC com ME ácida e diferentes concentrações de ACN. (b) Resolução dos picos para diferentes concentrações de ACN.



$\lambda = 254 \text{ nm}$. Pico 1: forma ENOL. Pico 2: forma CETO. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Portanto, definiu-se que a porcentagem de 20% de ACN no BGE é uma condição satisfatória para a separação dos isômeros. Por isso, a mesma foi incorporada na composição da ME, com a finalidade de diminuir uma etapa no preparo do eletrólito de corrida. O resultado da separação obtida com este BGE pode ser observado na figura 9, onde constatou-se a separação dos isômeros ceto-enol da AVO. Porém, o ruído da linha base é maior, em comparação com o BGE composto pela ME Ácida e ACN na proporção 4:1.

Figura 9 – Comparação entre os eletroferogramas da solução padrão de AVO em MEEKC com ME ácida e 20% de ACN adicionados durante o preparo e após o preparo da ME.

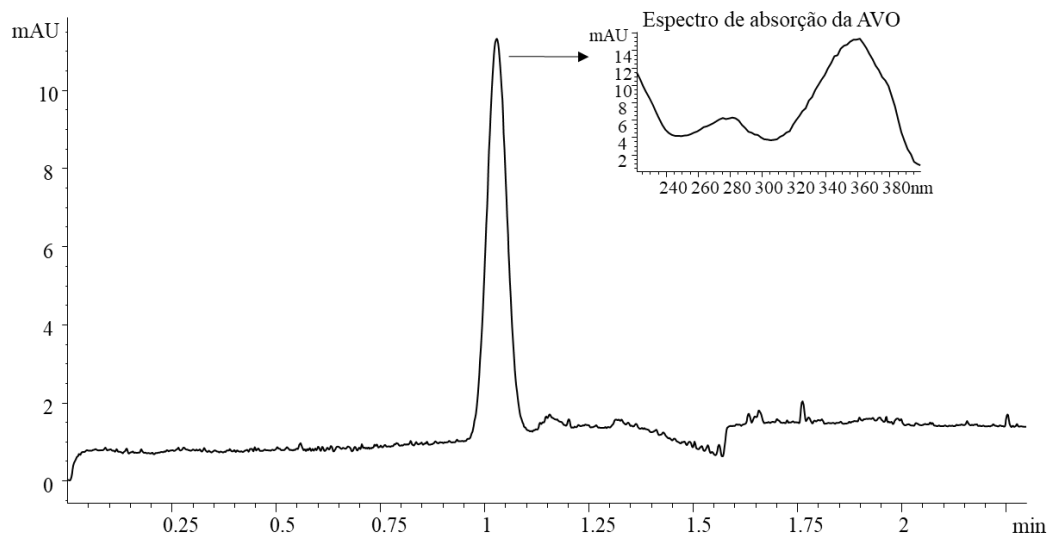


$\lambda = 254 \text{ nm}$. Pico 1: forma ENOL. Pico 2: forma CETO. Linha pontilhada: 20% ACN adicionados no preparo da ME. Linha contínua: 20% ACN adicionado após o preparo da ME. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Ainda, com o objetivo de comparar os modos MEKC e MEEKC, foi realizado um teste com uma solução de SDS, na concentração de 3,3%, com adição de 20% de ACN, onde

foi possível observar o pico referente à forma enol da AVO em um tempo de migração menor em relação à MEEKC, porém não houve a separação dos isômeros em $\lambda = 254 \text{ nm}$, conforme figura 10:

Figura 10 – Eletroferograma da solução padrão de AVO em MEKC.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Dessa forma, o BGE que satisfaz as condições de compromisso para a separação corresponde a ME Ácida com adição de 20% de ACN. O capilar utilizado de 48,5 cm (L_{tot}) e 8,5 cm (L_{det}), com diâmetro interno de 50 μm , foi mais eficiente para realizar a separação. A injeção hidrodinâmica da amostra pela extremidade mais próxima a janela de detecção, aplicando-se -50 mbar por 5 segundos e voltagem de separação de + 20 kV demonstraram melhor performance para o método.

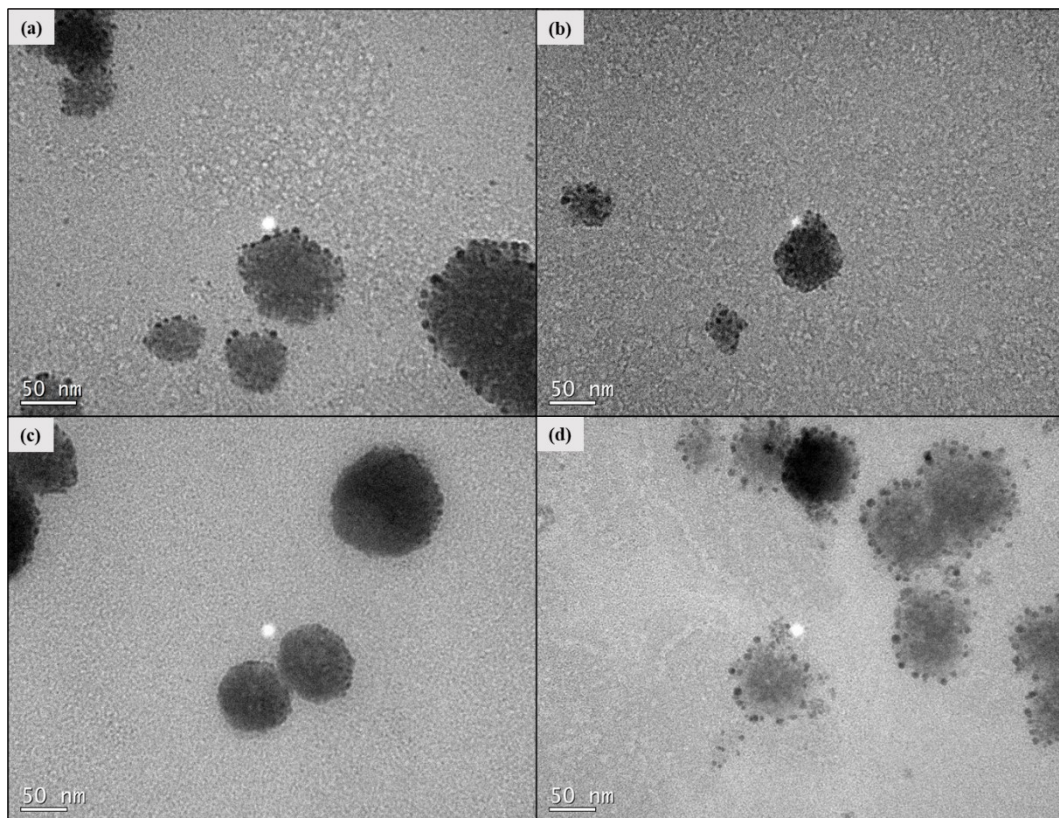
4.1.1.1 Caracterização das ME

O DLS foi utilizado com o objetivo de avaliar o comportamento das ME no intervalo de tempo de 0 a 28 dias. Medidas de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta podem ser utilizadas para monitorar a estabilidade das ME. No entanto, devido às particularidades do método, os resultados das medidas de tamanho e PDI realizadas variaram muito entre as replicatas e o perfil sigmóide da curva de distribuição esperado não foi obtido. São necessárias de 50 a 5000 partículas com tamanhos superiores a 3 nm para obtenção de um resultado confiável. Acredita-se que, pela concentração de SDS estar muito acima da CMC (aproximadamente 14 vezes), houve dificuldade de obter a medida pois o sistema se torna

muito polidisperso. As análises de potencial zeta não foram realizadas, pois os dados de tamanho e PDI são requeridos e os obtidos experimentalmente não foram confiáveis.

Para certificação de que realmente haviam sido formadas estruturas na solução utilizada como BGE, foram obtidas imagens por TEM, que podem ser observadas na figura 11. As imagens apresentam formas esféricas de diversos tamanhos, o que justifica o elevado PDI obtido nas análises por DLS. É importante ressaltar que é esperado que o tamanho obtido por TEM seja menor do que o “real” pois, para a aquisição das imagens por microscopia, a amostra é seca, apresentando comportamento diferente do que se estivesse em solução.

Figura 11 – Imagens de TEM das amostras de BGE (barra de escala de 50 nm).



(a) ME SDS + 20% ACN (adicionado após o preparo da ME); (b) ME SDS 0% ACN; (c) ME SDS 10% ACN (adicionado no preparo da ME) e; (d) ME SDS 20% ACN (adicionado no preparo da ME).

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

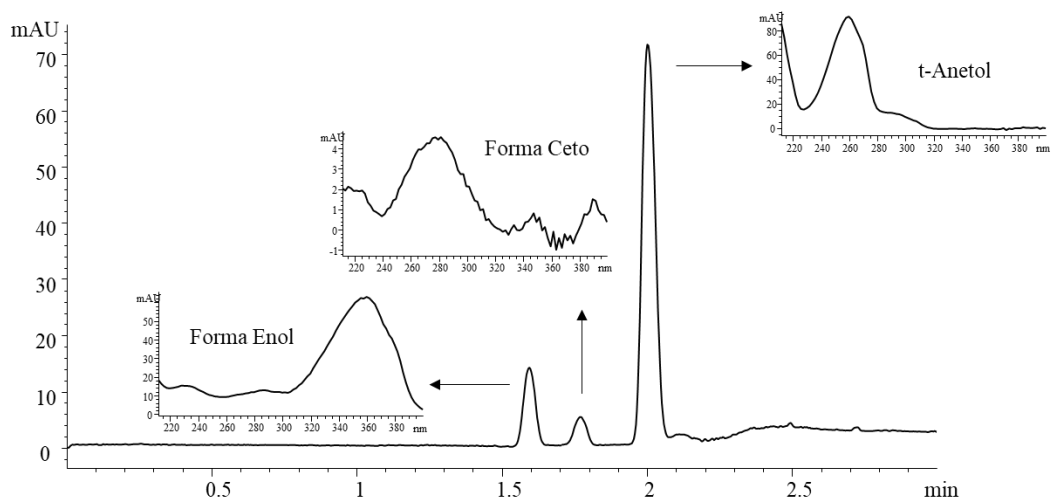
A formulação escolhida para ser utilizada como BGE foi de ME SDS com 20% de ACN adicionados após o preparo e pode ser observada na figura 11 (a) e apresenta gotas de ME de diferentes tamanhos, porém com formato e bordas bem definidas. A figura 11 (b) apresenta a ME “pura”, ou seja, sem adição de ACN e neste caso as ME são menores, com aspecto irregular na superfície. Às demais formulações foram adicionadas ACN durante o

preparo da ME. A amostra de ME SDS com 10% de ACN (11c) foi a que apresentou maior uniformidade e com melhor simetria de bordas, bem como superfície homogênea. Por outro lado, a amostra de ME SDS com 20% de ACN (11d) apresentou bordas irregulares, com tamanhos diversos, chegando a exibir alguns aglomerados. Corrobora com isso os resultados obtidos na figura 9, onde o eletroferograma com ME SDS e 20% de ACN adicionado no preparo exibiu maior ruído de linha base em comparação ao eletroferograma onde 20% de ACN foi adicionado ao BGE após o preparo. Também convém destacar que obter um sistema com estruturas de tamanho uniforme é importante para evitar a formação de aglomerados e consequentemente alcançar maior estabilidade.

4.1.2 Padrão interno

O método de padronização interna foi utilizado com o objetivo de corrigir pequenos desvios experimentais que podem ocorrer durante as análises, em variáveis como a temperatura, o volume de injeção e a voltagem aplicada. A substância a ser usada como padrão interno deve atender a alguns requisitos, como: ser similar e ter tempo de retenção próximo ao analito de interesse, não estar presente nas amostras, não reagir com os componentes da matriz e, neste caso, absorver no UV. Foram testados como possíveis padrões internos: Quercetina, *t*-Anetol, Ácido Cinâmico, Ácido Sórbico, Ninidrina e Butilparabeno. Sendo que os que apresentaram melhores resultados foram o Butilparabeno, a Quercetina e o *t*-Anetol. A quercetina foi descartada por se tratar de um possível antioxidante utilizado para estabilizar a AVO (SCALIA; MEZZENA, 2010) e o butilparabeno por ser um conservante amplamente utilizado em formulações cosméticas. Portanto, o *t*-Anetol foi escolhido por atender aos requisitos pré-estabelecidos e a figura 12 apresenta a separação dos isômeros da AVO utilizando-o como padrão interno:

Figura 12 – Eletroferograma da solução padrão de AVO e *t*-Anetol como padrão interno.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.1.3 Conformidade do sistema

A conformidade do sistema foi avaliada a fim de comprovar a adequação do método de análise e sua capacidade de prover resultados confiáveis. Para o método CE, os parâmetros considerados para determinar a conformidade do sistema foram o número de pratos (N) e a resolução (Rs), apresentados na tabela 4:

Tabela 4 – Parâmetros de conformidade do sistema CE.

Parâmetro	Forma ENOL	Forma CETO	PI
Tempo de Retenção ^a (min)	1,593	1,768	2,001
Número de Pratos	3481	3848	4761
Resolução	-	1,58	2,03

^a Tempo de retenção dos analitos obtido do software HP Chemstation®, versão Rev. B.04.03 [16].

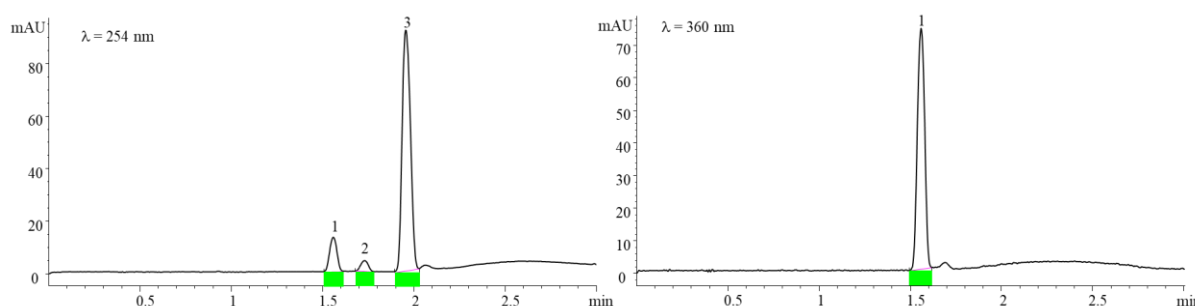
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

De acordo com os dados obtidos, o método desenvolvido mostrou-se adequado, apresentando resultados para o número de pratos maiores que 2000 e o valor de Rs entre os picos das formas enol e ceto foi de 1,58 e entre a forma ceto e PI foi 2,03. O fator de retenção (k) não foi calculado pois, devido ao pH ácido, a ausência do EOF faz com que a tiourea não migre pelo capilar, assim, não foi possível marcar o tempo do composto menos retido.

4.1.4 Seletividade

A seletividade do método foi determinada utilizando a ferramenta do software HP *ChemStation*[®] onde é possível avaliar a pureza dos picos. Quando não ocorre a sobreposição de picos através da absorção simultânea de compostos em uma mesma região do espectro ultravioleta, o software indica uma tarja verde abaixo dos picos analisados, em caso contrário a tarja se mostra vermelha. Os resultados indicam que a pureza de pico foi confirmada, sendo este um indicativo de seletividade do método proposto, conforme figura 13 e tabela 5.

Figura 13 – Eletroferogramas da solução padrão de AVO e *t*-Anetol como padrão interno com aplicação da ferramenta do *Software Chemstation*[®] para verificação da pureza de pico.



Pico 1: Forma ENOL. Pico 2: Forma CETO. Pico 3: *t*-Anetol. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A tabela 6 apresenta os valores utilizados para determinar ou não a pureza dos picos. O valor *Threshold* é o valor mínimo de pureza calculado pelo equipamento. Os valores de *Purity factor* calculados estão todos acima do valor *Threshold*, evidenciando, portanto, a pureza dos picos selecionados.

Tabela 5 – Valores de *Purity factor* e *Threshold* dos picos em CE.

Picos	<i>Purity factor</i>	<i>Threshold</i>
254 nm		
1) Forma ENOL	940,705	861,600
2) Forma CETO	786,232	658,690
3) <i>t</i> -Anetol	842,232	805,131
360nm		
1) Forma ENOL	828,714	747,693

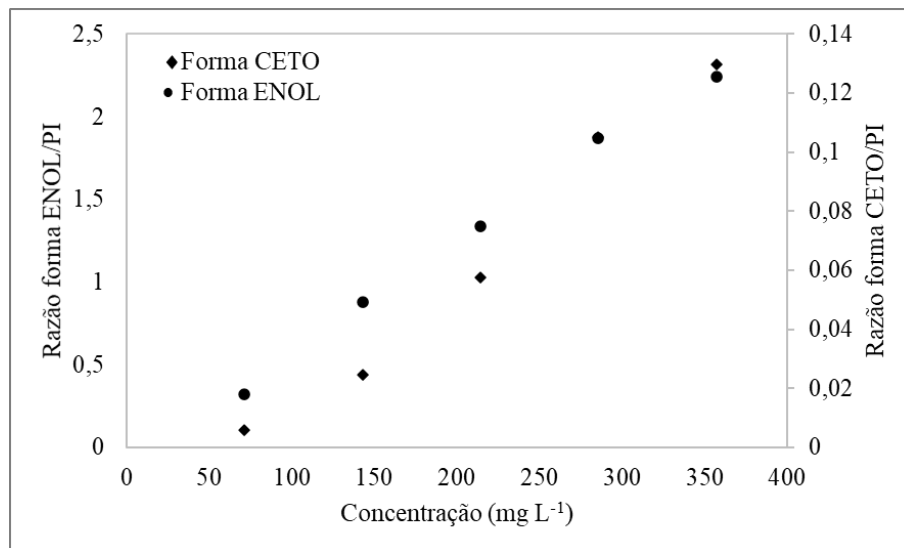
Valores obtidos do software HP *Chemstation*[®], versão Rev. B.04.03 [16].

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.1.5 Linearidade

Para as análises eletroforéticas, foi construída curva de calibração em cinco níveis de concentração da solução de Avobenzona, com utilização de *t*-Anetol como padrão interno na concentração constante de 20 mg L⁻¹. A curva de calibração foi preparada em triplicata e injetada de forma aleatória. O gráfico de regressão linear foi gerado (figura 14) a partir da área do analito corrigida pela área do padrão interno (razão entre as áreas) e os parâmetros encontram-se na tabela 6.

Figura 14 – Curva de calibração (com padrão interno) para o método CE.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 6 – Parâmetros da curva de calibração padrão de AVO para o método CE.

Parâmetros	Forma ENOL	Forma CETO
Comprimento de onda (nm)	360	254
Faixa (mg L ⁻¹)	70 – 350	70 – 350
Inclinação	0,0068 ± 0,0002	0,00046 ± 0,00004
Intercepto	-0,12 ± 0,06	-0,034 ± 0,009
Linearidade (R ²)	0,9961	0,9811
Limite de Detecção	27	60
Limite de Quantificação	82	181

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O ajuste dos dados ao modelo linear foi confirmado pelo teste F. O valor de F fornece uma indicação da significância da regressão. Como existem 5 pares de xy usados para a análise, $n = 5$ e $p = 2$ pois dois parâmetros são estimados (inclinação e intercepto). Portanto,

o número de graus de liberdade (gl) no numerador é $p-1 = 1$ e no denominador $n-p = 3$. Assim, $F_{\text{tabelado}}(1;3) = 10,13$, conforme tabela 7:

Tabela 7 – Teste F para o método CE.

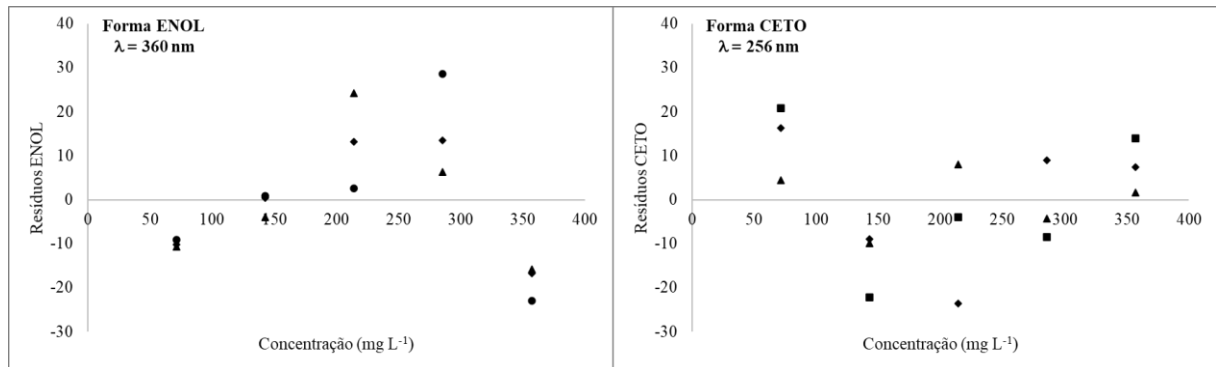
Analito	$F_{\text{tabelado}}(1;3)$	$F_{\text{calculado}}$	Valor p	Resultado*
Forma ENOL	10,13	763,82	$1,04 \times 10^{-4}$	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, rejeita H_0
Forma CETO	10,13	139,93	$1,30 \times 10^{-3}$	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, rejeita H_0

* H_0 = não há correlação linear significativa entre as variáveis; H_1 = há correlação linear significativa entre as variáveis. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Como $F_{\text{calculado}}$ foi maior que F_{tabelado} (valor p foi menor que 0,05), a hipótese nula pode ser rejeitada com um nível de confiança de 95% e podemos afirmar com evidências estatísticas que há correlação linear entre as variáveis concentração e área do pico.

Outra indicação da correlação linear dos dados pode ser observada no gráfico dos resíduos, gerados a partir das curvas de calibração. Os pontos experimentais estão aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo x (concentração), não apresentando nenhum comportamento regular ou tendência, bem como ausência de valores discrepantes, conforme pode ser observado na figura 15:

Figura 15 – Gráficos dos resíduos da regressão linear para o método CE.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para confirmar a distribuição normal dos resíduos, foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk* (1965). A um nível de significância de 95%, com $n=5$, $W_{\text{tabelado}} = 0,7620$ conforme tabela 8:

Tabela 8 – Teste de *Shapiro-Wilk* para o método CE.

Analito	W_{tabelado} (5)	W_{calculado}	Valor p	Resultado*
Forma ENOL	0,7620	0,9320	0,6103	$W_{\text{calc}} > W_{\text{tab}}$, aceita H_0
Forma CETO	0,7620	0,8463	0,1832	$W_{\text{calc}} > W_{\text{tab}}$, aceita H_0

* H_0 = os dados provêm de uma distribuição normal; H_1 = os dados não provêm de uma distribuição normal.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Como os valores de $W_{\text{calculado}}$ apresentaram-se maiores que W_{tabelado} (valor p maior que 0,05), podemos aceitar a hipótese nula e afirmar com evidências estatísticas que os dados provêm de uma distribuição normal.

4.1.6 Precisão

Foram avaliadas a repetibilidade, precisão intermediária e precisão instrumental do método, pela injeção de soluções padrão de AVO com o padrão interno *t*-Anetol. Os resultados estão apresentados na tabela 9 e se referem ao coeficiente de variação da área dos analitos corrigida pela área do padrão interno e coeficiente de variação do tempo de migração dos analitos.

Tabela 9 – Precisão em termos de coeficiente de variação (%) para o método CE.

Concentração (mg L⁻¹)	Analito	Repetibilidade		Intermediária		Instrumental	
		Área	Tempo	Área	Tempo	Área	Tempo
71	Forma ENOL	3,25	1,50	4,25	3,28		
	Forma CETO	4,68	1,47	8,17	1,70		
214	Forma ENOL	3,37	1,16	2,49	3,40	3,54	0,64
	Forma CETO	1,37	1,06	10,71	1,45	2,65	0,32
357	Forma ENOL	1,70	1,37	2,56	2,20		
	Forma CETO	4,42	1,73	16,01	0,85		

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para o método MEEKC, os ensaios de repetibilidade apresentam os coeficientes de variação com valores até 4,68% para a área do pico e 1,50% para o tempo de retenção. A precisão intermediária apresentou coeficientes de variação que chegam a 16,01% para a área do pico e 3,40% para o tempo de retenção. Na precisão instrumental, os valores dos coeficientes de variação são da ordem de 3,54% para a área e 0,64% para o tempo.

Segundo o Regulamento técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal (ANVISA, 2016), o teor máximo de AVO

permitido é de 5%. De acordo com a Associação Oficial de Colaboração Analítica (AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Collaboration*, 2016), para a concentração de trabalho nas amostras analisadas, os valores de CV devem estar entre 3 e 4%. Utilizando a equação 5 de Horwitz (INMETRO, 2020), para a concentração fixada em 5%, o valor máximo de CV calculado deve ser 3,14%.

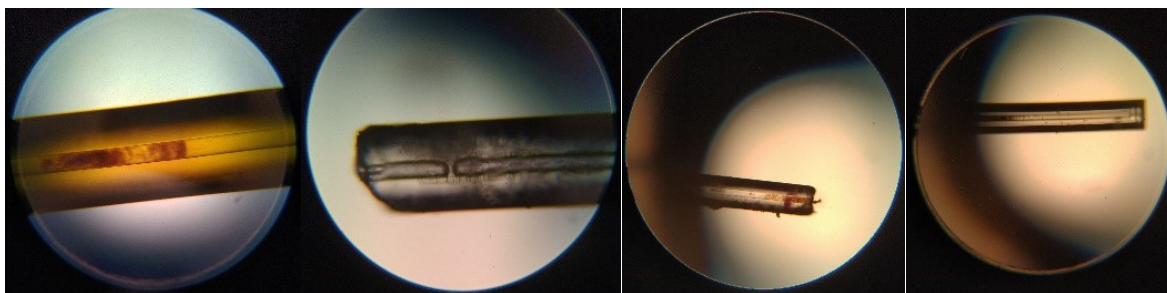
Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, pode-se aferir que os valores de CV estão em desacordo com o preconizado e, portanto, o método não pode ser considerado preciso, necessitando de modificações e aprimoramentos. Convém ressaltar que os valores de CV mais discrepantes foram obtidos para as respostas da forma ceto da AVO. Estes valores podem ser justificados pelo fato de a forma ceto ser um produto em equilíbrio com a forma enol (padrão) e estar sendo quantificada em função desta conversão.

Não obstante, durante a realização dos experimentos de validação do método, problemas de variação na corrente e consequente queda da mesma foi provocada por quebra dos capilares. Essas perturbações também podem ter afetado a precisão do método, já que o capilar precisava ser substituído com frequência. Com o objetivo de mitigar essa situação, foi realizado um estudo para detectar possíveis problemas. Algumas considerações importantes para aprimorar o método são:

- as ME devem ser preparadas em dia anterior ao uso (ficar em repouso de um dia para o outro);
- as ME mostraram-se estáveis durante uma semana, quando estocadas em frascos de cor âmbar em temperatura ambiente (quando guardadas na geladeira, observou-se a formação de cristais);
- a ACN deve ser adicionada ao BGE somente no dia do uso, para evitar alteração na conformação das microemulsões, conforme apresentado na figura 11 (a e d).

Durante exame dos capilares, foi detectado entupimento causado pela poli-imida do revestimento, que foi dissolvida pelos solventes orgânicos presentes no BGE e era inserida dentro do canal de separação, conforme é possível observar nas fotografias da figura 16:

Figura 16 – Imagens dos capilares entupidos com poli-imida.



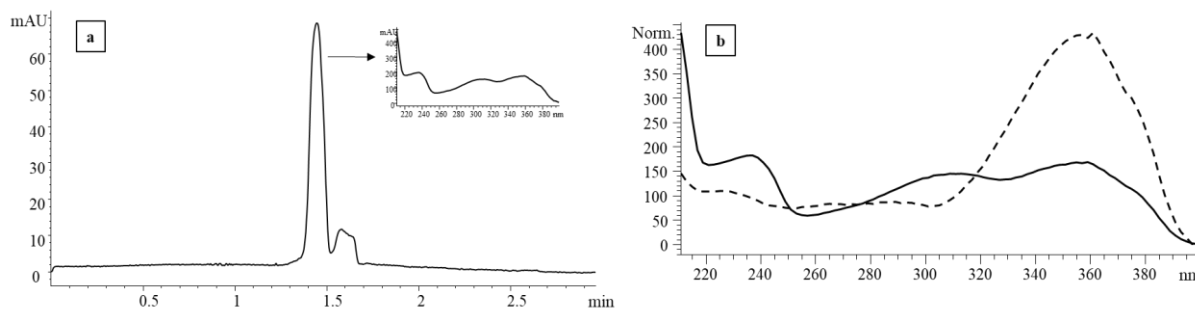
*as imagens foram obtidas com auxílio de Microscópio Óptico Monocular com aumento de 40x e foram tiradas com a câmera traseira de 13 MP do celular ASUS Zenfone Max Pro M1. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Uma alternativa para diminuir este inconveniente é a utilização de capilares com revestimento resistente à solvente orgânico (*teflon*, por exemplo). Outra possibilidade é a queima das extremidades do capilar, de modo que a poli-imida não fique em contato com o solvente no *vial*, porém desta maneira as pontas ficam mais frágeis e com maior risco de quebrar, sobretudo ao inserir e retirar o *cassete* do equipamento. Uma forma menos onerosa de contornar a situação é optar pela injeção eletrocinética ao invés da hidrodinâmica. Na injeção eletrocinética, espera-se que embora ocorra a dissolução da poli-imida, ela não entre no capilar por ser eletricamente neutra.

4.1.7 Amostras

Definidas as condições de separação dos isômeros, o método foi aplicado a amostras de protetor solar. Após o preparo descrito no item 3.2, a amostra foi diluída 10 vezes no BGE antes das análises. A figura 17a ilustra o eletroferograma da separação na amostra de protetor, onde é possível observar a presença de dois picos em $\lambda = 254$ nm. Porém, o pico que deveria se referir a forma enol da AVO, apresenta espectro UV diferente do esperado, indicando a co-migração de outros compostos presentes na amostra de protetor solar, que não puderam ser separados pelo método proposto. A figura 17b demonstra a comparação entre os espectros da AVO e do composto desconhecido.

Figura 17 – (a) Eletroferograma de amostra de PS. (b) Comparação entre os espectros* do padrão de AVO e da amostra de PS.



*Linha pontilhada: espectro UV da AVO (padrão); linha contínua: espectro UV da amostra de PS (composto co-migrando com a AVO). Fonte: Elaborada pela autora (2021).

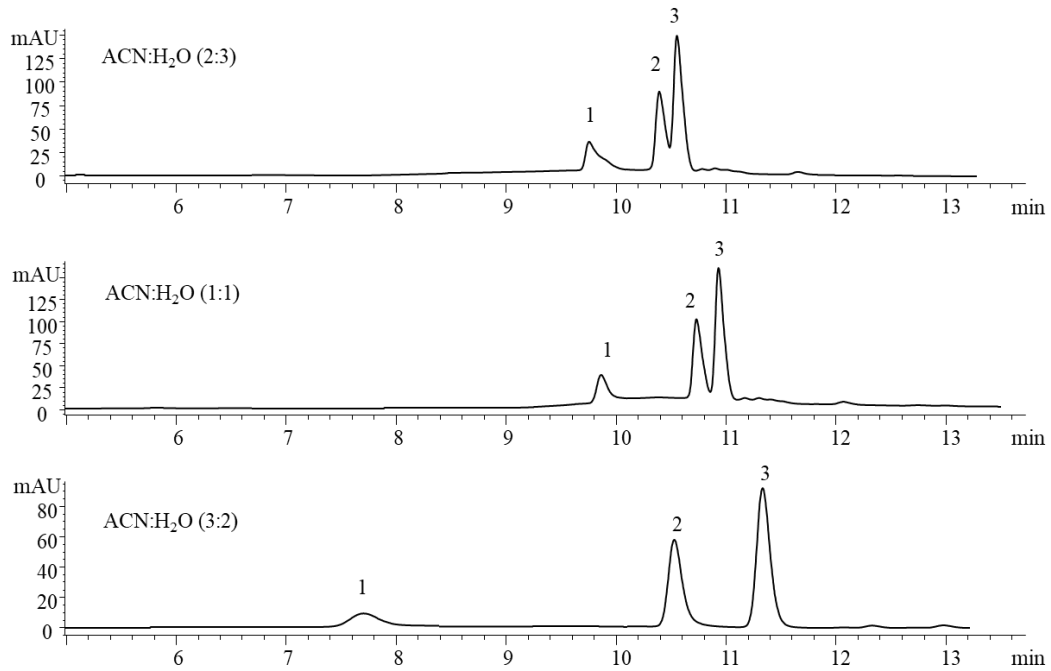
Com isso, em virtude da baixa seletividade do método e da baixa precisão já constatada anteriormente, o método demanda modificações e aprimoramentos, sem deixar de suprir seu objetivo primordial, que é a separação dos isômeros cetona e enol da AVO. Como maneira alternativa de analisar as amostras de PS, tendo como base estudos já publicados, verificou-se a possibilidade de utilizar HPLC.

4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

4.2.1 Desenvolvimento do método

Como forma alternativa de determinar e quantificar os isômeros cetona e enol em amostras de protetor solar, um método de HPLC foi desenvolvido, com base nos trabalhos de Galimany-Rovira *et al* (2016), Abid *et al* (2017) e Lebedev *et al* (2020). Valendo-se do fato de que a tautomerização das formas cetona-enol é detectada em solventes polares apróticos, estas separações utilizam como eluente acetonitrila:água (LEBEDEV *et al.*, 2020; ABID *et al.*, 2017; GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016). Otimizações foram realizadas para se chegar ao procedimento descrito no item 3.4.2, dentre elas, a proporção de ACN:H₂O foi variada para obter a melhor separação dos componentes na amostra de PS, como pode ser observado na figura 18:

Figura 18 – Cromatogramas de amostra de PS com diferentes gradientes de eluição.



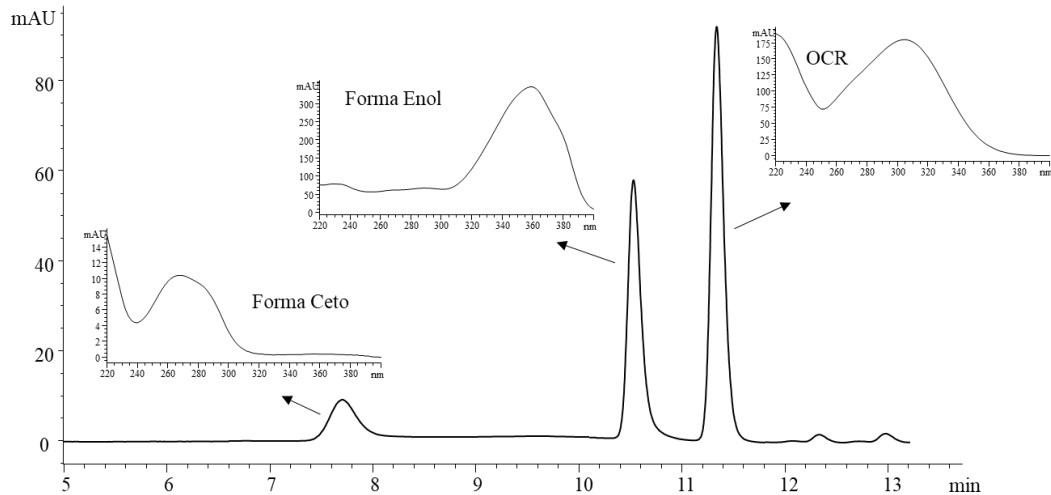
Pico 1: Forma CETO. Pico 2: Forma ENOL. Pico 3: desconhecido. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A proporção que garantiu a separação total da forma enol com um composto desconhecido do protetor solar (picos 2 e 3) foi de 60% de ACN com 40% de H₂O e a partir dessa taxa o método foi performado.

4.2.2 Conformidade do sistema

Da mesma forma que para o método desenvolvido em CE, a conformidade do sistema foi verificada a fim de comprovar a adequação do método HPLC em prover resultados confiáveis. Os parâmetros avaliados foram o fator de retenção (k), número de pratos (N) e a resolução (R_s), apresentados na tabela 10, de acordo com o cromatograma da figura 19:

Figura 19 – Cromatograma de amostra de PS.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Através da análise dos espectros, comparando com os compostos presentes na amostra de protetor solar, o terceiro pico foi identificado como sendo o Octocrileno (OCR, do inglês *Octocrylene*). O OCR é utilizado como absorvedor de raios UVB e UVA II. Devido a sua alta estabilidade, geralmente é utilizado em conjunto com a AVO para estabilizá-la (COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018).

Tabela 10 – Parâmetros de conformidade do sistema HPLC.

Parâmetro	Forma CETO	Forma ENOL	OCR
Tempo de Retenção ^a (min)	7,71	10,53	11,34
Fator de Retenção	4,51	6,52	7,10
Número de Pratos	2473	7962	11822
Resolução	-	5,17	1,81

^a Tempo de retenção dos analitos obtido do software HP Chemstation®, versão Rev. B.04.03 [16].

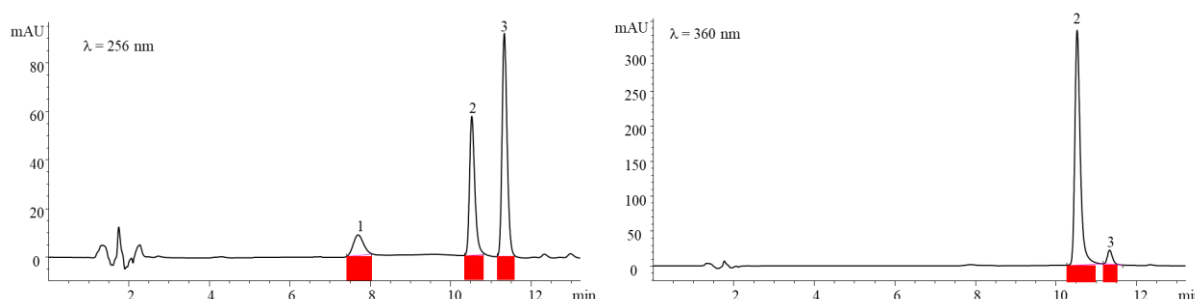
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

De acordo com os dados obtidos, o método desenvolvido mostrou-se adequado, com valores de fator de retenção maiores que 2, indicando que o pico de interesse está bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido. Valores maiores que 2000 para o número de pratos e resolução de 5,17 entre as formas ceto e enol da AVO e de 1,81 entre a forma enol e o OCR.

4.2.3 Seletividade

Para avaliar a pureza dos picos nos pontos da curva de calibração e nas amostras analisadas, a ferramenta do software *HP ChemStation*® foi utilizada. Os resultados indicam que a pureza de pico não foi confirmada, pois o software indicou uma tarja vermelha abaixo dos picos analisados conforme figura 20. Na tabela 11 estão os valores de *Threshold* e *Purity factor*.

Figura 20 – Cromatograma da amostra de PS com aplicação da ferramenta do *Software Chemstation*® para verificação da pureza de pico.



Pico 1: Forma CETO. Pico 2: Forma ENOL. Pico 3: OCR. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 11 – Valores de *Purity factor* e *Threshold* dos picos em HPLC.

Picos	Purity factor	Threshold
254 nm		
1) Forma CETO	934,816	999,260
2) Forma ENOL	999,340	999,866
3) OCR	999,821	999,919
360 nm		
2) Forma ENOL	999,552	999,937
3) OCR	999,966	999,993

Valores obtidos do software *HP Chemstation*®, versão Rev. B.04.03 [16].

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

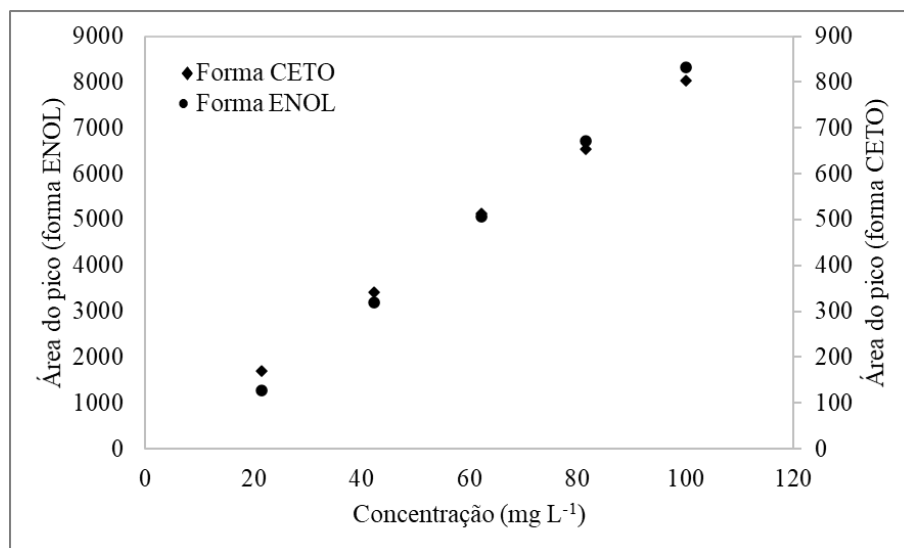
A tabela 12 apresenta os valores utilizados para determinar a pureza dos picos. O valor *Threshold* é o valor mínimo de pureza calculado pelo equipamento. Os valores de *Purity factor* calculados apresentam-se abaixo dos valores de *Threshold* requeridos para pureza. Porém, ao realizar uma análise mais criteriosa observa-se que a diferença percentual entre os valores é menor que 0,05%, o que faz com que os picos sejam considerados puros. O único pico que apresentou valores mais discrepantes foi o pico 1, referente a forma ceto da AVO, com diferença maior que 6%. Porém, convém destacar que esta separação ocorre com

gradiente e a composição da FM muda com o tempo. Para os picos 2 e 3 a contribuição espectral do solvente era a mesma do início da separação pois nos tempos de eluição destes picos, a composição da FM é a mesma do início e é eliminada pela subtração automática do espectro do solvente. Já o pico 1 elui no mesmo tempo em que a composição da FM é diferente da inicial. Portanto, os espectros desse pico devem ser corrigidos devido à absorção de fundo causada pela fase móvel, subtraindo por espectros de referência apropriados. Após realizar as devidas correções, o valor de *Purity factor* passa a ser 991,275, resultando em uma diferença percentual de 0,8% do *Threshold*, sendo assim, este pico também pode ser considerado puro.

4.2.4 Linearidade

Para as análises por HPLC, a curva de calibração foi construída em triplicata da solução de AVO, em cinco níveis. O gráfico de regressão linear (figura 21) foi gerado e os parâmetros obtidos estão listados na tabela 12. A curva de calibração se mostrou adequada, apresentando correlação das concentrações com as respectivas áreas. O coeficiente de determinação (R^2) apresentou ajuste dos dados com valores acima de 0,99, considerado adequado pelas agências reguladoras (INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004) ainda, cabe ressaltar que o LOQ está abaixo da faixa de trabalho inicialmente estabelecida, portanto, se necessário, é possível ajustar a faixa para melhorar os parâmetros avaliados.

Figura 21 – Curva de calibração para o método HPLC.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 12 – Parâmetros da curva de calibração padrão de AVO para o método HPLC.

Parâmetros	Forma ENOL	Forma CETO
Comprimento de onda (nm)	360	256
Faixa (mg L ⁻¹)	20 – 100	20 – 100
Inclinação	90 ± 1	8,1 ± 0,1
Intercepto	-629 ± 70	-1 ± 8
Linearidade (R ²)	0,9996	0,9994
Limite de Detecção	2,35	2,90
Limite de Quantificação	7,11	8,79

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Da mesma forma que para o método CE, o ajuste dos dados ao modelo linear foi confirmado pelo teste F. Com $n = 5$ e $p = 2$, o número de graus de liberdade (gl) no numerador é $p-1 = 1$ e no denominador $n-p = 3$. Assim, $F_{\text{tabelado}}(1;3) = 10,13$, conforme tabela 13:

Tabela 13 – Teste F para o método HPLC.

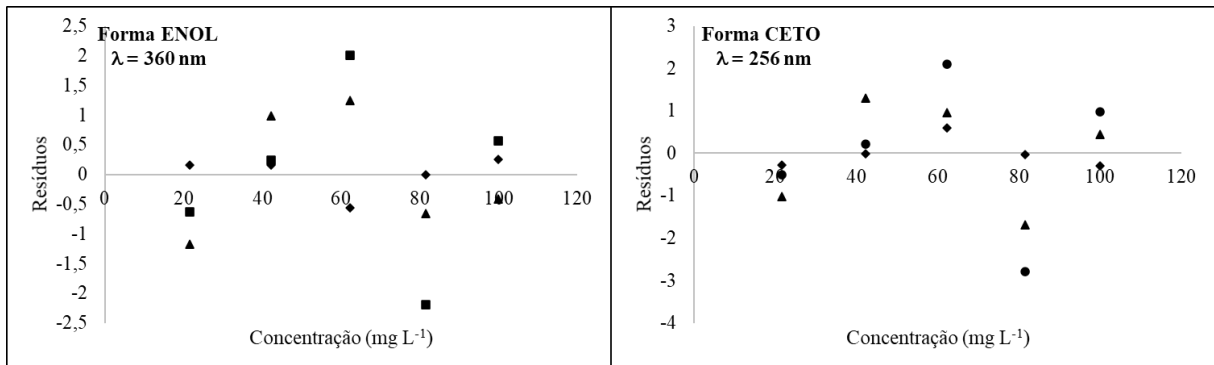
Analito	F_{tabelado} (1;3)	F_{calculado}	Valor p	Resultado*
Forma ENOL	10,13	7606,26	$3,32 \times 10^{-6}$	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, rejeita H_0
Forma CETO	10,13	4970,83	$6,29 \times 10^{-6}$	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, rejeita H_0

* H_0 = não há correlação linear significativa entre as variáveis; H_1 = há correlação linear significativa entre as variáveis. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Como $F_{\text{calculado}}$ foi maior que F_{tabelado} , a hipótese nula pode ser rejeitada com um nível de confiança de 95% e podemos afirmar com evidências estatísticas que há correlação linear entre as variáveis concentração e área do pico.

Outra indicação da correlação linear dos dados pode ser observada no gráfico dos resíduos, gerados a partir das curvas de calibração. Os pontos experimentais estão aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo x (concentração), não apresentando nenhum comportamento regular ou tendência, bem como ausência de valores discrepantes, conforme pode ser observado na figura 22:

Figura 22 – Gráficos dos resíduos da regressão linear para o método HPLC.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para confirmar a distribuição normal dos resíduos, foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk* (1965). A um nível de significância de 95%, com $n=5$, $W_{\text{tabelado}} = 0,7620$, conforme tabela 14:

Tabela 14 – Teste de *Shapiro-Wilk* para o método HPLC.

Analito	$W_{\text{tabelado}} (5)$	$W_{\text{calculado}}$	Valor p	Resultado*
Forma ENOL	0,7620	0,8567	0,2168	$W_{\text{calc}} > W_{\text{tab}}$, aceita H_0
Forma CETO	0,7620	0,8111	0,0995	$W_{\text{calc}} > W_{\text{tab}}$, aceita H_0

* H_0 = os dados provêm de uma distribuição normal; H_1 = os dados não provêm de uma distribuição normal.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Como os valores de $W_{\text{calculado}}$ apresentaram-se maiores que W_{tabelado} (valor p maior que 0,05), podemos aceitar a hipótese nula e afirmar com evidências estatísticas que os dados provêm de uma distribuição normal.

4.2.5 Precisão

A repetibilidade, precisão intermediária e precisão instrumental foram avaliadas pela injeção de soluções padrão de AVO, conforme descrito no item 3.5.4.. Os resultados dos testes em termos de coeficiente de variação para o método desenvolvido em HPLC estão apresentados na tabela 15:

Tabela 15 – Precisão em termos de coeficiente de variação (%) para o método HPLC.

Concentração (mg L ⁻¹)	Analito	Repetibilidade		Intermediária		Instrumental	
		Área	Tempo	Área	Tempo	Área	Tempo
20	Forma ENOL	0,66	1,60	0,28	1,83		
	Forma CETO	2,81	0,89	1,90	2,00		
60	Forma ENOL	1,56	0,20	2,29	1,46	1,80	0,99
	Forma CETO	0,79	0,19	0,35	1,09	0,62	0,78
100	Forma ENOL	0,47	0,13	1,14	0,41		
	Forma CETO	0,82	0,33	0,71	0,24		

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para o método em HPLC, os ensaios de repetibilidade apresentam os coeficientes de variação inferiores a 2,81% para a área do pico e 1,60% para o tempo de retenção. A precisão intermediária apresentou coeficientes de variação inferiores a 2,29% para a área do pico e 2,00% para o tempo de retenção. Na precisão instrumental, os valores dos coeficientes de variação são inferiores a 1,80% para a área e 0,99% para o tempo. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, pode-se observar que os valores de CV estão todos abaixo do preconizado pelas agências reguladoras (INMETRO, 2020; ANVISA, 2016; AOAC, 2016;) e, portanto, o método pode ser considerado preciso.

4.2.6 Exatidão

A exatidão do método proposto foi verificada através de testes de recuperação das amostras de protetor solar, fortificadas com AVO, no nível inferior, intermediário e superior da curva de calibração. As respostas para os ensaios em HPLC estão apresentadas na tabela 16:

Tabela 16 – Exatidão para o método HPLC.

Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	
	Forma ENOL	Forma CETO
20	98,51	120,51
60	99,75	105,31
100	101,72	98,73

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na amostra de protetor avaliada pelo método HPLC, os valores de recuperação variam de 98,51% a 101,72% para a forma ENOL e são considerados aceitáveis pela AOAC (2016), que estipula valores de recuperação de 97% a 103% na concentração de trabalho das

amostras analisadas. Já para a forma ceto, os valores de recuperação variam de 98,73% a 120,51%, estando fora da faixa aceitável. Isso pode ser justificado devido a forma ceto ser detectada de forma indireta, já que é isômera da forma enol que é predominante.

4.2.7 Amostras

Definidas as condições de separação dos isômeros, o método foi aplicado a amostras de protetor solar. Após o preparo descrito no item 3.3, a amostra foi diluída 76 vezes em ACN (alíquota de 20 μL diluída em 1500 μL de ACN) antes das análises. A partir dos parâmetros da curva de calibração apresentados no tópico 4.2.4, foram obtidas as concentrações de AVO (forma enol) nas amostras de PS analisadas. Todos os resultados encontram-se abaixo do valor regulamentado pela ANVISA (2016) que estipula a concentração máxima de 5% e pelo FDA (2019) que estipula a concentração máxima de AVO em 3% quando usada em combinação com outros filtros UV. Os valores podem ser observados na tabela 17:

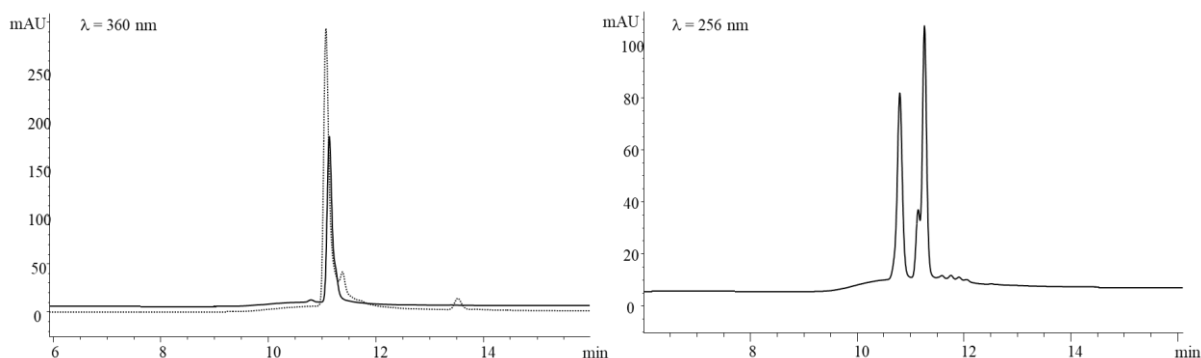
Tabela 17 – Concentração de AVO (forma enol) encontrada nas amostras analisadas.

Código	Concentração (%)
N15	1,92 \pm 0,43
N30	2,39 \pm 0,40
AS30	*
SD30	2,23 \pm 0,41
SD50	2,45 \pm 0,42

* = inferior ao LQ. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A amostra AS30 não continha Avobenzona na lista de componentes especificada no rótulo da embalagem. Porém, ao analisar o cromatograma em $\lambda = 360$ nm, observa-se um pico no mesmo tempo de retenção que seria da forma enol. Portanto, analisou-se o cromatograma da amostra AS30 em $\lambda = 256$ nm e foi verificada a ausência do sinal da forma ceto da AVO, sendo esse um indício da ausência do componente na formulação. Os cromatogramas estão apresentados na figura 23:

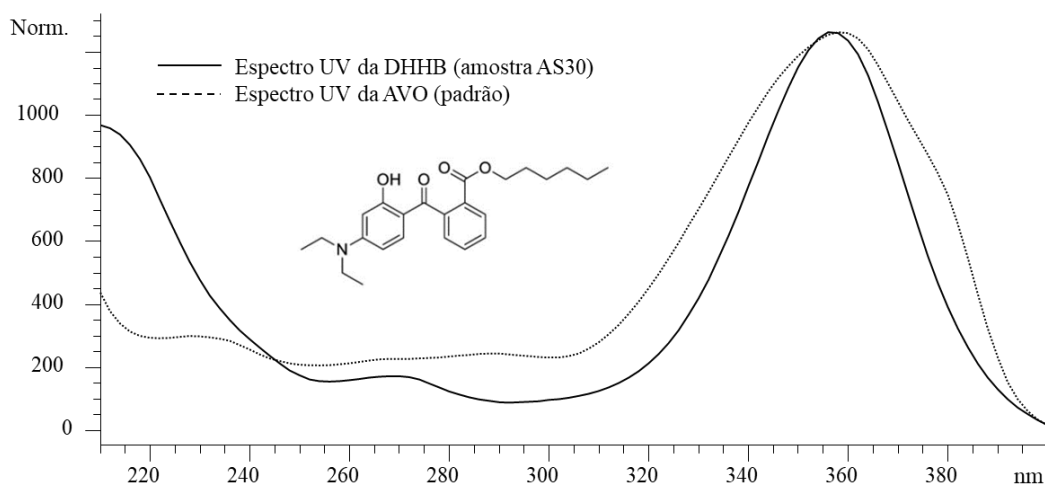
Figura 23 – Cromatogramas referentes a amostra AS30.



$\lambda = 360\text{nm}$, sobreposição dos cromatogramas do padrão de AVO e da amostra AS30; $\lambda = 256\text{ nm}$, cromatograma da amostra AS30. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para verificar se de fato se tratava da AVO ou outro componente com o mesmo tempo de retenção, foi realizada a análise dos espectros, comparando o espectro obtido na amostra com o espectro do padrão da forma enol da AVO, conforme figura 24:

Figura 24 – Comparação entre os espectros da AVO padrão e DHHB em amostra de AS30.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

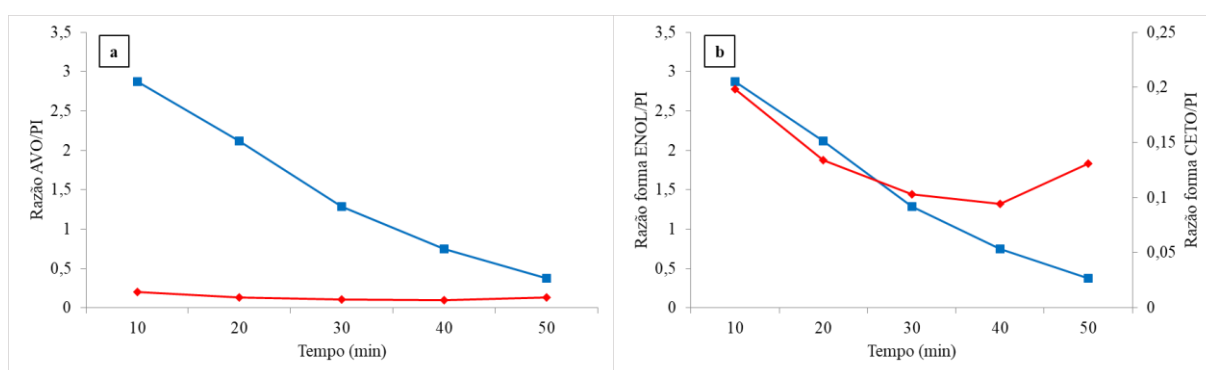
A partir da comparação, constatou-se que os espectros são diferentes e que o espectro desconhecido trata-se do *Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate* (DHHB), sob nome comercial *Uvinul A Plus*, provavelmente o mais representativo novo filtro UVA, aprovado para uso em protetores solares no Japão, Europa, Austrália e África do Sul. Possui estrutura (figura 24) baseada na oxibenzona, com absorção na faixa de UVA I ($\lambda_{\text{max}} = 354\text{ nm}$) e embora estudo anteriores tenham relatado boa fotoestabilidade, as propriedades fotoquímicas

de DHHB mostraram dependentes do solvente e sabe-se que ela também apresenta tautomerização do tipo ceto-enol (KAO *et al.*, 2021; KAWAKAMI *et al.*, 2017).

4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO CE

Apesar de o método proposto para análise de Avobenzona em amostras de protetor solar por MEEKC não ter apresentado parâmetros satisfatórios no que tange a precisão e seletividade, o mesmo demonstra capacidade para utilização em estudos de degradação do padrão da AVO. Como a separação dos isômeros ceto e enol no padrão ocorre, é possível avaliar o tempo que a AVO vai atuar como protetor solar do UVA (ou seja, permanece na forma enol). Portanto, com o intuito de avaliar a fotoestabilidade da AVO, uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ do padrão em DMSO foi depositada sobre uma placa de Petri e exposta a lâmpada Ultra Vitalux 300W da marca OSRAM, que emite os comprimentos de onda de 280 a 400 nm, mimetizando a luz solar. Alíquotas da solução estoque foram retiradas a cada 10 minutos e diluídas no BGE para a concentração de 100 mg L⁻¹ para análise por MEEKC. A introdução da amostra no capilar foi realizada pela extremidade mais próxima ao detector (*outlet*) por injeção eletrocínética, aplicando-se 10 kV por 5 segundos, com o objetivo de mitigar os problemas de entupimento do capilar anteriormente relatados. Os resultados estão ilustrados no gráfico da figura 25:

Figura 25 – Conversão dos isômeros da AVO, em solução exposta à radiação UV.



(a) Mesmo eixo razão AVO/PI. (b) Eixos diferentes para a razão forma CETO/PI e razão forma ENOL/PI. Linha vermelha: forma CETO; Linha azul: forma ENOL. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Como é possível observar no gráfico da figura 25a, existe o decaimento expressivo da forma enol, após 50 minutos de exposição, porém não há conversão direta da forma enol em ceto, visto que o comportamento da forma ceto é diferente. O gráfico da figura 25b, onde temos um eixo para cada composto, demonstra que até os 30 minutos de exposição, as

concentrações das duas formas decaem. Porém, após 40 minutos a concentração da forma ceto começa a aumentar. Este comportamento pode ser justificado devido aos diferentes caminhos envolvidos no decaimento da AVO, esquematizados por Vallejo, Mesa e Gallardo (2011). Os compostos formados, produtos desta fotodegradação, podem ser inativos ou, por outro lado, podem favorecer a degradação de biocomponentes da pele, causar alergias e produzir radicais livres. Em trabalhos anteriores do grupo (DOMINGUES, 2019) determinou-se a cinética do equilíbrio da AVO como sendo de primeira ordem e o tempo de meia vida da forma enol foi de 24 minutos, desta forma, sabe-se que após 24 minutos de exposição à radiação UV, pelo fato da molécula ser bastante fotoinstável, a forma enol da AVO se reduz a metade de sua concentração inicial e a forma ceto é favorecida, corroborando com os resultados encontrados neste experimento.

5 CONCLUSÃO

A utilização de microemulsões como fase pseudo-estacionária para separações em eletroforese capilar se mostrou promissora. A adição de ACN ao BGE viabilizou a separação dos isômeros ceto e enol da AVO por MEEKC. Apesar de não ter sido possível realizar a separação dos isômeros nas amostras por MEEKC, devido ao método precisar de modificações para melhorar sua seletividade, foi possível realizar um estudo da degradação da forma enol (padrão) da AVO, com resultados que corroboram com os já relatados na literatura.

As análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram importantes para elucidar a morfologia das microemulsões utilizadas, bem como avaliar a influência da adição de ACN ao BGE. As análises em DLS seriam importantes para determinar a estabilidade das formulações e, embora não tenha sido possível realizá-las, os resultados de TEM fornecem um indicativo do comportamento das mesmas em solução.

Apesar do tempo de análise e o consumo de reagentes ser maior quando comparado a CE, para analisar as amostras de protetor solar, foi desenvolvido um método HPLC. Os parâmetros de mérito analítico obtidos foram satisfatórios e os resultados encontrados para a concentração de AVO nas amostras estão de acordo com o determinado pela legislação.

O desenvolvimento de metodologias para o estudo da fotoestabilidade da AVO tem sua importância resguardada. Primeiro por se tratar do filtro mais eficaz usado como proteção UVA e segundo, a única molécula de filtro UVA I aprovada pela FDA, sendo amplamente utilizada em formulações cosméticas para a proteção da pele contra os raios solares.

Apesar de CE e HPLC serem técnicas complementares, cada vez mais a utilização de métodos considerados “verdes” vem ganhando espaço e nesse sentido métodos baseados em MEEKC apresentam um grande potencial a ser explorado. Como perspectiva deste trabalho, aperfeiçoamentos no método MEEKC proposto podem ser realizados com o objetivo de alcançar melhor seletividade e, então, aplicar o método em amostras de protetor solar para quantificar os isômeros ceto-enol da AVO e também outros componentes das formulações.

REFERÊNCIAS

- ABID, A. R. et al. Photo-stability and photo-sensitizing characterization of selected sunscreens' ingredients. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 332, p. 241–250, jan. 2017.
- ADLER, B. L.; DELEO, V. A. Sunscreen Safety: a Review of Recent Studies on Humans and the Environment. **Current Dermatology Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, mar. 2020.
- AFONSO, S. et al. Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 36–40, nov. 2014.
- ALKRAD, J. A.; MRESTANI, Y.; NEUBERT, R. H. H. Development and characterization of microemulsions containing hyaluronic acid. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p. 84–90, abr. 2016.
- ALTRIA, K.; MARSH, A.; GRIEND, C. S. DE. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. **Electrophoresis**, v. 27, n. 12, p. 2263–2282, jun. 2006.
- ÁLVAREZ-RIVERA, G.; CIFUENTES, A.; CASTRO PUYANA, M. Electrophoretic Technique: Capillary Zone Electrophoresis. In: **Modern Techniques for Food Authentication**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 659–685.
- AMĂRIUTEI, I. et al. Microemulsion-based strategy for the capillary electrophoretic analysis of some antidiabetic drugs. **Romanian J. Biophys**, v. 25, n. 3, p. 173–184, 2015.
- ANDREW, R.; TIGGEMANN, M.; CLARK, L. Positive body image and young women's health: Implications for sun protection, cancer screening, weight loss and alcohol consumption behaviours. **Journal of Health Psychology**, v. 21, n. 1, p. 28–39, jan. 2016.
- ANVISA. **RDC nº 30, de 1º de junho de 2012**. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Brasília/DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012.
- ANVISA. **RDC Nº 69, de 23 de março de 2016**. Dispõe sobre o “Regulamento Técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes”. Brasília/DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2016.
- ANVISA. **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília/DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2017.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. v. 1. 6. ed. Brasília/DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019.
- AOAC. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements** Association of Official Analytical Chemists, 2016.
- ARANOW, C. Vitamin D and the Immune System. **Journal of Investigative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 881–886, 1 ago. 2011.

AUM, P. T. P. et al. Evaluation of oil-in-water microemulsion base ethoxylated surfactant under acid conditions. **Fuel**, v. 290, p. 120045, abr. 2021.

BERENBEIM, J. A. et al. Unravelling the Keto–Enol Tautomer Dependent Photochemistry and Degradation Pathways of the Protonated UVA Filter Avobenzone. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 124, n. 15, p. 2919–2930, 16 abr. 2020.

BINDACO, A. L.; BENZ, C. F.; NETO, O. C. Análise fotoquímica e microbiológica de protetores solares produzidos nas farmácias de Colatina–ES. **Unesc em Revista**. v.2. p. 27-43. 2017.

BOWCOTT, J. E.; SCHULMAN, J. H. Emulsions - Control of droplet size and phase continuity in transparent oil-water dispersions stabilized with soap and alcohol. **Zeitschrift für Elektrochemie**, v. 59, n. 4, p. 8, 1955.

CALLENDER, S. P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 425–442, jun. 2017.

CAO, J.; DUN, W.; QU, H. Evaluation of the addition of various surfactant-suspended carbon nanotubes in MEEKC with an in situ-synthesized surfactant system. **Electrophoresis**, v. 32, n. 3–4, p. 408–413, fev. 2011.

CAO, Y.; SHENG, J. Microstructure of microemulsion in MEEKC **Electrophoresis**. v. 31. p. 672-678, 2010.

CERESOLE, R. et al. Stability indicating hplc method for the determination of benzophenone-3 and avobenzone in cosmetic formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 20, p. 2882–2894, 14 dez. 2013.

CHU, C. et al. Micro-matrix solid-phase dispersion coupled with MEEKC for quantitative analysis of lignans in Schisandrae Chinensis Fructus using molecular sieve TS-1 as a sorbent. **Journal of Chromatography B**, v. 1063, p. 174–179, set. 2017.

COZZI, A. C.; PERUGINI, P.; GOURION-ARSIQUAUD, S. Comparative behavior between sunscreens based on free or encapsulated UV filters in term of skin penetration, retention and photo-stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, p. 309–318, ago. 2018.

DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; GANDHI, M. Nanoemulsion ingredients and components. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 2, p. 917–928, jun. 2019.

DERBINA, A. A. et al. Application of water-in-oil microemulsions in microemulsion electrokinetic chromatography and as extractants of polar substances. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 1271–1276, out. 2015.

DOMINGUES, D. D. A. **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**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

FARAHIN, A. W. et al. Use of microalgae: *Tetraselmis tetraathele* extract in formulation of nanoemulsions for cosmeceutical application. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 3, p. 1743–1752, jun. 2019.

FDA, Food and Drug Administration. **Federal Register**. Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use. v. 84. n. 38. 26 fev. 2019.

FELICI, E. et al. A green alternative method for analysis of ivermectin and moxidectin in environmental water samples using automatized preconcentration previous MEEKC: CE and CEC. **Electrophoresis**, v. 37, n. 22, p. 2977–2985, nov. 2016.

FERNÁNDEZ-PUMAREGA, A. et al. Feasibility of the estimation of octanol-water distribution coefficients of acidic drugs by microemulsion electrokinetic chromatography. **ADMET**. v. 6. n. 1. p. 55-60. 2018.

FERNÁNDEZ-PUMAREGA, A. et al. Determination of the retention factor of ionizable compounds in microemulsion electrokinetic chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1078, p. 221–230, out. 2019.

FERNÁNDEZ-PUMAREGA, A. et al. Estimation of the octanol–water distribution coefficient of acidic compounds by microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 112981, fev. 2020.

FERREIRA, F. S.; OLIVEIRA, S. M. M. DE; BARZOTTO, I. L. M. Avaliação in vitro do fator de proteção solar de protetores solares manipulados em um município do Paraná. **Boletim Informativo Geum**. v. 8, n. 2, p. 8–15, 2017.

FIVENSON, D. et al. Sunscreens: UV filters to protect us: Part 2-Increasing awareness of UV filters and their potential toxicities to us and our environment. Elsevier Enhanced Reader. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 7, p. 45–69, 2021.

GALIMANY-ROVIRA, F. et al. Development and validation of a new RP-HPLC method for the simultaneous determination of hydroquinone, kojic acid, octinoxate, avobenzone, BHA and BHT in skin-whitening cream. **Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1170–1180, 2016.

GARCÍA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. (EDS.). **Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis: Principles, Applications, and Limitations**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

GIRINGER, K. et al. Analysis of ruthenium anticancer agents by MEEKC-UV and MEEKC-ICP-MS: Impact of structural motifs on lipophilicity and biological activity. **Electrophoresis**, v. 39, n. 9–10, p. 1201–1207, maio 2018.

GLOBAL BURDEN OF CANCER. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 2006 to 2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 15_suppl, p. 1568–1568, 20 maio 2018.

GÓMEZ, J. M. R. et al. A irradiância solar: conceitos básicos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 3, 26 mar. 2018.

GOVINDU, P. C. V. et al. Glutathione as a photo-stabilizer of avobenzone: an evaluation under glass-filtered sunlight using UV-spectroscopy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 198–207, 2019.

HANSON, K. M. et al. Effects of solvent and micellar encapsulation on the photostability of avobenzone. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 390–398, 2020.

HARWANSH, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, M. A. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 224–233, jun. 2019.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. **Nature**, v. 152, p. 102–103, 1943.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HSIAO, W.-Y. et al. Determining ultraviolet absorbents in sunscreen products by combining direct injection with micelle collapse on-line preconcentration capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1383, p. 175–181, fev. 2015.

HSIEH, S.-Y.; WANG, C.-C.; WU, S.-M. Microemulsion electrokinetic chromatography for analysis of phthalates in soft drinks. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3486–3491, dez. 2013.

INCA. **Câncer de pele melanoma**. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Última modificação: 04/02/2020 12h12. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acesso em: 2 ago. 2020a.

INCA. **Câncer de pele não melanoma**. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Última modificação: 04/02/2020 12h13. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>. Acesso em: 2 ago. 2020b.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008 - Revisão 09**. 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=cali_bensaios. Acesso em: 5 mar. 2021.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Informação ao Consumidor - Protetor Solar**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/protetorSolar.asp>. Acesso em: 1 mar. 2021.

JAVED, S.; AHSAN, W. Microemulsion based chromatographic techniques: Past lessons and future directions. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 42, n. 3–4, p. 99–114, 25 fev. 2019.

JORGENSON, J.; LUKACS, K. Capillary zone electrophoresis. **Science**, v. 222, n. 4621, p. 266–272, 21 out. 1983.

KAO, M.-H. et al. Influence of the Solvent Environment on the Ultrafast Relaxation Pathways of a Sunscreen Molecule Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 125, n. 2, p. 636–645, 21 jan. 2021.

KAVITHA, J.; LAKSHMI, K. S. Design of Experiments Based Validated HPTLC Method for Quantification of Oxybenzone and Avobenzone in Personal Care Products. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 417–428, 4 jan. 2017.

KAWAKAMI, C. M. et al. Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB) as additive to the UV filter avobenzone in cosmetic sunscreen formulations - Evaluation of the photochemical behavior and photostabilizing effect. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 299–309, mar. 2017.

KLAMPFL, C. W.; LEITNER, T.; HILDER, E. F. Development and optimization of an analytical method for the determination of UV filters in suntan lotions based on microemulsion electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 23, p. 2424–2429, 2002.

KOCKLER, J. et al. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 91–110, mar. 2012.

KOCKLER, J. et al. Butyl Methoxy Dibenzoylmethane. In: **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 38p. 87–111.

KRÓL, M. et al. The examination of red lipsticks using microemulsion electrokinetic capillary chromatography. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104735, jun. 2020.

LEBEDEV, A. T. et al. Identification of avobenzone by-products formed by various disinfectants in different types of swimming pool waters. **Environment International**, v. 137, p. 105495, 1 abr. 2020.

LHIAUBET-VALLET, V. et al. Filter–filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 552–558, 2010.

LI, C.-C. et al. Avobenzone encapsulated in modified dextrin for improved UV protection and reduced skin penetration. **Chemical Papers**, v. 70, n. 6, p. 840-847. 2016.

LI, F. et al. Determination of three curcuminoids in *Curcuma longa* by microemulsion electrokinetic chromatography with protective effects on the analytes. **Analytical Methods**, v. 6, n. 8, p. 2566–2571, 2014.

LIN, Y.-H. et al. Application of a multivariate approach for analyte focusing by micelle collapse-micellar electrokinetic chromatography for analyzing sunscreen agents in cosmetics: CE and CEC. **Electrophoresis**, v. 36, n. 19, p. 2396–2403, out. 2015.

LORES, M. et al. Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 915, p. 1–26, abr. 2016.

MARZUKI, N. H.; WAHAB, R. A.; HAMID, M. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 779–797, jan. 2019.

MOHORIC, U. et al. Surfactant-free microemulsion electrokinetic chromatography (SF-MEEKC) with UV and MS detection - a novel approach for the separation and ESI-MS detection of neutral compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 30, p. 8681–8689, dez. 2016.

MURPHY, R. B. et al. The effect of deuteration on the keto–enol equilibrium and photostability of the sunscreen agent avobenzone. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1410–1422, 2020.

NAIR, R.; MASEEH, A. Vitamin D: The “sunshine” vitamin. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 2, p. 118–126, 2012.

NASCIMENTO, L. F. DO; SANTOS, E. P. DOS; AGUIAR, A. P. DE. Organic Sunscreens. Research, Innovation and the Organic Synthesis Importance. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, 2014.

PAUL, B. K.; MOULIK, S. P. Uses and applications of microemulsions. **Current Science**, v. 80, n. 8, p. 13, 2001.

PIÑERO, M.-Y.; BAUZA, R.; ARCE, L. Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications. **Electrophoresis**, v. 32, n. 11, p. 1379–1393, jun. 2011.

PYELL, U. (ED.). **Electrokinetic chromatography: theory, instrumentation, and applications**. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2006.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780. 2004

RODRIGUES, N. D. N.; STANFORTH, M.; STAVROS, V. G. Photophysics of sunscreen molecules in the gas phase: a stepwise approach towards understanding and developing next-generation sunscreens. **Proceedings. Mathematical, Physical, and Engineering Sciences**, v. 472, n. 2195, nov. 2016.

ROOHINEJAD, S. et al. Microemulsions. **Emulsion-based Systems for Delivery of Food Active Compounds**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 231–262.

SAKO, A. V. F. **Determinação simultânea de metil, etil, propil e butilparabeno adsorvido em cabelo por cze-uv mediante stacking por polaridade reversa automática**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SANTOS, S. O.; SOBRINHO, R. R.; OLIVEIRA, T. A. DE. Importância do uso de protetor solar na prevenção do câncer de pele e análise das informações desses produtos destinados a seus usuários. **J. Health Biol Sci**, v. 3, n. 6, p. 279–285, 2018.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization Effect of Quercetin on the UV Filter Combination, Butyl Methoxydibenzoylmethane-Octyl Methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 2, p. 273–278, mar. 2010.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. DOS. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507–515, jun. 2011.

SCHULMAN, J. H.; FRIEND, J. A. Light scattering investigation of the structure of transparent oil-water disperse systems. II. **Journal of Colloid Science**, v. 4, n. 5, p. 497–509, out. 1949.

SCHULMAN, J. H.; MATALON, R.; COHEN, M. X-ray and optical properties of spherical and cylindrical aggregates in long chain hydrocarbon polyethylene oxide systems. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 117, 1951.

SCHULMAN, J. H.; MCROBERTS, T. S. On the structure of transparent water and oil dispersions (solubilised oils). **Transactions of the Faraday Society**, v. 42, p. B165, 1946.

SCHULMAN, J. H.; RILEY, D. P. X-ray investigation of the structure of transparent oil-water disperse systems. I. **Journal of Colloid Science**, v. 3, n. 4, p. 383–405, ago. 1948.

SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1677–1680, out. 1959.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples)†. **Biometrika**, v. 52, n. 3–4, p. 591–611, 1 dez. 1965.

SILVA, A. L. A. et al. A importância do uso de protetores solares na prevenção do fotoenvelhecimento e câncer de pele. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 7, 2015.

SILVA, J. D. F. DA et al. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196–1206, nov. 2015.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos De Química Analítica**. [s.l.] Thomson Pioneira, 2014.

SORADECH, S.; KUSOLKUMBOT, P.; THUBTHIMTHED, S. Development and characterization of microemulsions containing Tiliacora triandra Diels as an active ingredient for antioxidant and melanogenesis stimulating activities. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 2018.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

SUBIRATS, X. et al. Microemulsion electrokinetic chromatography as a suitable tool for lipophilicity determination of acidic, neutral, and basic compounds: CE and CEC. **Electrophoresis**, v. 37, n. 14, p. 2010–2016, jul. 2016.

SUBIRATS, X.; REDÓN, L.; ROSÉS, M. Lipophilicity determination of acidic compounds: MEEKC as a reliable high-throughput methodology. **ADMET**. v. 6. n. 2. p. 153-161, 2018.

SUJATHA, B. et al. Microemulsions - A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 12, n. 6, p. 750–753, 2020.

TERABE, SHIGERU. et al. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 111–113, jan. 1984.

TIPPAVAJHALA, V. K.; MENDES, T. DE O.; MARTIN, A. A. In Vivo Human Skin Penetration Study of Sunscreens by Confocal Raman Spectroscopy. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, p. 753–760, 2018.

VALLEJO, J. J.; MESA, M.; GALLARDO, C. Evaluation of the Avobenzone photostability in solvents used in cosmetic formulations. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 18, n. 1, p. 63–71, 2011.

VICENTINO, P. O. et al. Extraction induced by microemulsion breaking as a novel tool for the simultaneous determination of Cd, Mn, Pb and Sb in gasoline samples by ICP-MS and discrete sample introduction. **Talanta**, v. 206, p. 120230, jan. 2020.

VITALI, L. et al. New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan and κ -carrageenan in capillary electrophoresis: Application in fast analysis of betaine and methionine. **Talanta**, v. 123, p. 45–53, jun. 2014.

WATARAI, H. Microemulsion Capillary Electrophoresis. **Chemistry Letters**, v. 20, n. 3, p. 391–394, mar. 1991.

WEI, M. et al. Quantitative analysis of sesquiterpenes and comparison of three *Curcuma wenyujin* herbal medicines by micro matrix solid phase dispersion coupled with MEEKC. **Electrophoresis**, v. 39, n. 8, p. 1119–1128, abr. 2018.

WU, T. et al. Minireview: Recent advances in the determination of flavonoids by capillary electrophoresis. **Instrumentation Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 364–386, 4 jul. 2018.

XIAO, W. et al. Analysis of Eight Isoflavones in Radix Puerariae by MEEKC: Comparison on Three Different Oil Phases. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 9, p. 1678–1686, out. 2016.

XUAN, X. et al. Determination of drug lipophilicity by phosphatidylcholine-modified microemulsion high-performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 258–264, jul. 2015.

YU, L. et al. Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 140–151, abr. 2012.

APÊNDICE A – Amostras de Protetor Solar

Tabela 18 – Amostras de Protetor Solar

PRODUTO	LISTA DE COMPONENTES
N15	Aqua; Octocrylene; Ethylhexyl Salicylate; Homosalate; Glycerin; Alcohol; Butyl Methoxydibenzoylmethane; Cetearyl Alcohol; Glyceryl Stearate; Hydrogenated Rapeseed Oil; Methylpropanediol; Zea Mays Oil; Glycyrrhetic Acid; Tapioca Starch; Behenyl Alcohol; Silica Dimethyl Silylate; Sodium Stearoyl Glutamate; Ethylhexylglycerin; Trisodium EDTA; Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer; Carbomer; Xanthan Gum; Sodium Hydroxide; Cellulose Gum; Tetrasodium Iminodisuccinate; Sodium Chloride; Phenoxyethanol; Linalool; Benzyl Alcohol; Alpha-Isomethyl Ionone; Citronellol Methyl Benzoate; Tocopherol; BHT; Parfum; CI 40800.
N30	Aqua; Homosalate; Ethylhexyl Salicylate; Octocrylene, Glycerin; Alcohol; Butyl Methoxydibenzoylmethane; Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid; Cetearyl Alcohol; Glyceryl Stearate; Hydrogenated Rapeseed Oil; Methylpropanediol; Silica Dimethyl Silylate; Panthenol; Pantolactone; Tapioca Starch; Behenyl Alcohol; VP/Hexadecene; Copolymer; Sodium Hydroxide; Sodium Stearoyl Glutamate; Ethylhexylglycerin; Trisodium EDTA; Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer; Carbomer; Xanthan Gum; Tetrasodium Iminodisuccinate; Sodium Chloride; Citric Acid; Phenoxyethanol; Linalool; Benzyl Alcohol; Alpha-Isomethyl Ionone; Citronellol; Methyl Benzoate; Tacopherol; BHT; Parfum.
SD30	Aqua; Homosalate; Butyl Methoxydibenzoylmethane; Octocrylene; Glycerin; Aluminum Starch Octenylsuccinate; Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylhutyphenol; Ethylhexyl Triazone; Phenoxyethanol; Cetyl Alcohol; Glyceryl Stearate; Hydroxyacetophenone; Potassium Cetyl Phosphate; Hydrolyzed Jojoba Esters; Triacontanyl PVP; PEG-75 Stearate; Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer; Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine; Disopropyl Adpate; Parfum; Sodium Polyacrylate; Ceteth-20; Steareth-20; Tacopheryl Acetate; Disodium EDTA; Jojoba Esters; Linalool; Sodium Hydroxide; Limonene; Eugenol; Geraniol; Hydroxycitronellol; Citronellol; Coumatin; Amyl Cinnamal; Alpha-Isomethyl Ionone; Benzyl Benzoate.

SD50 Aqua; C12-15 Alkyl Benzoate; Octocrylene; Butyl Methoxydibenzoylmethane; Ethylhexyl Triazone; Aluminum Starch Octenylsuccinate; Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine; Butylene Glycol; Potassium Cetyl Phosphate; Titanium Dioxide; Caprylyl Methicone; Tricontanyl PVP; Benzyl Alcohol; Phenoxyethanol; Dimethicone; Stearyl Alcohol; Tribehenin; Cetyl Palmitate; Triethanolamine; C14-22 Alcohols Parfum (Alpha-Isomethylionone; Amyl Cinnamal; Benzyl Benzoate; Citronellol; Coumatin; d-Limonene; Eugenol; Geraniol; Hydroxycitronellal; Linalool); Silica; Acrylates / C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer; Disodium EDTA; Carbomer; C12-20 Alkyl Glucoside; Tocopheryl Acetate;

AS30 Aqua; Ethylhexyl Methoxycinnamate; Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate; Cetearyl Isononanoate; C12-15 Alkyl Benzoate; Ethylhexyl Salicylate; Potassium Cetyl Phosphate; Cyclopentasiloxane; Titanium Dioxide; Butylene Glycol; Triacontanyl PVP; Octocrylene; Glyceryl Stearate; Cetearyl Alcohol; Cetyl Palmitate; Dimethicone; Phenoxyethanol; Triethanolamine; Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer; Xanthan Gum; Tocopheryl Acetate; Carbomer; Disodium EDTA; Parfum; Alumina; Pentaerythrityl Tetra-di-t-butyl Hydroxyhydrocinnamate; Methylisothiazolinone; *Aloe barbadensis* Leaf Powder; Alpha-Isomethyl Ionone; Amyl Cinamal; Citronellol; Eugenol; Geraniol; Limonene; Linalool; Coumarin.