

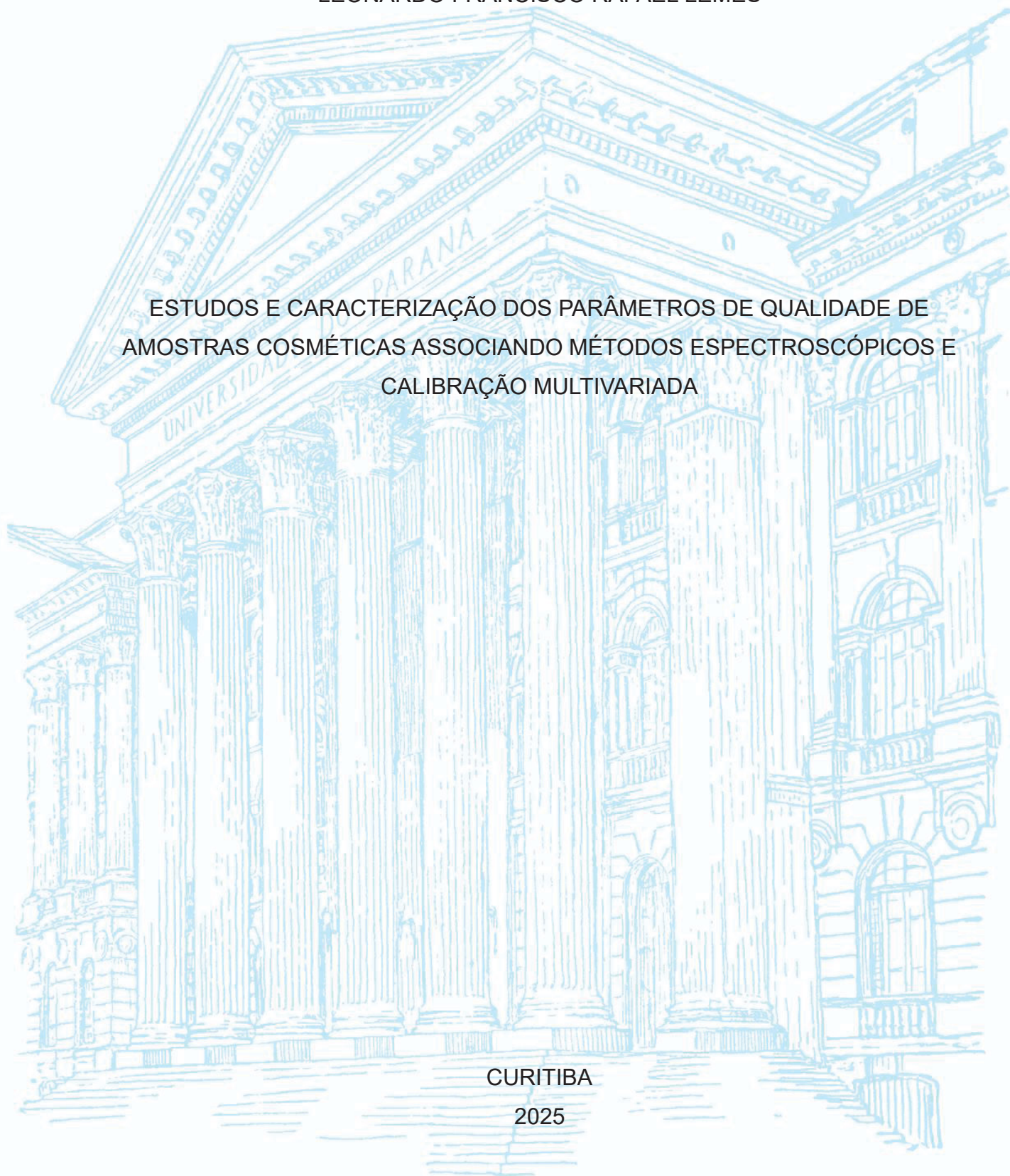
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO FRANCISCO RAFAEL LEMES

ESTUDOS E CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE
AMOSTRAS COSMÉTICAS ASSOCIANDO MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

CURITIBA

2025



LEONARDO FRANCISCO RAFAEL LEMES

ESTUDOS E CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE
AMOSTRAS COSMÉTICAS ASSOCIANDO MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Química, Setor de Ciências Exatas, da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em
Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

Co-orientador: Prof. Dr. Frederico L. F. Soares

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Lemes, Leonardo Francisco Rafael

Estudos e caracterização dos parâmetros de qualidade de amostras
cosméticas associando métodos espectroscópicos e calibração multivariada /
Leonardo Francisco Rafael Lemes. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Noemi Nagata

Coorientador: Frederico L. F Soares

1. Cosméticos. 2. Quimiometria. 3. Raman, Espectroscopia de. 4.
Calibração. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Nagata, Noemi. IV. Soares, Frederico L. F. V.
Título.

Bibliotecário: Douglas Lenon da Silva CRB-9/1892

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LEONARDO FRANCISCO RAFAEL LEMES**, intitulada: **ESTUDOS E CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE AMOSTRAS COSMÉTICAS ASSOCIANDO MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**, sob orientação da Profa. Dra. NOEMI NAGATA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Dezembro de 2025.

Assinatura Eletrônica

18/12/2025 22:13:23.0

NOEMI NAGATA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/12/2025 11:15:43.0

DIOGO SILVA PELLOSI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/12/2025 16:47:57.0

ANDREA PINTO DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/01/2026 16:38:38.0

RENATO LAJARIM CARNEIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

Assinatura Eletrônica

03/01/2026 15:05:33.0

POLIANA MACEDO DOS SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Bom, esta é literalmente a última coisa que escrevo nesta tese (utilizando minha Comic Sans como fonte), sendo assim deixo uma mensagem para você leitor do futuro (eu sei que você parou para ler os agradecimentos, eu faço isso também), um conselho que posso te dar é para que tu nunca desistas dos seus sonhos, com certeza você topará com pessoas que te diminuirão ou não te ajudarão em nada, só siga em frente. **OBS: a frase mais importante desta tese está no final desta página.**

Em primeiro lugar, agradeço imensamente minha companheira Alana, a qual tens todo o meu amor. Você me acompanhou deste o momento que pisei no laboratório e desde então se tornou a minha companheira de vida. Obrigado por passar todos os momentos junto comigo, compartilhar de todas as vitórias e derrotas. Sou muito grato por você e pelo nosso Sonnequinho que está no céu hoje. Sim, desde que eu te vi...sim.

Agradeço também a minha família e amigos que mesmo longe sempre apoiaram e deram todo o incentivo (mesmo sem fazer ideia do que um doutorado é). Agradeço em especial, minha vó Luzia, minha tia Sebastiana, meu Tio Pedro e minha irmã Isabelle, essa vitória minha é um reflexo de vocês e com certeza uma vitória de vocês também.

Aos professores Noemi e Frederico, muito obrigado pela orientação, pelos ensinamentos, pelos conselhos de vida, pela confiança, pelas oportunidades de estar em vários tipos de trabalhos e aprender vários equipamentos, isso com certeza foi muito valioso para o meu aprendizado e crescimento pessoal e profissional. Muito obrigado!

Um agradecimento para os membros da banca que dispuseram do seu tempo para dar suas contribuições e participar deste momento que para mim será único, obrigado profa. Poliana M. dos Santos, Prof. Diogo Pelloso e Profa. Andrea P. de Oliveira.

Um agradecimento aos laboratórios parceiros, sem os quais este trabalho não seria possível ser realizado, obrigado Profa. Leni e ao seu lab LaPPS pela disponibilidade do espectrofluorímetro, ao Prof. Rilton e ao seu lab BIOPOL pela estrutura disponibilizada em todo o cap. 2, ao CME-UFPR pela disponibilidade de treinamento e operação do Raman, foi com certeza meu maior aprendizado nesta tese, valeu CME e ao LAMEAA da UTFPR pelas análises de LC-MS/MS do cap.3. Valeu!

Aos colegas de laboratório, muito obrigado pelos momentos, pelas discussões e aprendizados, espero ter ensinado alguma para vocês, porque com certeza eu aprendi muito com cada um. Valeu!!

C'EST LA VIE

Chemometricians are people that steal ideas from staticians and drinks beers.
Chemometricians are more than only people who steals ideas from staticians but
also just don't drink only beer (D. Rutledge, 2025).

RESUMO

Com o aumento global no consumo de produtos cosméticos, a qualidade e a segurança do produto final tornaram-se cruciais. A indústria cosmética tem modernizado seus processos, visando máxima eficiência e combinando qualidade com custo operacional. Neste trabalho, propõe-se a utilização de calibração multivariada em três aplicações distintas de interesse da indústria: quantificação de ingredientes ativos em repelentes, avaliação da estabilidade de emulsões e quantificação de conservantes. Na primeira parte, desenvolveu-se uma metodologia para a quantificação simultânea de três ingredientes ativos em repelentes comerciais, utilizando Espectroscopia de Excitação-Emissão de Fluorescência (EEM) e métodos de ordem superior (MCR-ALS e PARAFAC). Os modelos quimiométricos apresentaram boas recuperações dos espectros puros, mesmo com sobreposições severas, e obtiveram erros de predição (REP) abaixo de 12%. A comparação com o método de referência (HPLC-DAD) demonstrou que os resultados não apresentaram diferença significativa com 95% de confiança em termos de exatidão. Na segunda parte, um estudo multivariado avaliou a estabilidade de emulsões cosméticas, seguindo o "Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos" da ANVISA. Empregou-se um planejamento fatorial 2^3 associado ao Imageamento Hiperespectral Raman e quimiometria (MCR-ALS) para a análise química, e reologia para a avaliação física. Indícios de oxidação do surfactante foram observados a partir de 24 horas em alguns experimentos e, após 30 dias, todos os ensaios apresentaram desestabilização física da emulsão. Por fim, na terceira parte, desenvolveu-se uma metodologia para a determinação de seis conservantes em diversas matrizes cosméticas, combinando HPLC-DAD com a comparação de três métodos quimiométricos (MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL). As ferramentas baseadas em recuperação de sinal (PARAFAC e MCR-ALS) apresentaram boas recuperações dos perfis espectrais e de eluição, mesmo com sobreposição severa. Os três métodos se mostraram eficientes, com REP abaixo de 12,6%. A validação com LC-MS/MS, avaliada pelo EJCR, confirmou que os resultados propostos não apresentaram diferença significativa, atestando a exatidão da metodologia.

Palavras-chave: Cosméticos; quimiometria; espectroscopia raman; espectroscopia de fluorescência molecular; calibração multivariada.

ABSTRACT

With the global increase in the consumption of cosmetic products, ensuring the quality and safety of the final product has become paramount. Consequently, the cosmetics industry is modernizing its processes to achieve maximum efficiency by balancing quality standards with operational costs. This work proposes the application of multivariate calibration across three distinct areas of industrial interest: the quantification of active ingredients in repellents, the stability assessment of cosmetic emulsions, and the quantification of preservatives. In the first part, a methodology was developed for the simultaneous quantification of three active ingredients in commercial repellents using Excitation-Emission Matrix (EEM) fluorescence spectroscopy coupled with higher-order chemometric methods (MCR-ALS and PARAFAC). The chemometric models demonstrated good recovery of pure spectral profiles, despite severe spectral overlap, achieving prediction errors (REP) below 12%. Comparison with the reference method (HPLC-DAD) revealed no significant difference at the 95% confidence level, attesting to the method's accuracy. The second part involved a multivariate study to evaluate the stability of cosmetic emulsions, following the guidelines established by ANVISA's "Guide on Stability of Cosmetic Products." A 2^3 factorial design was employed, combining Raman Hyperspectral Imaging and chemometrics (MCR-ALS) for chemical analysis, with rheology used for physical assessment. Indications of surfactant oxidation were observed as early as 24 hours in certain experiments, and after 30 days, all trials exhibited physical destabilization of the emulsion. Finally, in the third part, a methodology was developed for the determination of six preservatives in various cosmetic matrices, coupling HPLC-DAD with a comparative analysis of three chemometric methods (MCR-ALS, PARAFAC, and U-PLS/RBL). The signal recovery-based tools (PARAFAC and MCR-ALS) demonstrated effective recovery of spectral and elution profiles, even in the presence of severe overlap. All three methods proved efficient, yielding REP values below 12.6%. Validation using LC-MS/MS, assessed via the EJCR test, confirmed that the proposed results showed no significant difference, thereby verifying the accuracy of the methodology.

Keywords: Cosmetics; chemometrics; raman spectroscopy; fluorescence spectroscopy; multi-way calibration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESPALHAMENTO DA RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA APÓS INCIDÊNCIA SOBRE UMA AMOSTRA	22
FIGURA 2 - ESPALHAMENTO STOKES E ANTI-STOKES DO CLOROFÓRMIO....	23
FIGURA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE IR E RAMAN PARA AS MOLÉCULAS MESITILENO E INDENO	25
FIGURA 4 - PUBLICAÇÕES ENVOVENDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2025.....	26
FIGURA 5 - DIAGRAMA DE ENERGIA DE JABLONSKI.	29
FIGURA 6 - EFEITO DA RIGIDEZ ESTRUTURAL SOBRE O RENDIMENTO QUÂNTICO DE A) FLUORENO E B) BIFENILA	31
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO MODELO PARAFAC DECOMPOSIÇÃO DE UM ARRANJO DE DADOS TRIDIMENSIONAL.	33
FIGURA 8 - LEVANTAMENTO DO NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS PARA DENGUE, ZIKA E <i>CHIKUNGUNYA</i> ENTRE OS ANOS DE 2020 ATÉ O PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2025.	42
FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCÍPIOS ATIVOS UTILIZADOS EM FORMULAÇÕES DE REPELENTES COMERCIAIS	43
FIGURA 10 - MATRIZ EEM SEM O PRÉ-TRATAMENTO (A) E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (B).	53
FIGURA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS ESPECTRAIS DE EMISSÃO PUROS (A) E EXCITAÇÃO (B) E AQUELES RECUPERADOS PELO MODELO PARAFAC PARA OS ANALITOS DEET, ICARIDINA, IR3535 E UM COFATOR INTERFERENTE.....	56
FIGURA 12 - DESDOBRAMENTO DE DADOS DE TRÊS VIAS EM MATRIZES BIDIRECIONAIS E DECOMPOSIÇÃO DE MATRIZES DE DADOS AUMENTADAS POR MCR-ALS.	57
FIGURA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS ESPECTRAIS DE EMISSÃO (A) E EXCITAÇÃO (B) E AQUELES RECUPERADOS PELO MODELO MCR-ALS PARA OS ANALITOS DEET, ICARIDINA, IR3535 E UM COFATOR INTERFERENTE.....	58
FIGURA 14 - CURVA ANALÍTICA OBTIDAS PELOS MÉTODOS PARAFAC E MCR-ALS PARA O A) DEET, B) ICARIDINA E C) IR3535.	59

FIGURA 15 - ELIPSE DE CONFIANÇA PARA OS MÉTODOS PARAFAC (PRETO) E MCR-ALS (AZUL) PARA A) DEET, B) ICARIDINA E C) IR3535.....	64
FIGURA 16 - ILUSTRAÇÃO DE EMULSÃO DE ÓLEO EM ÁGUA (O/A) ESTABILIZADA UTILIZANDO SURFACTANTE.	68
FIGURA 17 - CAIXAS SIMULANDO OS NÍVEIS PROPOSTOS NO PLANEJAMENTO 2 ³ COM PONTO CENTRAL A) ENSAIOS 2,4,6 E 8. B) ENSAIOS 3 E 7. C) ENSAIOS DO PONTO CENTRAL.....	76
FIGURA 18 - CUBO DE IMAGEM E MODELO BILINEAR.....	78
FIGURA 19 - ESPECTRO RAMAN DO CREME PURO.	79
FIGURA 20 - ESPECTRO RAMAN DO PRINCÍPIO ATIVO FOTOPROTETOR BENZOFENONA-5.....	80
FIGURA 21 - ANÁLISE DO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 24 HORAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS.	82
FIGURA 22 - ANÁLISE DO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 24 HORAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS.	83
FIGURA 23 - ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS DO ENSAIO 2 EM 24 HORAS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO.	84
FIGURA 24 - ANÁLISE DO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 24 HORAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS.	85
FIGURA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MAPAS RECUPERADOS PELO MCR-ALS PARA O CREME E PARA A OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO NO EXPERIMENTO 8 EM 24 HORAS (A) E (B) ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO.....	86
FIGURA 26 - GRÁFICOS DAS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA NO TEMPO DE 24 HORAS PARA OS ENSAIOS: 2 (AZUL), 10 (VERDE) E 8 (VERMELHO) DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.	88
FIGURA 27 - ANÁLISE DO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 7 DIAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS.....	89

FIGURA 28 - ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS DA AMOSTRA DO ENSAIO 2 EM 7 DIAS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO.	90
FIGURA 29 - ANÁLISE DO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 7 DIAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS.	91
FIGURA 30 - ANÁLISE DO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 7 DIAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS.	92
FIGURA 31 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MAPAS RECUPERADOS PELO MCR-ALS PARA O CREME E PARA A OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO NA AMOSTRA DO ENSAIO 8 EM 7 DIAS (A) E (B) ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO.	93
FIGURA 32 - GRÁFICOS DAS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA NO TEMPO DE 7 DIAS PARA OS ENSAIOS: 2 (AZUL), 10 (VERDE) E 8 (VERMELHO) DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.	94
FIGURA 33 - COMPILADO DOS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS POSSIVELMENTE OXIDADOS NO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA A) 24 HORAS, B) 7 DIAS, C) 15 DIAS E D) 30 DIAS.	95
FIGURA 34 - COMPARAÇÃO DO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO ENTRE OS TEMPOS 24 HORAS E 30 DIAS DE ESTUDO PARA A) ESTRUTURA FÍSICA OBSERVADA PELO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS DO CREME HIDRATANTE.	96
FIGURA 35 - COMPARAÇÃO ENTRE AS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA PARA O PONTO 2 EM: 24 HORAS (AZUL), 7 DIAS (VERMELHO), 15 DIAS (VERDE) E 30 DIAS (PRETO).	97
FIGURA 36 - COMPARAÇÃO DO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO ENTRE OS TEMPOS 24 HORAS E 30 DIAS DE ESTUDO PARA A) ESTRUTURA FÍSICA OBSERVADA PELO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS DO CREME HIDRATANTE.	98
FIGURA 37 - COMPILADO DOS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS POSSIVELMENTE OXIDADOS NO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA A) 24 HORAS, B) 7 DIAS, C) 15 DIAS E D) 30 DIAS.	97

FIGURA 38 - COMPARAÇÃO DO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO ENTRE OS TEMPOS 24 HORAS E 30 DIAS DE ESTUDO PARA A) ESTRUTURA FÍSICA OBSERVADA PELO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS DO CREME HIDRATANTE.	100
FIGURA 39 - COMPILADO DOS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS POSSIVELMENTE OXIDADOS NO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA A) 24 HORAS, B) 7 DIAS, C) 15 DIAS E D) 30 DIAS.	101
FIGURA 40 - COMPARAÇÃO ENTRE AS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA PARA O PONTO 10 EM: 24 HORAS (AZUL), 7 DIAS (VERMELHO), 15 DIAS (VERDE) E 30 DIAS (PRETO).	103
FIGURA 41 - (A) CROMATOGRAMA MULTICANAL DA SOLUÇÃO PADRÃO MISTA (C16); (B) PERFIL DE CONTOURO 2-D DO C16;(C) E (D) PERFIL DE CONTOURO 2-D DE DUAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE PRODUTOS COSMÉTICOS.	116
FIGURA 42 - PERFIS DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA DE AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO. A FIGURA INSERIDA MOSTRA AMPLIAÇÃO LOCAL DOS PERFIS DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA PARA MPB + POE EM DIFERENTES AMOSTRAS.	117
FIGURA 43 - PERFIS RESOLVIDOS DA PRIMEIRA REGIÃO (R-I) DECOMPOSTOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC. PERFIS ESPECTRAIS (FIG. 43(A) E 43(C)), E PERFIS CROMATOGRÁFICOS (FIG. 43(B) E 43(D)), RESOLVIDOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC, RESPECTIVAMENTE.	120
FIGURA 44 - PERFIS RESOLVIDOS DA SEGUNDA REGIÃO (R-II) DECOMPOSTOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC. PERFIS ESPECTRAIS DOS ANALITOS E DAS INTERFERÊNCIAS (FIG. 44(A) E 44(C)), E PERFIS CROMATOGRÁFICOS (FIG. 44(B) E 44(D)), RESOLVIDOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC, RESPECTIVAMENTE.	121
FIGURA 45 - PERFIS RESOLVIDOS DA TERCEIRA REGIÃO (R-III) DECOMPOSTOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC. PERFIS ESPECTRAIS DO TCS E DA INTERFERÊNCIA (FIG. 45(A) E 45(C)), E PERFIL CROMATOGRÁFICO (FIG. 45(B) E 45(D)), RESOLVIDOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC, RESPECTIVAMENTE.	122
FIGURA 46 - ELIPSE DE CONFIANÇA PARA OS CONSERVANTES QUANTIFICADOS EM AMOSTRAS COMERCIAIS POR LC-MS/MS E PARA OS MÉTODOS MCR-ALS (A) E PARAFAC (B) E U-PLS/RBL (C).	127

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VÁRIOS TIPOS DE LUMINESCÊNCIA.....	27
TABELA 2 - FATORES, NÍVEIS E MATRIZ EXPERIMENTAL DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROID UTILIZADO PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E CONSTRUÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS.	49
TABELA 3 - ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR E SEUS RESULTADOS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS PROPOSTOS.	60
TABELA 4 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA A AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE MODELOS PARAFAC E MCR-ALS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM REPELENTES.	61
TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535 EM AMOSTRAS DE REPELENTES COMERCIAIS USANDO OS MÉTODOS PROPOSTOS (PARAFAC E MCR-ALS) E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE REFERÊNCIA HPLC-DAD. ...	63
TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES DESCRITAS NO RÓTULO, DETERMINADOS POR HPLC-DAD E ESTIMADOS PELOS MODELOS PARAFAC E MCR-ALS.....	65
TABELA 7 - LISTA DE INGREDIENTES USADOS PARA PREPARAR AS EMULSÕES COSMÉTICAS A/O.....	73
TABELA 8 - VARIÁVEIS E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM PONTO CENTRAL PARA TRIAGEM DO EFEITO DAS VARIÁVEIS NA FORMULAÇÃO DE CREME COSMÉTICOS.	74
TABELA 9 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS DESTE ESTUDO.	110
TABELA 10 - AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO PARA CONSTRUÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS DE SEGUNDA ORDEM.	111
TABELA 11 - AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CONSTRUÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS DE SEGUNDA ORDEM.....	112
TABELA 12 - PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DA FONTE DE <i>ELECTROSPRAY</i> E CONDIÇÕES DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA ANÁLISES NO MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO E NEGATIVO E VARREDURA EM MONITORAMENTO DE REAÇÕES MÚLTIPLAS (MRM).	114
TABELA 13 - INTERVALOS DE TEMPO DE RETENÇÃO CROMATOGRÁFICOS E ESPECTRAIS SELECIONADOS, JUNTAMENTE COM NÚMEROS DE	

COMPONENTES EM CADA REGIÃO PARA MODELOS PARAFAC, MCR-ALS E U-PLS/RBL.....	118
TABELA 14 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA A AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO MODELOS PARAFAC, MCR-ALS E U-PLS/RBL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CONSERVANTES EM AMOSTRAS COSMÉTICAS.....	124
TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES DOS CONSERVANTES EM AMOSTRAS COMERCIAIS DETERMINADOS POR LC-MS/MS E ESTIMADOS PELOS MODELOS PARAFAC, MCR-ALS E U-PLS/RBL.....	126

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 COSMÉTICOS – UM CONTEXTO HISTÓRICO	17
2.2 PARÂMETROS DE INTERESSE DA INDÚSTRIA COSMÉTICA	19
2.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN	19
2.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR.....	26
2.5 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS	32
2.5.1 ANÁLISE DE FATORES PARALELOS - PARAFAC.....	32
2.5.2 RESOLUÇÃO DE CURVA MULTIVARIADA COM MÍNIMOS QUADRADOS ALTERNADOS – MCR-ALS	35
2.5.3 MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS DESDOBRADOS E BILINEARIZAÇÃO RESIDUAL (U-PLS/RBL).....	37
3. SEÇÃO I - DETERMINAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535 EM REPELENTES DE INSETOS USANDO ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE MATRIZ DE EXCITAÇÃO-EMIÇÃO (EEM) E CALIBRAÇÃO DE ORDEM SUPERIOR.....	40
3.1 INTRODUÇÃO	40
3.2 OBJETIVOS	46
3.2.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	47
3.3.2 AMOSTRAS	47
3.3.3 DADOS DE FLUORESCÊNCIA EEM E SOFTWARE	47
3.3.4 PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROID DESIGN	48
3.3.5 CONJUNTO TESTE PARA VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS	49
3.3.6 ANÁLISE DE HPLC PARA A DETERMINAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535	50
3.3.7 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	50
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

3.4.1 ANÁLISE ESPECTRAL E PRÉ-TRATAMENTO	52
3.4.2 PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROID DESIGN PARA A CALIBRAÇÃO DOS MODELOS PARAFAC E MCR-ALS.....	55
3.4.3 PREVISÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535 EM AMOSTRAS DESCONHECIDAS UTILIZANDO OS MODELOS PARAFAC E MCR-ALS.....	60
3.4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR HPLC-DAD.....	62
3.5 CONCLUSÃO.....	66
4. SEÇÃO II - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES: REOLOGIA, IMAGEAMENTO HIPERESPECTRAL E ESPECTROSCOPIA RAMAN ASSOCIADOS À QUIMIOMETRIA.....	67
4.1 INTRODUÇÃO	67
4.2 OBJETIVOS	72
4.2.1 OBJETIVO GERAL.....	72
4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	72
4.3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	72
4.3.2 PREPARO DA EMULSÃO.....	73
4.3.3 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA O TESTE DE ESTABILIDADE	73
4.3.4 ANÁLISE RAMAN	76
4.3.5 DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO	77
4.3.6 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	77
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN PARA O CREME PURO E O PRINCÍPIO ATIVO BENZOFENONA-5	78
4.4.2 ESTUDO MULTIVARIADO DA ESTABILIDADE DE EMULSÃO.....	80
4.5 CONCLUSÃO.....	104
5. SEÇÃO III - UMA COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MODELOS DE SEGUNDA ORDEM PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SEIS CONSERVANTES COM SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL SEVERA UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (HPLC-DAD).....	105
5.1 INTRODUÇÃO	105

5.2 OBJETIVOS	108
5.2.1 OBJETIVO GERAL.....	108
5.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	108
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	109
5.3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	109
5.3.2 AMOSTRAGEM E PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	110
5.3.3 AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO EXTERNA.....	111
5.3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	112
5.3.5 ANÁLISE DOS DADOS E SOFTWARE	113
5.3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	113
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
5.4.1 ANÁLISE DE DADOS BRUTOS E PREOCUPAÇÕES GERAIS COM DADOS HPLC-DAD	114
5.4.2 CONFIGURAÇÃO DE PARÂMETROS PARA CALIBRAÇÃO DOS MODELOS	117
5.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CONSERVANTES EM COSMÉTICOS.....	119
5.4.3.1 RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO, VALIDAÇÃO EXTERNA E FIGURAS DE MÉRITO.....	119
5.4.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO	124
5.5 CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS.....	129
APÊNDICE A – FOTOS DOS EXPERIMENTOS DA SEÇÃO 2	150
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO DA TESE.....	153

1. INTRODUÇÃO GERAL

A indústria cosmética tem se consolidado como um dos setores econômicos mais poderosos e influentes no cenário global, com um mercado que movimenta cerca de 500 bilhões de dólares anualmente, com uma estimativa de 800 bilhões para 2025 (Kaushik *et al.*, 2023). Esse aumento nos números de vendas está relacionado com aumento do poder aquisitivo da população, uma busca constante por novos produtos que gerem bem-estar e melhorem a autoestima, diversidade de produtos cosméticos desenvolvidos para atendimento da pluralidade populacional, aumento das campanhas de marketing de produtos, tornando-a uma das indústrias de maior expansão no mundo. O volume de produção e consumo de cosméticos alcança patamares cada vez mais elevados, abrangendo desde cuidados pessoais básicos até produtos de alto desempenho, o que demonstra a abrangência e a relevância do setor na vida cotidiana de bilhões de pessoas (Jairoun *et al.*, 2022).

Contudo, considerando que os produtos cosméticos são aplicados diretamente na pele humana, a segurança do consumidor torna-se um aspecto central na regulamentação desse setor e com o crescente uso de substâncias químicas nas formulações, surgem preocupações sobre a toxicidade e os efeitos adversos de alguns desses ingredientes. Diversos estudos apontam que a exposição a produtos cosméticos que contêm substâncias nocivas pode resultar em complicações graves à saúde, como alergias e até mesmo câncer (Passeron *et al.*, 2021). Portanto, o cumprimento rigoroso das regulamentações de segurança, como testes dermatológicos e a avaliação dos ingredientes, é fundamental para garantir a proteção dos consumidores (Tsai *et al.*, 2022; Fania *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a indústria cosmética investe significativamente em processos de pesquisa e desenvolvimento (P&D), buscando não apenas inovações em fórmulas e ativos, mas também garantindo a confiabilidade dos seus produtos em termos de segurança, estabilidade e eficácia ao longo do tempo. A segurança do consumidor é uma prioridade fundamental, em que se exige a adoção de rigorosos protocolos de testes clínicos e análises químicas com foco na substituição de métodos tradicionais de avaliação de risco, como testes em animais, por novas metodologias mais eficazes e éticas (Vieira *et al.*, 2024).

Dessa forma, a indústria cosmética se destaca não apenas pelo seu peso econômico, mas também pela sua capacidade de inovar e garantir a segurança e bem-

estar dos consumidores, consolidando-se como um setor essencial no mercado global.

Desta maneira, esta tese de doutorado se dividirá em 3 capítulos com temas relevantes para a indústria cosmética. No primeiro capítulo uma nova metodologia analítica baseada em quimiometria foi desenvolvida com o intuito de quantificar os três ingredientes ativos comumente encontrados em formulações de repelentes de insetos. No segundo capítulo, foi desenvolvido um estudo acelerado para avaliar a estabilidade de emulsões baseada nos fatores extrínsecos e intrínsecos da ANVISA de forma multivariada, por meio de uma visão química (espectroscopia Raman) e física (Reologia). E por fim, no terceiro capítulo uma metodologia analítica baseada em quimiometria de ordem superior foi desenvolvida com o intuito de quantificar os seis conservantes comumente encontrados em formulações cosméticas variadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COSMÉTICOS – UM CONTEXTO HISTÓRICO

Os cosméticos sempre desempenharam um papel significativo na história humana, estando presentes em contextos históricos que vão das sociedades pré-históricas às contemporâneas. Eles não apenas adornaram a forma humana, mas também sinalizaram importantes mudanças nos costumes sociais e nas normas culturais. Essa progressão histórica, exemplificada pela evolução dos padrões de beleza — da extravagância renascentista ao design minimalista moderno —, reflete a mutabilidade da sociedade frente às perspectivas culturais. Uma análise cronológica é, portanto, essencial para compreender como os cosméticos moldaram e contribuíram para a sociedade moderna (Park & Hong, 2024; Lal & Mirsha, 2025).

Os primeiros registros de uso de cosméticos datam do período pré-histórico, aproximadamente 30.000 a.C., quando corantes, perfumes (na forma de unguentos, incensos) e substâncias para maquiagem eram empregados em pinturas corporais, tatuagens, rituais e guerras (Latif, 2021).

Embora haja indícios pré-históricos, o início da ciência dos cosméticos é amplamente associado ao Antigo Egito, tendo a rainha Cleópatra como personalidade central. Cleópatra é conhecida por utilizar banhos de leite e argila para hidratar a pele e cabelos, além de pó de Kolh (ou Kajal) nos olhos. É relevante notar que estudos comprovam que as substâncias e técnicas por ela utilizadas possuíam também uma

atividade terapêutica, transcendendo a mera finalidade de vaidade (McMullen *et al.*, 2023). Neste mesmo contexto egípcio, sais de antimônio eram aplicados nos olhos para protegê-los do sol, e cremes à base de gordura vegetal, animal, cera de abelhas, mel e leite protegiam a pele contra o clima desértico (Riesmeier *et al.*, 2022).

Na Idade Antiga, o desenvolvimento continuou. Na Grécia, Hipócrates, considerado o pai da medicina, instruía sobre a importância de hábitos de higiene, como banhos e exercícios (Tanikawa, 2015). No Império Romano, o físico Galeno desenvolveu o *Ungentum Refrigerans* (base de cera de abelha, azeite e água de rosas), posteriormente aprimorado com pigmentos, dando origem à base cremosa facial (McMullen *et al.*, 2023).

A Idade Média, denominada "Idade das Trevas", viu uma repressão na ciência dos cosméticos devido à contenção da vaidade e dos hábitos de higiene pela Igreja Católica. Contudo, em virtude das precárias condições de higiene da população, o uso de maquiagem e perfumes aumentou. O desenvolvimento foi retomado com a queda do Império Bizantino e a influência do Renascimento, que colocou o homem no centro das atenções, promovendo o uso de cosméticos (Lal & Mirsha, 2025).

O século XVIII foi marcado por diversas inovações tecnológicas que impulsionaram a indústria de cosméticos. Um grande avanço foi o lançamento da "Eau de Cologne" (água perfumada) pelo italiano Giovanni Maria Farina em 1725 (Latif, 2021).

Na Idade Contemporânea, que se inicia com a Revolução Francesa, o uso e a produção industrial de cosméticos foram significativamente ampliados. No século XIX, embora a fabricação fosse majoritariamente caseira, o final do século viu o lançamento do primeiro sabonete produzido industrialmente pela Procter & Gamble em 1878 (Friedman & Wolf, 1996).

O século XX consolidou o crescimento industrial, com a introdução de inovações como desodorantes em tubos, laquêns, tinturas de cabelo menos tóxicas e pasta de dente com flúor (Lal & Mirsha, 2025). Nesse período, também surgiram órgãos reguladores para garantir a segurança dos consumidores, como o *Federal Food, Drug and Cosmetics Act* (Lile, 2023) e a *European Commission Directive* (U Kassim, H., & Dimitrakopoulos, 2007). No Brasil, o desenvolvimento da indústria se deu na segunda metade do século XX, sendo que o país alcançou a terceira posição entre os maiores mercados mundiais no início do século XXI (De Sousa, 2022).

2.2 PARÂMETROS DE INTERESSE DA INDÚSTRIA COSMÉTICA

O controle de qualidade é uma peça fundamental no processo de fabricação de qualquer produto, pois ele garante a total confiabilidade de que o produto está dentro dos padrões especificados pelas agências reguladoras, como também garante a segurança do produto. Para o controle correto do produto é necessário, avaliar as características físicas, químicas e microbiológicas das matérias-primas, embalagens, produtos em processo e produtos acabados. Assim, a verificação da conformidade das especificações deve ser vista como um requisito necessário para a garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto e não somente como uma exigência regulatória (ANVISA, 2008).

As análises de rotina de um laboratório de controle de qualidade normalmente abrangem as análises organolépticas (cor, odor, aspecto e tato), análises físico-químicas (pH, viscosidade, densidade), análises microbiológicas, e a composição de produtos de interesse da indústria ou com potencial risco toxicológico ao consumidor.

Outro ponto muito importante no controle de qualidade é o estudo sobre a estabilidade das emulsões, no qual, nos permite adquirir informações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2008). Esse estudo de estabilidade pode ser classificado em fatores extrínsecos e fatores intrínsecos. Os fatores extrínsecos podem ser denominados em tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade. E os fatores intrínsecos podem ser denominados em incompatibilidade física e incompatibilidade química (pH e reações de óxido-redução).

2.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As medidas que se baseiam na luz ou em outras formas de radiação eletromagnética são amplamente aplicadas na química analítica. Nesse contexto, os métodos espectroscópicos (Ex.: Espectroscopia Raman) é a ciência que estuda os fundamentos teóricos e os fenômenos físicos decorrentes da interação entre radiação (eletromagnética ou corpuscular) e a matéria. Foca na compreensão das transições de energia (ex: vibracionais, eletrônicas) e nas regras de seleção. Este tipo de interação pode ocorrer por diversos fenômenos, dentre os quais é possível citar: absorção, emissão, espalhamento de fótons. No processo de **absorção de fótons**, a molécula

sofre alterações de seu estado energético que se manifestam em transições: eletrônicas (transição de um elétron para um orbital de maior energia), vibracionais (alteração nos níveis de energia vibracional associados às ligações) e rotacionais (alteração nos níveis de energia de rotação da molécula) (Skoog *et al.*, 2015).

Já no fenômeno de **emissão**, um **elétron** excitado passa para um nível mais energético, por meio de bombardeamento de elétrons, partículas elementares, exposição a plasmas de altas temperaturas, chama, entre outras fontes de energia, permanecendo em seu estado excitado por um período muito curto (10^{-9} a 10^{-6} s) e quando há o relaxamento para um nível de menor energia ou para o estado fundamental ocorre uma liberação do excesso de energia na forma de radiação eletromagnética ou de calor, sendo caracterizado com emissão eletromagnética (Skoog *et al.*, 2015).

O espalhamento de radiação eletromagnética, pode ser baseado na observação de fótons com energias próximas ou iguais a energia incidida sobre a amostra, entretanto com uma trajetória diferente. Quando a energia é espalhada, os fótons que foram dispersos (ou espalhados) sucedem de duas formas, o espalhamento elástico e inelástico. No espalhamento elástico não ocorre nenhuma mudança na frequência do fóton ou nenhuma mudança no seu comprimento de onda e energia. Este tipo de espalhamento é mais conhecido como espalhamento Rayleigh. De outra forma, o espalhamento inelástico é acompanhado pela mudança na frequência do fóton devido à excitação ou desativação de vibrações moleculares nas quais o fóton pode ganhar alguma quantidade de energia (Anti-Stokes) ou perder energia (Stokes), sendo conhecido como Efeito Raman (Skoog *et al.*, 2009).

Historicamente, o efeito Raman foi previsto pelo físico Adolf Smekal em 1923 (Smekal, 1923) e comprovado teoricamente pelos físicos teóricos Kramers e Heisenberg em 1925 (Kramers & Heisenberg, 1925). Entretanto, somente em 1928 Sir Chandrasekara Venkata Raman comprovou experimentalmente o efeito, no qual mais tarde receberia seu nome (Raman & Krishnan, 1928).

O arranjo experimental adotado foi bem simples e consistiu na utilização da luz solar como fonte de radiação, um microscópio com um filtro de comprimento de onda que permitia passar radiação na região mais energética (violeta), que posteriormente era focada sobre um líquido transparente. A radiação espalhada passava por outro filtro que selecionava a região menos energética (amarelo), sendo o detector seus

próprios olhos. Sendo assim, o fato de o espalhamento inelástico da radiação ser um fenômeno pouco provável (pouco sensível) fez com que o mérito do seu descobrimento fosse reconhecido mundialmente, tendo sido agraciado com o prêmio Nobel de Física em 1930 (De Faria *et al.*, 1997).

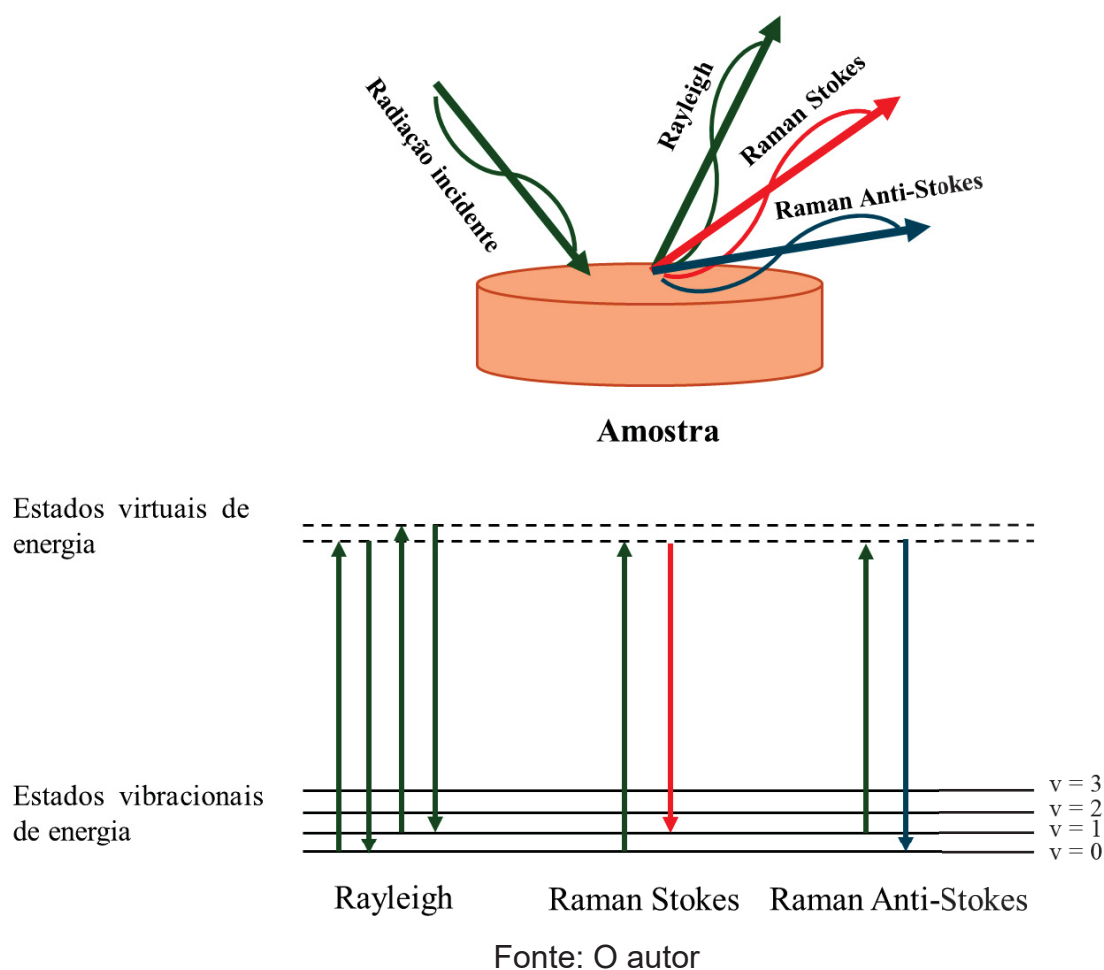
No espalhamento Raman, a luz (fóton) interage com a nuvem eletrônica da molécula causando uma distorção. Durante esta interação do fóton com a nuvem eletrônica, a radiação polariza a nuvem de elétrons ao redor dos núcleos para formar um estado de curta duração denominado “estado virtual”. Este estado não é estável e o fóton é rapidamente re-irradiado na forma de fótons espalhados (Smith & Dent., 2013).

Durante a interação entre a radiação e a molécula, o fóton (de energia E) excita rapidamente a molécula ao seu estado virtual, no qual três possibilidades podem ocorrer em relação a energia da molécula. Primeiramente, o caso mais comum e intenso é o espalhamento elástico, ou **espalhamento Rayleigh**, no qual os fótons são espalhados sem mudança de frequência (energia). Nesse processo, a molécula retorna ao seu estado fundamental sem que ocorra troca líquida de energia com o fóton incidente ($E=E_0$), este é o espalhamento elástico ou Rayleigh. Contudo, o fóton pode interagir com a molécula e se esta interação resultar com que a molécula receba energia do fóton, o mesmo retornará a um estado vibracional de maior energia (E_v). Sendo assim, o fóton espalhado apresenta menor energia que o fóton incidido ($E=E_0-E_v$) e conseqüentemente um maior comprimento de onda, este tipo de espalhamento Raman é denominado de espalhamento Stokes. No entanto, o fóton pode receber energia da molécula ganhando energia vibracional, e ao retornar para o seu estado fundamental, a molécula se encontra em um nível vibracional menos energético que o do fóton incidido, então a frequência de luz espalhada será maior que a da luz incidente ($E=E_0+E_v$), conhecida como espalhamento Raman Anti-Stokes (Das & Agrawal, 2011).

Entretanto, vale ressaltar que no espalhamento Anti-Stokes, a molécula retorna para o estado vibracional de menor energia, portanto é necessário que esta molécula se encontre no seu estado vibracional excitado antes da interação com a radiação eletromagnética. Sendo assim, segundo a distribuição de Boltzman, à temperatura ambiente a maior parte das moléculas se encontram no seu estado fundamental. Posto isto, o espalhamento Raman Stokes torna-se mais provável (sinal mais intenso),

sendo mais utilizado na química analítica. A FIGURA 1 elucida de forma didática as transições moleculares envolvidas nos espalhamentos Rayleigh e Raman (Smith & Dent., 2013; Ferraro, 2002).

FIGURA 1 – ESPALHAMENTO DA RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA APÓS INCIDÊNCIA SOBRE UMA AMOSTRA

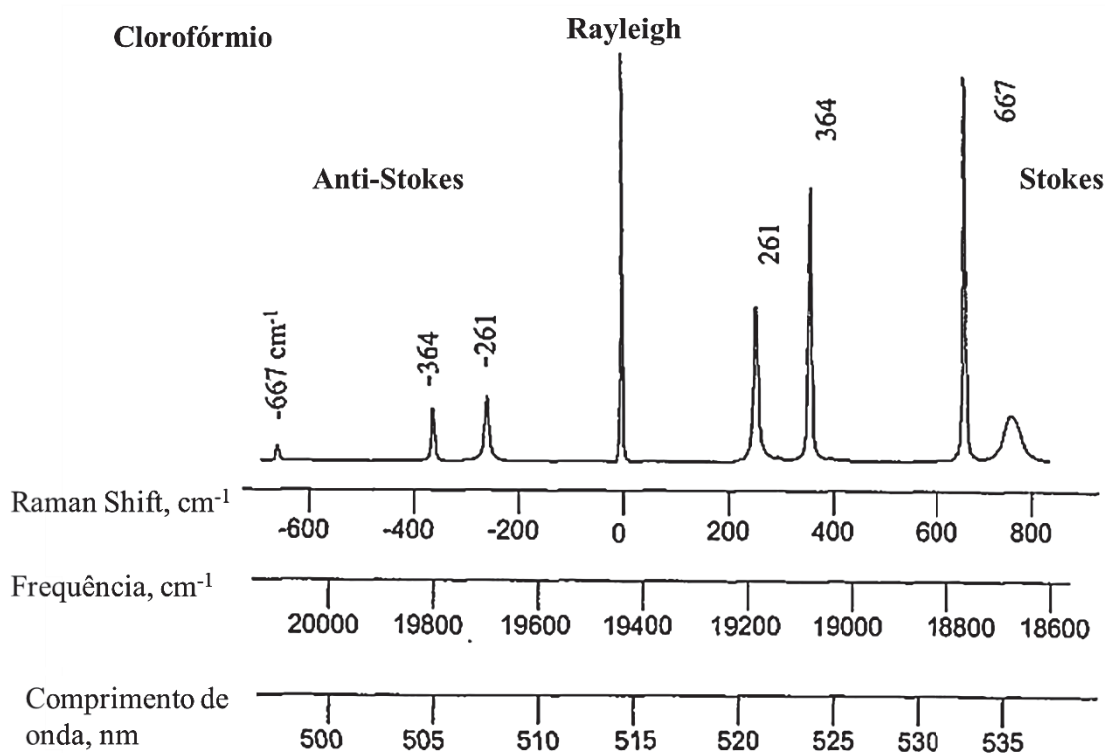


Posto isto, como todas as espectroscopias, o espectro Raman pode ser interpretado como a intensidade do espalhamento Raman em função do comprimento de onda do fóton, da frequência ou do número de onda. Entretanto, vale ressaltar que estas medidas são dependentes do comprimento de onda da radiação incidente, ou seja, comprimento de onda do laser utilizado (ex. verde 532nm, vermelho 633nm, NIR 785nm, etc.). Em face da existência de diversos lasers com diferentes comprimentos de onda serem utilizados na química analítica, convencionou-se utilizar o termo deslocamento Raman (ou “*Raman Shift*”), como eixo das abscissas (eixo “x”) no

espectro Raman. O deslocamento Raman é obtido quando se subtrai a energia do fóton incidido pela energia do fóton espalhado. Sendo assim, os picos obtidos dos espalhamentos Raman sempre terão o mesmo valor de Raman Shift independente do comprimento de onda da radiação incidida, ou seja, independente do laser utilizado na análise (McCreery, 2000; Smith & Dent, 2013).

A FIGURA 2 elucida um espectro Raman completo da molécula de Clorofórmio, no qual podemos observar um pico bem intenso centralizado com o valor de Raman Shift igual a zero, este pico está relacionado com o espalhamento elástico, ou seja, espalhamento Rayleigh, dois espectros espelhados (com os mesmos valores de Raman Shift), entretanto com as diferenças entre intensidade e comprimento de onda, no qual para menores comprimento de onda temos o espalhamento Anti-Stokes e para comprimento de onda maiores temos o espalhamento Stokes.

FIGURA 2 – ESPALHAMENTO STOKES E ANTI-STOKES DO CLOROFÓRMIO



Fonte: Adaptado de (McCreery, 2000).

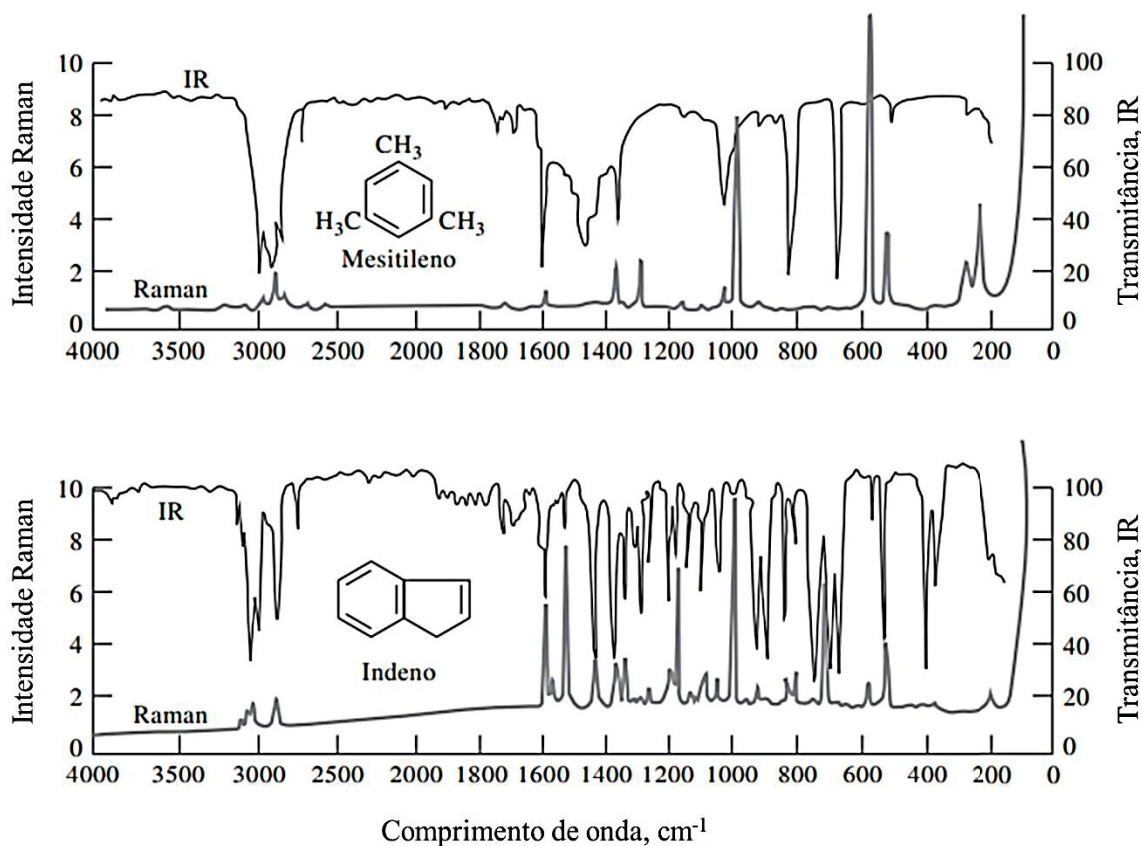
A espectroscopia Raman é uma técnica que nos fornece informações sobre os modos vibracionais das moléculas. Desta forma, é possível obter informações químicas sobre a estrutura molecular e algumas informações físicas dos elementos.

Sendo assim, muitas vezes ela é utilizada como uma técnica de caracterização, para identificar substâncias por meio de seu perfil espectral (“*fingerprint*”), ou para medidas quantitativas e/ou semi-quantitativas (Larkin, 2011).

Posto isto, muitas vezes a espectroscopia Raman é comparada com a espectroscopia no infravermelho, em face de que ambas as técnicas fornecem informações sobre os modos vibracionais das moléculas. No entanto, cada técnica tem sua particularidade e muitas vezes cabe salientar que uma técnica **complementa** a outra, embora algumas moléculas possam estar ativas tanto no IR quanto no Raman, essas duas formas de espectroscopia surgem de diferentes processos e diferentes regras de seleção. De maneira geral, a espectroscopia Raman é mais sensível a vibrações que induzem grandes alterações na **polarizabilidade** (distorção da nuvem eletrônica), fenômeno típico em estiramentos **simétricos** de ligações apolares, complementando a espectroscopia IR que detecta mudanças no dipolo elétrico das **vibrações assimétricas** de grupos polares (Smith & Dent, 2013).

Dentre as particularidades das técnicas mencionadas anteriormente, a absorção no infravermelho (IR) requer que haja uma mudança no momento dipolo ou na distribuição de carga durante a vibração molecular. Só então a radiação de mesma frequência pode interagir com a molécula e excitá-la para um estado vibracional de maior energia. Por outro lado, na espectroscopia Raman quando há interação entre a molécula e a luz, ocorre uma distorção momentânea dos elétrons distribuídos em torno de uma ligação na molécula, seguida pela reemissão de radiação quando a ligação retorna ao seu estado basal. Nessa forma distorcida, a molécula fica polarizada temporariamente, ou seja, produz momentaneamente um dipolo induzido que desaparece quando há relaxamento e reemissão (Larkin, 2011; Skoog, 2009). A FIGURA 3 ilustra a comparação entre os espectros de IR e Raman para as moléculas mesitileno e indeno.

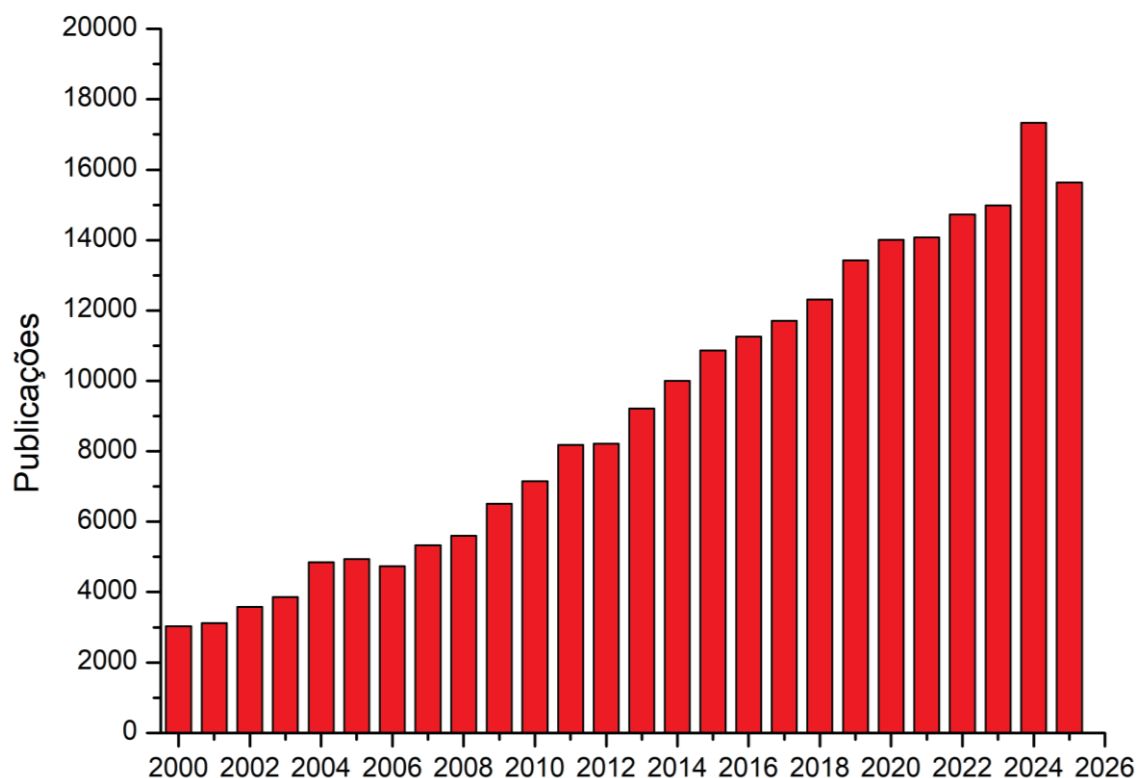
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE IR E RAMAN PARA AS MOLÉCULAS MESITILENO E INDENO



FONTE: Adaptado de (Skoog, 2011)

Por ser uma técnica robusta, reprodutível, e que sofre pouca interferência da água, a espectroscopia Raman vem crescendo muito em termos de publicações e aplicabilidade. Nos últimos 25 anos o número de publicações envolvendo a espectroscopia Raman cresceu 5x de acordo com a base de dados do *Scopus* (FIGURA 4), muito em função da popularização de técnicas como SERS e TERS em aplicação em nanomateriais. Em termos de aplicabilidade, ela se mostra uma técnica muito versátil com aplicações em diversas matrizes com diferentes complexidades, por exemplo, na área da saúde para diagnósticos de células cancerígenas (Robertson *et al.*, 2024; Guleken *et al.*, 2023; Kuo *et al.*, 2024), na área de caracterização de materiais (Sil & Umapathy, 2014; Jorio & Saito, 2021; Zhang *et al.*, 2019), na parte ambiental para a caracterização de microplásticos (Gambino *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2023; Qin *et al.*, 2024) e por fim para a detecção de adulteração em alimentos (Cardoso & Poppi, 2021; Li *et al.*, 2024; Vali Zade *et al.*, 2023).

FIGURA 4 - PUBLICAÇÕES ENVOLVENDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2025



FONTE: Scopus; palavra-chave: Raman Spectroscopy.

2.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

A luminescência é uma emissão de fótons ultravioleta, visível ou infravermelho de uma espécie eletronicamente excitada. A palavra luminescência, que vem do latim (*lumen* = luz) e foi introduzida pela primeira vez como luminescente pelo físico e historiador da ciência Eilhardt Wiedemann em 1888, para descrever 'todos aqueles fenômenos de luz que não são condicionados apenas pelo aumento da temperatura', em oposição à incandescência. A luminescência é luz fria, enquanto a incandescência é luz quente (Valuer, 2001). Os vários tipos de luminescência são classificados de acordo com o modo de excitação como pode ser observado na TABELA 1.

TABELA 1 – VÁRIOS TIPOS DE LUMINESCÊNCIA

Fenômeno	Modo de excitação
Fotoluminescência (Fluorescência e Fosforescência)	Absorção de luz (Fótons)
Radioluminescência	Radiação ionizante (Raio-X)
Catodoluminescência	Raios catódicos (feixes de elétrons)
Eletroluminescência	Campo elétrico
Termoluminescência	Aquecimento após armazenamento prévio de energia (irradiação radioativa)
Quimiluminescência	Processo químico (oxidação)
Bioluminescência	Processo bioquímico
Triboluminescência	Forças de atrito e eletrostáticas
Sonoluminescência	Radiação ultrassônica

Fonte: Adaptado de (Valuer, 2001).

A fluorescência é um processo de fotoluminescência (emissão de luz ou fótons de qualquer substância), em que átomos ou moléculas são excitados eletronicamente por meio de absorção de radiação eletromagnética. Logo, quando as moléculas excitadas relaxam para seu estado fundamental liberam seu excesso de energia como fótons.

A fotoluminescência é formalmente dividida em dois grupos, a fluorescência e a fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado da molécula. Quando temos o elétron no estado singlete, o elétron está emparelhado por spin oposto ($\uparrow\downarrow$) com o segundo elétron no orbital do estado fundamental. Por conseguinte, quando um par de elétron é excitado pode-se formar um estado singlete $\begin{pmatrix} \downarrow \\ \uparrow \end{pmatrix}$ ou triplete $\begin{pmatrix} \uparrow \\ \uparrow \end{pmatrix}$.

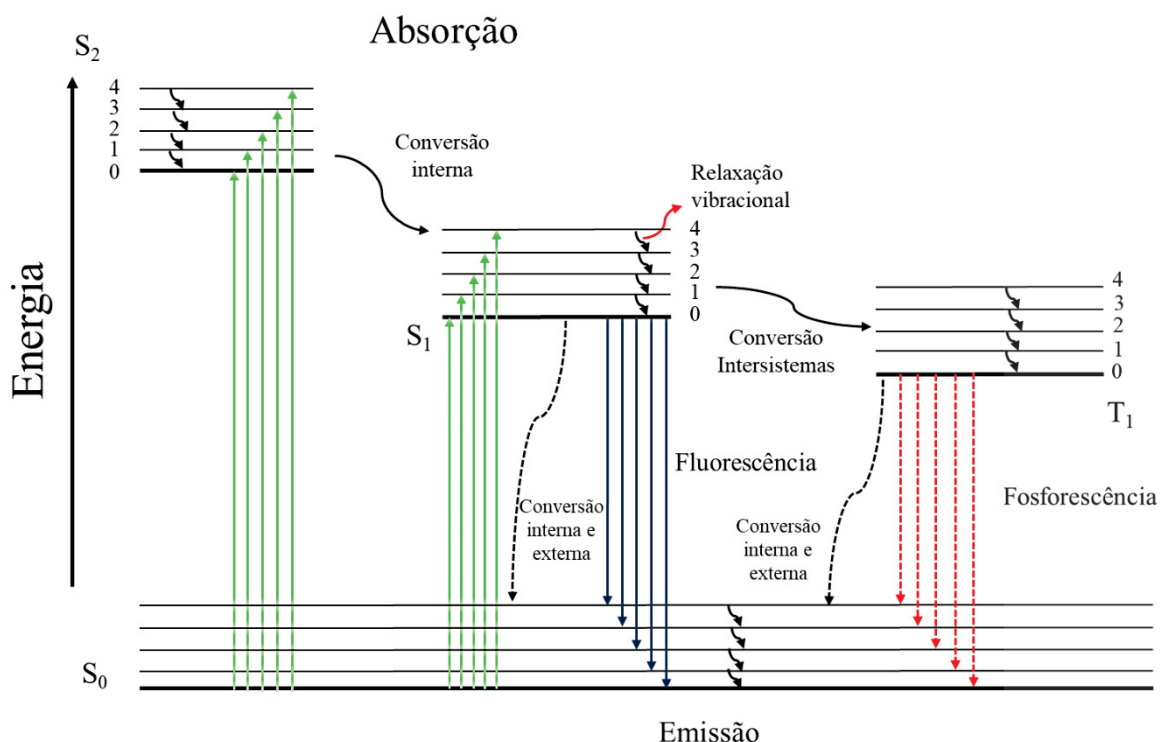
Quando não envolve mudança de spin eletrônico (estado singlete) temos o fenômeno de fluorescência, de modo que o tempo de vida do processo de fluorescência é 10^{-7} a 10^{-5} s, ou seja, é um processo muito rápido. Dentre algumas características do processo de fluorescência podemos destacar que ele é levemente

mais energético comparado com a fosforescência, mais provável de acontecer, diamagnético. No entanto, quando envolve a mudança de spin eletrônico (estado tripleto), temos o fenômeno de fosforescência. Em que o elétron no orbital excitado tem a mesma orientação de spin do elétron do estado fundamental. No caso da **fosforescência**, as transições para o estado fundamental são formalmente proibidas pelas regras de seleção da mecânica quântica, pois envolvem uma mudança na multiplicidade de spin ($\Delta S \neq 0$, transição Tripleto-Singlete). Devido a essa restrição, as taxas de emissão são baixas, resultando em tempos de vida longos, tipicamente na faixa de 10^{-4} a 100 segundos.

Dentre algumas características do processo de fosforescência podemos destacar, é ligeiramente menos energético que a fluorescência, menos provável de acontecer, paramagnético. Uma aplicação da fosforescência no nosso cotidiano pode ser vista nos brinquedos que "brilham no escuro". Após a exposição à luz, as substâncias fosforescentes brilham durante vários minutos enquanto os elétrons excitados retornam lentamente ao estado fundamental (Lakowicz, 2006).

O processo de fluorescência e fosforescência ocorrem entre a absorção e a emissão de luz e são normalmente ilustrados pelo diagrama de Jablonski (Jabłoński, 1935). Os diagramas de Jablonski são comumente utilizados para discutir sobre as teorias de absorção e emissão de luz, como podemos observar na FIGURA 5.

FIGURA 5 – DIAGRAMA DE ENERGIA DE JABLONSKI



Fonte: Adaptado de (Skoog, 2009).

Observando a FIGURA 5 pode-se compreender um pouco melhor a teoria abordada acima, acerca das transições eletrônicas envolvidas no processo de fluorescência e fosforescência. Sendo assim, primeiramente de acordo com a distribuição de Boltzman, à temperatura ambiente a maior parte das moléculas se encontram no seu estado fundamental (S_0). Com o processo de absorção de energia eletromagnética, as moléculas podem ir para os estados eletrônicos excitados simples/singlete (S_1 e S_2) (Valuer, 2001).

Uma vez que a molécula é excitada para os níveis mais energéticos (S_1 e S_2), podem ocorrer processos que fazem com que a molécula perca seu excesso de energia por meio dos fenômenos de relaxamento não radioativo e fluorescência.

Os fenômenos de relaxamento não radioativo competem com a fluorescência no retorno ao seu estado basal. Sendo assim, o **relaxamento vibracional** ocorre quando há muitas partículas excitadas ocupando o mesmo nível vibracional, por isso ocorre colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente, sem emissão de radiação. Outro tipo de relaxamento não radioativo pode ocorrer entre os

níveis vibracionais mais baixos do estado eletrônico excitado mais energético (S_2) e os níveis vibracionais mais altos de um estado eletrônico menos energético (S_1). Esse tipo de relaxamento denomina-se de **conversão interna**. E por fim temos o fenômeno de **fluorescência**, em que é observada no estado eletrônico excitado menos energético (S_1) para o estado fundamental (S_0) (Skoog, 2015; Jameson, 2014; Skoog, 2009).

No entanto, moléculas no estado S_1 também podem sofrer uma conversão de spin para o primeiro estado tripleto T_1 . A emissão de T_1 é denominada fosforescência e geralmente é deslocada para comprimentos de onda mais longos (energia mais baixa) em relação à fluorescência. A conversão de S_1 em T_1 é chamada de **conversão intersistema**. A transição de T_1 para o estado fundamental singleto (S_0) é proibida e, como resultado, as constantes de taxa para emissão tripla são várias ordens de grandeza menores do que aquelas para fluorescência, ou seja, é um processo mais lento. Moléculas contendo átomos pesados, como bromo e iodo, são frequentemente fosforescentes. Os átomos pesados facilitam a conversão intersistemas e, assim, aumentam os rendimentos quânticos de fosforescência (Lakowicz, 2006).

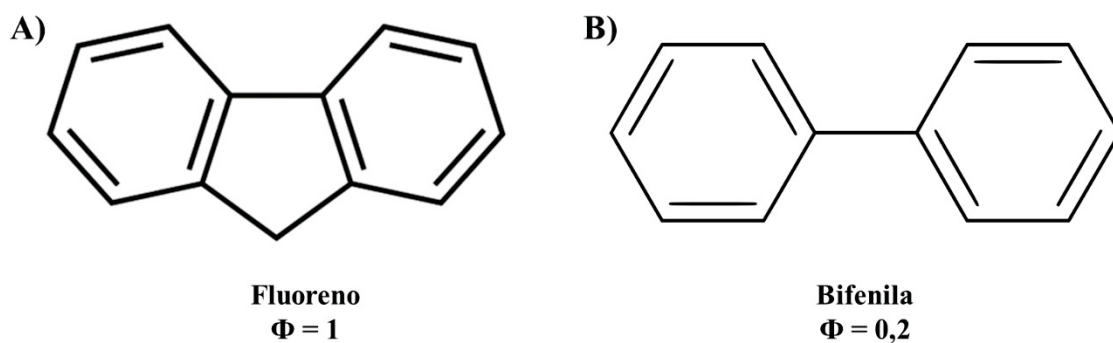
Parando para pensar: Como a estrutura de uma molécula nos permite avaliar se ela tem ou não a capacidade de fluorescência? Posto isto, a fluorescência ocorre normalmente a partir de moléculas que contém um ou mais grupos aromáticos, alicíclicos de carbonila, bem como as estruturas com ligações duplas altamente conjugadas. Entretanto vale ressaltar que a intensidade do sinal de fluorescência nesses compostos é menor comparado aos compostos aromáticos. No entanto, pode haver exceções, nem todos os compostos aromáticos ou heterocíclicos simples apresentam fluorescência molecular, como exemplo da ridina, furano, tiofeno e pirrol (Van Duuren, 1963).

Outro fator importante na fluorescência molecular é a rigidez estrutural, sendo que moléculas mais rígidas tem sinal de fluorescência maior. Como exemplo, podemos citar os casos do fluoreno (Fig. 6a) e da bifenila (Fig. 6b), no qual a estrutura apresenta dois anéis aromáticos em ambas as moléculas. No entanto, quando comparamos a eficiência quântica (eficiência da fluorescência) desses compostos o fluoreno apresenta eficiência quântica de 1, enquanto a bifenila tem uma eficiência de 0,2. Essa diferença se deve ao fato de o fluoreno apresentar um grupo metileno entre os anéis aromáticos formando uma ponte, sendo assim, aumentando sua rigidez

estrutural (Skoog, 2015; Dawson & Windsor, 1968). Aumentando sua rigidez estrutural, consequentemente diminui a velocidade de relaxamento não radioativo (como abordado no diagrama de Jablonski), favorecendo assim o relaxamento por fluorescência.

Outro efeito que cabe salientar é o efeito da temperatura e do solvente. Do qual em muitas moléculas, quando se aumenta a temperatura o sinal de fluorescência decresce, isso se deve ao fato de que em elevadas temperaturas, aumenta-se a frequência das colisões podendo levar à maior probabilidade de ocorrer o relaxamento vibracional. Uma diminuição da viscosidade do solvente do meio pode levar ao mesmo resultado (Menter, 2006; Sutton et al., 2008).

FIGURA 6 – EFEITO DA RIGIDEZ ESTRUTURAL SOBRE O RENDIMENTO QUÂNTICO DE A) FLUORENO E B) BIFENILA



Fonte: Adaptado de (Skoog, 2015).

A espectroscopia de fluorescência molecular apresenta-se com grande aplicabilidade dentro da química analítica, uma vez que dentre suas características é possível citar: técnica analítica rápida, simples (ou seja, não requer em alguns casos etapas de preparo de amostras), sensível e seletiva. A seletividade da técnica está relacionada com a característica do fluoróforo que se quer determinar, uma vez que cada fluoróforo possui um par característico de comprimento de onda de excitação e emissão no qual apresenta fluorescência máxima (Kumar *et al.*, 2017).

No entanto, cabe salientar que a análise de espectros únicos de excitação e emissão, funciona bem se for necessário analisar um sistema fluorofórico simples. Como exemplo, na caracterização de polímeros (Toledo *et al.*, 2022; Romani *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2024).

Sendo assim, no desenvolvimento de metodologias analíticas normalmente se depara com matrizes complexas, com vários interferentes, além da quantificação de vários fluoróforos (mistura mult fluorofórica) simultaneamente, portanto, a forma convencional de análise não fornece a informação analítica completa. Posto isto, muitos métodos analíticos utilizam a espectroscopia de fluorescência de matriz de excitação e emissão (EEMF), em que se fixa um determinado comprimento de onda de excitação e varre-se a emissão, resultando em uma coleção de espectros de excitação e emissão coletados em vários comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente (Kumar & Misha, 2013).

Desta forma, a EEMF apresenta-se muito versátil, uma vez que na literatura encontra-se diversos trabalhos evidenciando a sua versatilidade. Entre as aplicações da EEMF podemos destacar as matrizes alimentícias (Teixeira *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2024; Huang *et al.*, 2024), ambientais (Tu *et al.*, 2024; Yan *et al.*, 2024; Peter *et al.*, 2024), farmacêuticas (Dinç *et al.*, 2023; Lei *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024), combustíveis (Wang *et al.*, 2019; Câmara *et al.*, 2024) e cosméticos (Wang *et al.*, 2013; Nie *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2022).

2.5 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

2.5.1 ANÁLISE DE FATORES PARALELOS – PARAFAC

A Análise de Fatores Paralelos, ou simplesmente PARAFAC (*“Parallel factor analysis”*), é um método de decomposição de dados de três vias, ou seja, dados que apresentam uma trilinearidade. A matriz experimental ($\bar{X}_{ijk}$) pode ser decomposta em três matrizes de *loadings*, A , B e C que contêm os elementos a_{if} , b_{jf} e c_{kf} , respectivamente, relativo às três dimensões dos dados, onde i se refere ao número de linhas presentes na primeira dimensão dos dados, j o número de linhas na segunda dimensão dos dados, k o número de linhas na terceira dimensão dos dados e f é o número de fatores em que a matriz original foi decomposta. O modelo trilinear é ajustado com o intuito de minimizar a soma dos quadrados dos resíduos, correspondente ao $\bar{E}_{ijk}$, expressa na equação 1, ou de forma matricial na equação 2 (Sena *et al.*, 2005).

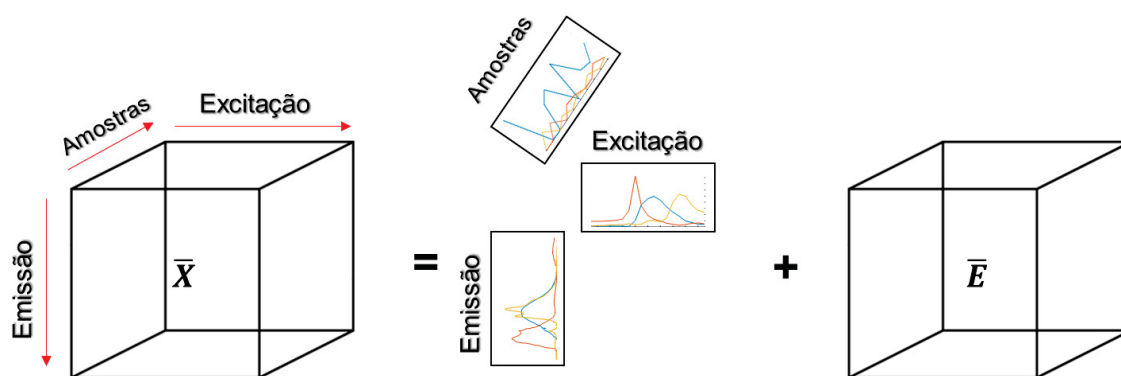
$$\bar{X}_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad \text{Equação 1}$$

$$\bar{X} = A \otimes B \otimes C + \bar{E}$$

Equação 2

Em termos práticos, na determinação de um analito por espectroscopia de fluorescência por excitação e emissão molecular (EEM), essa trilinearidade pode ser expressa em matrizes A , B e C sendo cada matriz relativa à amostra (ou concentração), comprimento de onda de emissão e comprimento de onda de excitação, respectivamente. Este tipo de modelo tem como vantagem recuperar componentes que possuem uma interpretação química mais direta do que em métodos de composição por variáveis latentes, como PCA e PLS. Considerando que um dos fatores (f) representa o analito de interesse, o parâmetro a_f é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, o elemento b_f é uma estimativa em escala do seu espectro de emissão e o elemento c_f é uma estimativa em escala do espectro de excitação do analito, por fim o elemento $\bar{E}$, correspondente à matriz de resíduos, conforme elucidado na FIGURA 7 (Murphy *et al.*, 2013).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO MODELO PARAFAC. DECOMPOSIÇÃO DE UM ARRANJO DE DADOS TRIDIMENSIONAL



Fonte: o Autor

O PARAFAC pode ser conceitualmente comparado ao PCA bilinear (ou PCA para dados multidimensionais), podendo ser uma versão mais restrita do método que o precede, o Tucker3 (Sena *et al.*, 2005). Sendo considerado conceitualmente um método menos flexível pelo fato de se utilizar uma matriz central de identidade ($g_{def} = 1$ quando $d = e = f$ e $g_{def} = 0$ nas outras posições), sendo assim, o primeiro fator de uma dimensão só se correlaciona com os primeiros fatores das outras e assim,

sucessivamente), por conseguinte, usa-se menos graus de liberdade no modelo. Por ser um modelo mais restritivo, o PARAFAC é uma ferramenta adequada quando se tem uma trilinearidade bem definida (“*hard modelling*”).

Todavia, qualquer conjunto de dados que possa ser modelado pelo PARAFAC pode ser modelado pelo Tucker3 e pelo PCA bilinear, no entanto usando mais graus de liberdade, que pode ser uma limitação desses dois métodos em comparação ao PARAFAC para a resolução de curvas, pois o excesso de graus de liberdade tende a introduzir ruído e variância sistemática para o modelo de uma maneira redundante, e distancia os perfis recuperados de perfis químicos conhecidos (Bro, 1997).

Por ser um modelo menos flexível, o PARAFAC apresenta singularidade de solução, ou seja, a capacidade de recuperar os espectros puros dos componentes que constituem o sistema mesmo na presença de interferentes, caracterizando assim uma “vantagem de segunda ordem” na calibração de múltiplas misturas, enfatizando que o modelo necessita de uma trilinearidade bem definida, além do número correto de fatores que constituem o modelo (número de analitos que compõe a matriz) e a razão sinal/ruído for apropriada (Bro, 1997).

Outra característica importante de se ressaltar é que o PARAFAC permite o uso de restrições (“*Constraints*”) que pode auxiliar em termos de interpretação e deixar o modelo mais realista. As restrições mais comuns são a não negatividade, ortogonalidade e unimodalidade. A restrição de não negatividade é usualmente adotada nas três direções do conjunto de dados, uma vez que tantos espectros negativos (se não for aplicado o tratamento de derivada nos dados), quanto concentração não possuem significado físico (Bro, 1997).

Sendo assim, aspectos importantes tem que ser levados em conta para decompor com sucesso um conjunto de dados multidimensionais utilizando o PARAFAC. Um primeiro aspecto trata-se da variabilidade dos dados, ou seja, os componentes químicos não podem apresentar espectros idênticos (emitindo e excitando no mesmo comprimento de onda). Um segundo ponto é a trilinearidade dos dados, no qual o número de componentes do modelo está implícito à variação química em cada dimensão do conjunto de dados. Como exemplo, para os dados de EEM (Matriz de excitação-emissão) de fluorescência, os espectros de emissão não variam nos comprimentos de onda de excitação e os espectros de excitação não variam nos comprimentos de onda de emissão, sendo que cada molécula apresenta uma

característica única, além da intensidade da fluorescência ser proporcional a concentração do analito. E por fim um terceiro item a ser considerado é a aditividade, onde o sinal analítico total é devido à superposição linear de um número fixo de componentes (analitos estimados na matriz). Cabe salientar que a segunda e terceira condição acima expostas são constituintes da lei de Lambert-Beer (Lakowicz, 2006; Murphy *et al.*, 2013).

Atualmente, o PARAFAC está consolidado na área de Química analítica como a Quimiometria, onde é a ferramenta mais utilizada para decompor dados trilineares como a fluorescência EEM, tendo o seu artigo precursor com 3687 citações (Bro, 1997).

Apesar de seu amplo emprego, o PARAFAC revela algumas lacunas que direcionam a pesquisa futura. A principal limitação reside na subjetividade da determinação da ordem fatorial (o número ideal de componentes), uma etapa crítica que carece de métodos estatísticos totalmente automáticos e robustos, baseado muito hoje em dia na análise do “*core consistency*” (Bro *et al.*, 2003; Halberg *et al.*, 2023). Outra lacuna crucial é a necessidade de maior robustez em cenários não-trilineares, desafiando a premissa fundamental do PARAFAC em sistemas dinâmicos ou com desvios em um dos modos (Ex. Tempo de retenção), o que exige o emprego de métodos como o PARAFAC2 (Kiers *et al.*, 1999).

2.5.2 RESOLUÇÃO DE CURVA MULTIVARIADA COM MÍNIMOS QUADRADOS ALTERNADOS – MCR-ALS

A resolução multivariada de curvas, MCR - *Multivariate Curve Resolution* é focada em extrair informações químicas relevantes dos componentes puros (ex. perfil espectral do analito de interesse) em sistemas de mistura, ou seja, mesmo na presença de interferentes espectrais, sem que haja um conhecimento prévio acerca dos perfis espectrais individuais do sistema. Isso é possível devido a uma decomposição do modelo bilinear da matriz de dados experimentais **D**, no produto das matrizes **C** (geralmente atribuída a matriz de concentração relativa) e **S^T** (matriz de espectros puros). Os resíduos não explicados pelos componentes anteriores são descritos pela matriz **E** (matriz de resíduos), conforme a equação 3: (Março *et al.*, 2014).

$$D = CS^T + E$$

Equação 3

O algoritmo usado para a resolução do MCR-ALS é o Mínimos Quadrados Alternados (“ALS, *Alternating Least Squares*”) que continuamente estima os valores de uma das matrizes (de concentração, por exemplo), a partir dos valores conhecidos das outras duas (conjunto de dados e perfis espectrais, por exemplo).

Uma vez que as estimativas iniciais são geradas, a etapa de otimização iterativa é iniciada. Em cada ciclo de interação as matrizes **C** e **S^T** são calculadas, em duas etapas por mínimos quadrados, conforme as equações 4 e 5 a seguir:

$$\mathbf{C} = \mathbf{D} \mathbf{S} (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \quad \text{Equação 4}$$

$$\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{D} \quad \text{Equação 5}$$

No processo matemático, uma matriz **D*** é reconstruída a partir do produto das matrizes **CS^T**, no qual a matriz **C** ou **S^T** resulta das estimativas iniciais, e é comparado com a matriz original **D**. Após feitas tais estimativas o algoritmo converge iterativamente até um critério de convergência estabelecido (Ex. Falta de ajuste, *lof* < 0,01) ou um número de interações previamente definidos (Ex. 50 interações) (Jaumot *et al.*, 2015; Azzouz *et al.*, 2008).

Após feitas todas as interações a qualidade do modelo podem ser avaliadas comparando os resultados da matriz reconstruída **D*** com a matriz original dos dados **D**. Os principais indicadores de qualidade do modelo são a percentagem de falta de ajuste (*lof*, *lack of fit*) e a percentagem da variância explicada pelo modelo (R^2), determinados pelas equações 6 e 7.

$$\%LOF = 100x \sqrt{\frac{\sum e_{ij}^2}{\sum d_{ij}^2}} \quad \text{Equação 6}$$

$$R^2 = 100x \left(1 - \frac{\sum e_{ij}^2}{\sum d_{ij}^2} \right) \quad \text{Equação 7}$$

Sendo d_{ij} um elemento da matriz de dados experimentais e e_{ij} o valor residual relacionado obtido da diferença entre os dados experimentais (matriz **D**) e os dados recuperados (produto da matriz **CS^T** obtido por MCR-ALS). Desta forma, para um modelo bem ajustado espera-se baixos valores de falta de ajuste (*lof*, *lack of fit*) e valores de R^2 o mais próximo possível de 1 (De Juan *et al.*, 1998).

O MCR-ALS atualmente é uma das ferramentas quimiométricas mais populares, muito em conta por sua característica “*soft-modelling*”, que lhe permite uma gama de aplicações, como análise de processos dinâmicos (como reações cinéticas e titulações) (Soares & Carneiro, 2013), em imageamento hiperespectrais (resolvendo mapas espaciais e espectros de componentes desconhecidos) (Arraya *et al.*, 2017), e em sistemas biológicos (como estudos de metabolismo) (Pellacani *et al.*, 2024), em diferentes arranjos de matriciais (Bilineares, trilineares, Quadri lineares, etc) (Tauler *et al.*, 2020).

No entanto, apesar de seu amplo emprego, o MCR-ALS revela algumas lacunas que direcionam seu aprimoramento. A principal limitação já amplamente conhecida é a sua não-unicidade inerente, ou seja, a sua ambiguidade rotacional, que resumidamente pode ser pela possibilidade de mais de uma resposta possível para combinações lineares (Março *et al.*, 2014; Jaumot & Tauler, 2010).

2.5.3 MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS DESDOBRADOS E BILINEARIZAÇÃO RESIDUAL (U-PLS/RBL)

O algoritmo de mínimos quadrados parciais desdobrados (U-PLS) é um poderoso algoritmo para processamento de sinais vetoriais por amostra, fornecendo processamento de dados multidirecional com flexibilidade suficiente para lidar com protocolos de calibração baseados em dados complexos (Olivieri *et al.*, 2015).

O U-PLS opera de forma similar ao PLS convencional, onde em uma primeira etapa é necessário converter a matriz de dados em vetores e introduzir as informações de concentração na etapa de calibração (sem incluir dados para a amostra desconhecida), a fim de obter dois tipos de variáveis latentes: os *loadings* contidos na matriz **P** e fatores de peso contidos na matriz **W**. Essa combinação produzirá um vetor $JK \times 1$ a partir de uma matriz de dados $J \times K$. Uma nova matriz de calibração X_{cal} , adequada para a aplicação da regressão PLS, é construída colocando todos os vetores de coluna adjacentes uns aos outros. A última matriz X_{cal} pode, portanto, ter tamanho $JK \times I$ (I = número de amostras de calibração) para dados de segunda ordem e é submetida à análise de regressão PLS clássica. Isso envolve a decomposição de X_{cal} (matriz de calibração) no produto de duas matrizes (Equação 8) (Monzón *et al.*, 2018; Olivieri, 2005; Olivieri *et al.*, 2015):

$$X_{Cal} = P T^T + E_{Cal} \quad \text{Equação 8}$$

Como já bastante reportado na literatura, para o PLS um conjunto de *loadings* P e um conjunto de pesos W ($JK \times A$, onde A é o número de variáveis latentes), bem como coeficientes de regressão v (tamanho $A \times 1$), são obtidos após a etapa de calibração. Normalmente, o procedimento de validação cruzada *leave-one-out* ou também referido como "critério de Haaland" é implementado para selecionar o parâmetro A (Haaland *et al.*, 1988). Posteriormente, v é empregado para estimar a concentração do analito por meio da seguinte Equação 9:

$$y = v^T t \quad \text{Equação 9}$$

Onde, t é o vetor de *scores* para as amostras do conjunto teste, obtido como a projeção da matriz de dados desdobrada para a amostra de teste no espaço definido pelas cargas PLS de calibração.

Se no conjunto teste conter algum constituinte inesperado (interferente), que não tenha sido incluído no conjunto de calibração, os *scores* t das amostras do conjunto teste obtidas pela projeção da matriz (X_{test}) desdobrado nos *loadings* do PLS são inadequadas para a predição do analito por meio da Equação (9), uma vez que o PLS convencional (correspondente à chamada versão PLS-1 na calibração de primeira ordem), não possui a “vantagem de segunda ordem” (Olivieri *et al.*, 2015).

Para contornar tal limitação e garantir a “vantagem de segunda ordem”, o U-PLS incorporou a bilinearização residual (RBL) que tem como missão modelar os resíduos assumindo que eles podem ser organizados em uma matriz bilinear. Este procedimento ajusta os dados da amostra à soma de duas contribuições: 1) a parcela dos dados de teste, que pode ser explicada pelos *loadings* do PLS de calibração, e 2) a contribuição dos potenciais interferentes modelados por um determinado número de componentes principais (N_{RBL}). A equação 10 ilustra a modelagem completa U-PLS/RBL que envolve um termo de erro residual a ser minimizado por mínimos quadrados:

$$X_{test} = reshape(Pt_{RBL}) + B_{RBL} T_{RBL}^T + E_{RBL} \quad \text{Equação 10}$$

Onde, $\text{reshape}(Pt_{RBL})$ representa uma reorganização de parte dos resíduos originais para análise, B_{RBL} é a matriz de *loadings* dos resíduos, T_{RBL} é a matriz de *scores* associada aos resíduos e E_{RBL} matriz de resíduo final. Posto que, o produto da multiplicação $(B_{RBL} T_{RBL}^T)$ é o modelo de análise de componentes principais (PCA) para a matriz residual $[X_{\text{test}} - \text{reshape}(P t_{RBL})]$ com componentes principais N_{RBL} , com “*reshape*” significando a transformação do vetor $JK \times 1$ em uma matriz de dados $J \times K$ (sendo, o inverso da operação de desdobramento da matriz). A minimização da matriz de resíduos final E_{RBL} permite recuperar o vetor de *scores* final t_{RBL} . Inicialmente, a matriz residual contém contribuições dos analitos calibrados e dos potenciais interferentes. Desta forma, a modelagem desta última matriz com PCA extrai componentes bilineares N_{RBL} ; quanto mais esses componentes bilineares se assemelham às contribuições inesperadas, melhor o produto é capaz de modelar o comportamento dos analitos na amostra de teste, levando a uma diminuição contínua nos resíduos (Mazivila *et al.*, 2022; Olivieri *et al.*, 2015; Olivieri, 2005).

Existem duas maneiras pelas quais a RBL pode ser realizada para ajustar o sinal de teste à Equação (10): (1) uma minimização de Gauss-Newton e (2) um algoritmo iterativo. Geralmente a abordagem comumente utilizada pelos pesquisadores é a minimização de Gauss-Newton uma vez que a matriz de resíduos E_{RBL} é minimizado na Eq. (10), a saída é um vetor t_{RBL} final que representa a contribuição real dos analitos calibrados para a amostra de teste. As predições das concentrações dos analitos são obtidas pela introdução do vetor t_{RBL} final em vez de t na Eq. (9). Embora os dados de calibração sejam desdobrados para serem processados por U-PLS com maior flexibilidade, os dados de teste devem ser mantidos em forma de matriz para que seja possível aplicar a PCA dentro do procedimento RBL (Olivieri, 2005; Olivieri *et al.*, 2015).

O U-PLS/RBL (*Univariate Partial Least Squares/Residual Bilinearization*) estabeleceu-se como uma alternativa eficiente na calibração de segunda ordem. Sua principal aplicação reside na determinação quantitativa de analitos específicos em matrizes complexas (como alimentos e amostras clínicas) (Monzón *et al.*, 2018). A grande vantagem é que o U-PLS/RBL permite a quantificação precisa, usufruindo da “Vantagem de Segunda Ordem” ao isolar o analito de interesse da interferência de componentes não modelados ou desconhecidos.

Contudo, uma lacuna significativa que impulsiona pesquisas futuras está na sua aplicabilidade limitada quando a meta é a resolução completa e qualitativa de todos os componentes do sistema. Sendo um método univariado, o U-PLS/RBL não fornece os perfis espectrais completos dos interferentes, o que restringe sua utilidade em estudos onde a identificação ou caracterização detalhada das espécies químicas presentes é o objetivo principal. Além disso, a sua eficácia depende fortemente de uma decomposição de resíduos precisa, tornando-o potencialmente sensível ao ruído e à estrutura exata dos dados analisados (Olivieri, 2005; Olivieri *et al.*, 2015).

3. SEÇÃO I - DETERMINAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535 EM REPELENTES DE INSETOS USANDO ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE MATRIZ DE EXCITAÇÃO-EMIÇÃO (EEM) E CALIBRAÇÃO DE ORDEM SUPERIOR

3.1 INTRODUÇÃO

Doenças transmissíveis por insetos afetam milhares de pessoas em todo o mundo, acarretando milhares de óbitos, principalmente em países subdesenvolvidos. Os mosquitos são os principais transmissores destes tipos de doenças, infectando em média cerca de 700 milhões de pessoas todo o ano, sobretudo em países tropicais e subtropicais, nos quais o clima favorece a sua procriação e desenvolvimento (WHO, 2020; Fradin *et al.*, 2002).

Com a crescente onda de epidemias causadas por mosquitos transmissores de doenças, tais como: dengue, *zika* vírus e *chikungunya*, estima-se que anualmente, cerca de 100 a 400 milhões de pessoas possam ser infectadas somente por dengue em todo o mundo. Sendo assim, a Dengue é classificada pela *World Health Organization* (WHO) como uma entre as 20 doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2023; WHO, 2024). A FIGURA 8 ilustra um resumo dos boletins epidemiológicos da ANVISA abordando os casos prováveis e óbitos para Dengue, Zika e *Chikungunya* no período de 2020 até o primeiro trimestre de 2025 ocorridos no Brasil (Brasil, 2025).

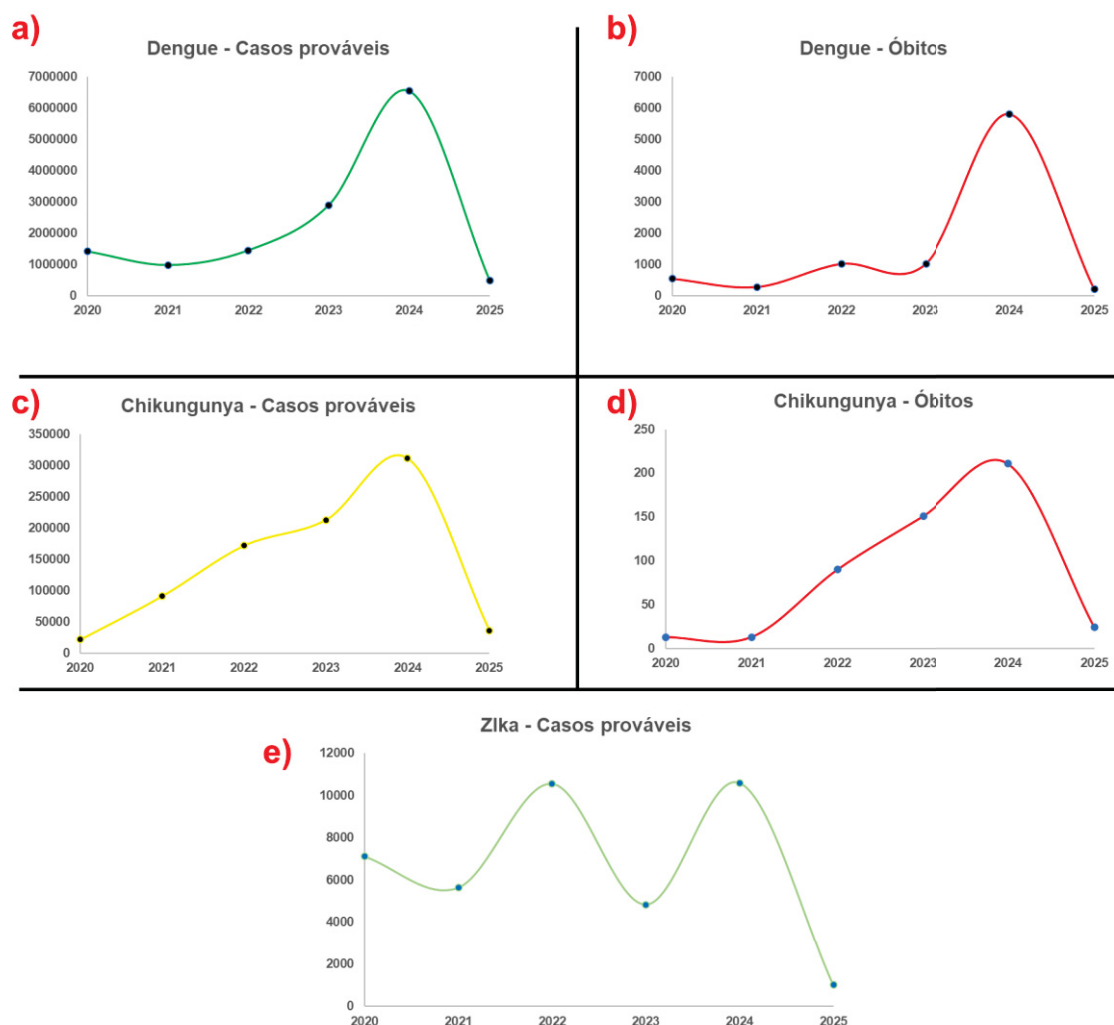
Para a Dengue (FIGURA 8a e 8b) a média no Brasil de casos prováveis até o ano de 2023 tem sido cerca de 1,25 milhões e 611 óbitos, no qual esses resultados

por si só expressam um dado alarmante e extremamente alto. No entanto, observa-se que no ano de 2023 uma epidemia (surto) de Dengue ocorreu no Brasil, uma vez que o número de casos prováveis saltou de 1,45 milhões em 2022 para 2,9 milhões em 2023, mantendo o número de óbitos em torno de 1017. Apesar de 2023 ser considerado uma das piores epidemias de Dengue no Brasil, em 2024 a população brasileira sofreu com mais uma nova epidemia de Dengue, sendo esta última a pior já registrada da história, com um aumento de 400% de casos prováveis em relação a 2023, totalizando cerca de 6,5 milhões e 5800 óbitos.

Embora o Brasil tenha sofrido a pior epidemia de dengue na história em 2024, em 2025 já no primeiro trimestre houve uma redução de quase 70% no número de casos de dengue comparados com o mesmo período de 2024, isso pode estar muito relacionado com a conscientização da população acerca do perigo da dengue, além do avanço da imunização no país (Brasil, 2025a).

Para as outras doenças como a *Chikungunya* (FIGURA 8c e 8d), os dados disponíveis mostram que há uma tendência bem parecida com os casos de Dengue, em que 2024 foi o pior ano da história, registrando um total de 311,7 mil casos com 211 óbitos confirmados. Todavia, para a Zika (FIGURA 8e) os resultados até 2025 se mantiveram na média em relações a anos anteriores, e vale ressaltar que não foi registrado nenhum caso confirmado de óbito por Zika vírus nesse período (Brasil, 2025b).

FIGURA 8 – LEVANTAMENTO DO NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS PARA DENGUE, ZIKA E *CHIKUNGUNYA* ENTRE OS ANOS DE 2020 ATÉ O PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2025



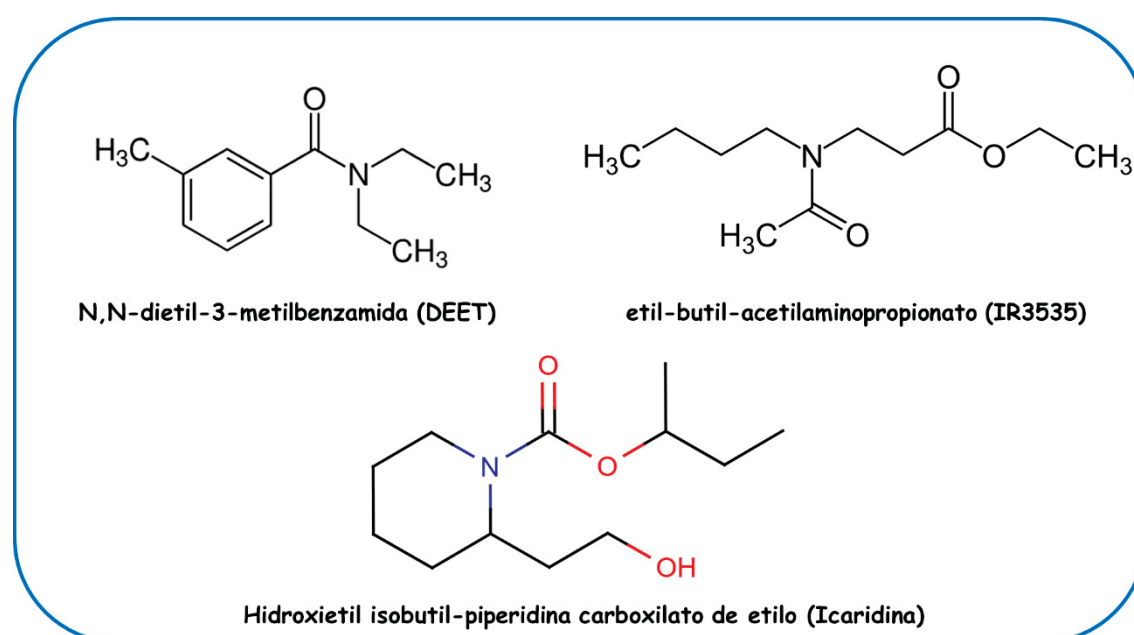
Fonte: (Brasil, 2025b)

Em face disso, o Brasil foi o primeiro país do mundo a incorporar a vacina contra a dengue ao sistema público universal de saúde já em dezembro de 2023. A imunização teve início em fevereiro de 2024 para crianças e adolescentes de 10 a 14 anos residentes em municípios com mais de 100 mil habitantes e com maior prevalência do sorotipo DENV-2, essa faixa etária foi identificada como grupo prioritário para receber a primeira remessa de 757 mil doses. Além disso, o Ministério da Saúde garantiu a quantidade total disponível do fabricante de 5,2 milhões de doses para 2024 e 9 milhões de doses para 2025 (Brasil, 2023). No entanto, a quantidade de doses de vacina fornecidas pela empresa farmacêutica continua bastante limitada.

Além disso, até o momento, ainda não há vacina comercial disponível para os vírus Zika e chikungunya. Como resultado, tanto a população brasileira quanto a mundial, têm aumentado o uso de repelentes de insetos como o meio mais econômico e acessível de afastar picadas de mosquitos e prevenir a disseminação de inúmeras doenças. (Lupi *et al.*, 2013).

Os repelentes são classificados como cosméticos e podem ser produzidos e disponibilizados sob diversas formas, tal como, *spray*, loções, cremes, aerossóis e óleos, sendo que os princípios ativos mais utilizados são: N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), o hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato de etilo (Icaridina) e o etil-butil-acetilaminopropionato (IR3535). Existem também produtos que contêm óleos essenciais ou extrato vegetal como substância ativa, como é exemplo das plantas do gênero *Cymbopogon* (Citronela). Os repelentes comerciais que empregam DEET, Icaridina e IR3535 em sua formulação apresentam uma faixa de concentração de 5 – 30 % (m m⁻¹), com tempo médio de ação na pele em torno de 4 - 6 horas (Tavares *et al.*, 2018). A FIGURA 9 apresenta a estrutura molecular dos princípios ativos sintéticos comumente utilizados em formulações de repelentes.

FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCÍPIOS ATIVOS UTILIZADOS EM FORMULAÇÕES DE REPELENTE COMERCIAIS



Fonte: O Autor

No entanto, estudos recentes demonstraram que o uso recorrente de repelentes contendo DEET pode causar neurotoxicidade e cardiotoxicidade, o que pode resultar em encefalopatia, convulsões, coma, bradicardia grave e hipotensão. A ingestão de altas doses de DEET também é considerada letalmente tóxica (Wu *et al.*, 2023)

Em comparação com o DEET, o IR3535 não apresenta um alto nível de toxicidade. Contudo, há relatos na literatura de que altas concentrações desse composto podem ser absorvidas pela pele e transferidas para o sangue e a urina (Lupi, 2013). Já para Icaridina, segundo Kratz *et al.*, (2008), foram realizados ensaios para verificar sua toxicidade crônica em ratos e foi demonstrado que a Icaridina não apresenta toxicidade significativa.

Portanto, de acordo com a USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), formulações para aplicação direta na pele podem conter de 5 a 99% DEET (EPA, 2019). Embora a EPA não restrinja as concentrações em repelentes à base de DEET para uso em crianças, de acordo com a resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), RDC n°19/2013 (ANVISA, 2013) repelentes à base de DEET não podem ser usados em crianças menores de 2 anos. Além disso, crianças entre 2 e 12 anos só podem ser expostas a concentrações de até 10%, e concentrações superiores a 30% podem ser usadas para maiores de 12 anos. No Brasil não são encontrados repelentes com concentrações superiores a 30%.

Mediante ao exposto, evidencia-se que o controle de qualidade dos princípios ativos em repelentes é de extrema importância, pois a quantidade da substância ativa está diretamente associada à eficiência do repelente e ao tempo de proteção. Quantidades de substâncias diferentes das indicadas no rótulo do produto ou fora dos limites permitidos pelos órgãos reguladores, podem levar o consumidor, involuntariamente, ao uso indevido do produto, causando vulnerabilidade, promovendo ineficácia, possibilitando alergias e outros problemas sérios de saúde (Wu *et al.*, 2023; FIOCRUZ, 2016).

Em face disso, a Word Health Organization (WHO) recomenda especificações quanto a metodologia analítica a ser empregada para os testes de quantidade e identidade dos princípios ativos em formulações de repelentes. Para o DEET, a WHO recomenda o uso da análise univariada na região do infravermelho médio para a sua

quantificação. Todavia, este método é suscetível à presença de interferentes, além da utilização de reagentes tóxicos, como o dissulfeto de carbono (WHO, 1999).

Para a Icaridina, a WHO recomenda o uso da cromatografia gasosa (GC) com detecção por ionização de chama (FID), além do uso de dimetilftalato como padrão interno. A identidade do ingrediente ativo pode ser estabelecida comparando o tempo de retenção relativo do composto na corrida cromatográfica, ou ainda espectros de IR ou MS comparado com material de referência (WHO, 2004). Por fim, para o IR3535 a recomendação é do uso da GC-FID utilizando undecanoato de metila como padrão interno (WHO, 2006). Contudo, apesar de serem métodos analiticamente eficientes e sensíveis, podem demandar um relativo tempo de análise, requerem etapas de preparo de amostras, além de apresentarem um elevado custo de manutenção destes equipamentos quando comparado com técnicas espectroscópicas.

Sendo assim, metodologias analíticas alternativas para a quantificação de ingredientes ativos em repelentes vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos. Vilar *et al.*, (2018), propuseram a determinação de DEET e IR3535 em repelentes usando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e calibração univariada. O preparo da amostra envolveu diluição em água/acetonitrila (90:10, v v⁻¹), atingindo limites de quantificação (LOQ) de 0,09 e 0,06 mg L⁻¹ para DEET e IR3535, respectivamente. Já Silva *et al.*, (2020), quantificaram DEET em amostra de repelente comercial usando espectroscopia ultravioleta/visível (UV-VIS) e técnicas de calibração multivariada. Para isso, foram utilizados Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Regressão Linear Múltipla (MLR) aliados às técnicas de seleção de variáveis. Eles usaram o mesmo preparo de amostra e alcançaram um valor de LOQ semelhante ao de Vilar *et al.*, (2020).

Por fim, Vilar *et al.*, (2020) determinaram DEET e IR3535 em repelentes comerciais usando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e calibração multivariada. Novamente, os valores preditos pela metodologia proposta foram estatisticamente iguais aos valores obtidos pelo método de referência HPLC-DAD. No entanto, até onde sabemos, a determinação simultânea de DEET, Icaridina e IR3535 ainda não foi publicada. Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos reportados na literatura está voltado à determinação dos princípios ativos (DEET, Icaridina e IR3535) em matrizes ambientais (Molins-Delgado *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2012) e biológicas

(Shrestha & Lee, 2020), e poucos trabalhos visam revisar as metodologias estabelecidas pela WHO com técnicas analíticas mais recentes.

Como essas substâncias apresentam propriedades fluorescentes, a espectroscopia de fluorescência com matriz de emissão de excitação (EEM) é uma abordagem não destrutiva promissora para a determinação de DEET, Icaridina e IR3535 em repelentes comerciais.

Para tanto, a aplicação de métodos de análise multivias como Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) (Antonio *et al.*, 2024) e Resolução de Curva Multivariada por Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS) (Bayat *et al.*, 2020) na decomposição de matrizes de três dimensões produzidas por EEMs (intrinsecamente bilineares) permite a quantificação de analitos na presença de interferências não calibradas (a distintiva "vantagem de segunda ordem"). Isto elimina a necessidade de pré-tratamento trabalhoso de amostras e oferece uma interpretação simples através das cargas e pontuações correspondentes às contribuições puras dos compostos analisados.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de princípios ativos (DEET, Icaridina e IR3535) em amostras de repelentes comerciais utilizando a espectroscopia de excitação-emissão de fluorescência (EEM) e métodos quimiométricos de ordem superior (MCR-ALS e PARAFAC).

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver modelos MCR-ALS e PARAFAC para a quantificação de princípios ativos em amostras de repelentes comerciais.
- Comparar os resultados obtidos pelo método proposto, aos resultados obtidos por cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).
- Comparar a performance dos modelos quimiométricos MCR-ALS e PARAFAC em prever novas concentrações dos três princípios ativos em amostras de repelentes comerciais com concentrações desconhecidas.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Soluções padrão de DEET, Icaridina e IR3535 > 99,9% foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA), Cayman Chemical® (East Ellsworth, MI, EUA) e Toronto Research Chemicals® (Toronto, ON, CA), respectivamente. Acetonitrila (grau HPLC > 99,9%) foi adquirida da Sigma-Aldrich®. Para evitar contaminação, todos os materiais de vidro foram embebidos em uma solução de ácido nítrico a 10,0% ($v\ v^{-1}$) por 24 horas e posteriormente limpos com água ultrapura. Todos os reagentes eram de grau analítico. Soluções padrão foram preparadas diluindo as soluções estoque ou amostras comerciais com água ultrapura ($18,2\ M\Omega\ cm$; $25\ ^\circ C$) obtida por meio de um sistema de purificação UV Millipore Simplicity®.

3.3.2 AMOSTRAS

Foram adquiridas 21 amostras comerciais de repelentes à base de DEET, Icaridina e IR3535 (7 amostras de cada ingrediente ativo), de diferentes lotes, fabricantes, composições (aquosa, gel e loção) e faixas de concentração, em supermercados locais de Curitiba, Paraná, Brasil. Os níveis de concentração para os três ingredientes ativos em amostras comerciais variam de 5 a 30% ($m\ m^{-1}$). A preparação das amostras envolveu diluições em soluções aquosas e agitação vigorosa em vortex. Vale ressaltar que amostras de repelentes comerciais contêm excipientes variáveis em suas formulações, como perfume, álcool, água, conservantes e óleos essenciais (que contêm anéis aromáticos em sua estrutura que emitem fluorescência, causando interferência).

3.3.3 DADOS DE FLUORESCÊNCIA EEM E SOFTWARE

Os espectros de EEM (Excitação e Emissão) foram adquiridos utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC com cubeta de quartzo de quatro faces polidas de 10 mm de caminho óptico. A largura da fenda do monocromador de excitação e emissão foram ambas fixadas em 5 nm. Os dados espectrais foram coletados com o comprimento de onda de excitação variando de 220 a 400 nm (com intervalo de 10 nm) e a faixa de emissão de 250 a 700 nm (intervalo de 1 nm).

Os dados espectrais de EEM foram importados para o software MATLAB (MathWorks, Inc., MA, EUA, versão 2018a), no qual foram previamente tratados, devido a interferências espectrais causadas principalmente por espalhamento Rayleigh e o espalhamento Raman. Em uma primeira etapa os espectros de excitação-emissão

foram processados com a subtração do branco analítico para a remoção do espalhamento Raman. Na sequência utilizou-se o algoritmo baseado em recuperação de dados perdidos (“*Missing data recovery*” MDR) proposto por Tan *et al.*, (2020) para a remoção do espalhamento Rayleigh, bem como para reparar a bilinearidade e trilinearidade na região da interferência. Os modelos PARAFAC e MCR-ALS foram construídos utilizando o *PLS-Toolbox* (Eigenvector, Manson, WA, USA, versão 8.7) para MATLAB.

3.3.4 PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROID DESIGN

Com o intuito de desenvolver um conjunto de calibração com ampla faixa de concentração para os 3 analitos e com uma quantidade reduzida de amostras, foi desenvolvido um planejamento de misturas com cinco níveis de concentração (TABELA 2) contemplando os 3 analitos avaliados neste estudo (DEET, Icaridina e IR3535). Misturas binárias e ternárias foram preparadas usando várias amostras comerciais contendo cada ingrediente ativo e seus excipientes. Como todas as formulações apresentam excipientes, e esses compostos foram detectados na análise, sua influência foi considerada durante a modelagem de calibração, para avaliar a capacidade das técnicas quimiométricas em analisar amostras complexas, e potencialmente eliminando a necessidade de um padrão analítico. Amostras do conjunto de calibração não foram incluídas no conjunto de predição externo.

Os cinco níveis são indicados por 1/6, 1/3, 1/2, 2/3 e 1, que correspondem as cinco diferentes concentrações em solução aquosa dos 3 analitos nas misturas: 0,166, 0,333, 0,500, 0,667 e 1,000 % (m m^{-1}).

TABELA 2 - FATORES, NÍVEIS E MATRIZ EXPERIMENTAL DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROID UTILIZADO PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E CONSTRUÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS

Variáveis	Níveis				
	(1/6)	(1/3)	(1/2)	(2/3)	1
DEET % (m m^{-1})	0,166	0,333	0,500	0,667	1,000
Icaridina % (m m^{-1})	0,166	0,333	0,500	0,667	1,000
IR3535 % (m m^{-1})	0,166	0,333	0,500	0,667	1,000

Ensaio	DEET	Icaridina	IR3535
	(m m^{-1})	(m m^{-1})	(m m^{-1})
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	2/3	1/6	1/6
8	1/6	2/3	1/6
9	1/6	1/6	2/3
10	1/3	1/3	1/3

FONTE: O Autor

3.3.5 CONJUNTO TESTE PARA VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS

Com a finalidade de testar a capacidade dos modelos PARAFAC e MCR-ALS em prever concentrações de amostras desconhecidas, três conjuntos de predição foram construídos, denominados X_{deet} , X_{ica} e X_{ir} referindo-se um para cada analito (DEET, Icaridina e IR3535), respectivamente.

Os conjuntos de predição foram construídos a partir de amostras comerciais, em que todos os excipientes das formulações estavam presentes na matriz de cada analito e as concentrações utilizadas para os três conjuntos teste foram 0,25, 0,35, 0,48, 0,57, 0,69 e 0,80 % (m m^{-1}), sendo que as amostras desse conjunto de predição

não participaram da construção dos modelos multivariados de calibração. Sendo assim, vale ressaltar que os conjuntos de teste foram avaliados separadamente, uma vez que os produtos comerciais normalmente contêm apenas um princípio ativo em sua formulação.

3.3.6 ANÁLISE DE HPLC PARA A DETERMINAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535

Os valores de referência para os ingredientes ativos DEET, Icaridina e IR3535 foram obtidos usando HPLC-DAD, seguindo o método descrito por Vilar *et al.*, (2018) com pequenas modificações. As determinações dos ingredientes ativos foram conduzidas usando um cromatógrafo Agilent 1260 Infinity equipado com uma coluna C18 ZORBAX XDB (50 mm x 4,6 mm, 5 μ m). O método cromatográfico empregou uma fase móvel consistindo de água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O programa de gradiente foi configurado para um gradiente linear de 0–5 min de 20:80% v v⁻¹ (A:B), seguido por um gradiente linear de 80:20% v v⁻¹ (A:B) de 5 a 7 min. A detecção foi realizada em um comprimento de onda de 210 nm, com uma taxa de fluxo constante de 0,6 mL min⁻¹ mantida durante toda a execução da amostra. O volume de injeção foi ajustado em 50 μ L, e a temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. A faixa de calibração para DEET foi de 1–20 mg L⁻¹, enquanto foi de 1–30 mg L⁻¹ para IR3535, e 5–30 mg L⁻¹ para Icaridina. Os valores dos coeficientes de correlação ajustados (R_{adj}.) foram iguais ou superiores a 0,99. A significância estatística da regressão foi avaliada pela ANOVA. Para determinar a concentração de cada ingrediente ativo em amostras comerciais, elas foram diluídas aproximadamente 20.000 vezes para DEET e 10.000 vezes para Icaridina e IR3535 em água ultrapura.

3.3.7 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de validação utilizados para avaliar e comparar a performance dos modelos bilineares (MCR-ALS) e trilineares (PARAFAC) para a predição de DEET, Icaridina e IR3535 em amostras com diferentes composições de repelentes comerciais foram: taxa de recuperação (TR) (Eq. 11), erro médio quadrático (RMSE) (Eq. 12) e erro relativo de predição (REP) (Eq.13) (Zhu *et al.*, 2020). Para avaliar a precisão do modelo, pode-se realizar um teste estatístico por meio da região elíptica de confiança conjunta (EJCR), no qual o seu objetivo é analisar a presença de erros sistemáticos no método desenvolvido, comparando os valores do método de

referência (HPLC-DAD) com os valores preditos pelos modelos PARAFAC e MCR-ALS utilizando um ajuste de mínimos quadrados ordinários (OLS) (eq. 14) e o intercepto (a) e a inclinação (b) estimados são comparados (com seus valores ideais de 0 e 1) usando o teste da região de confiança conjunta elíptica (EJCR) (Goicoechea & Olivieri, 2002; De Araújo Gomes *et al.*, 2022). Para o cálculo de LOD, LOQ, SEN e SEL, foi utilizado os cálculos propostos por Valderrama *et al.*, (2009) e Olivieri, (2014) para dados de calibração multimodo.

$$TR = \frac{\hat{y}_i}{y_i} \times 100\% \quad \text{Equação 11}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad \text{Equação 12}$$

$$REP\% = \frac{RMSEP}{I_v} 100 \quad \text{Equação 13}$$

$$EJCR = n(y - b)^2 + 2 \sum_{i=1}^n x_i (X - a)(y - b) + \sum_{i=1}^n x_i^2 (X - a)^2 = 2s^2 F_{\alpha, n-2} \quad \text{Equação 14}$$

Onde, n é o número de amostras utilizada para o cálculo do erro (RMSE), sendo as amostras de calibração para o REMSEC e as amostras de validação para o RMSEP, y_i e $\hat{y}_i$ são a concentração real e a concentração predita pelo modelo para a amostra i , respectivamente. E I_v é o valor médio da concentração no conjunto de calibração.

Para a equação 11, a e b são os valores estimados para o intercepto e inclinação da regressão realizada entre as concentrações previstas pelo modelo versus as concentrações reais do analito, x_i é a concentração da i -ésima amostra usada como referência, s^2 é a variância da regressão, F é o valor crítico do teste de Fischer tendo α como o nível de confiança (geralmente 95 %) e $n - 2$ graus de liberdade.

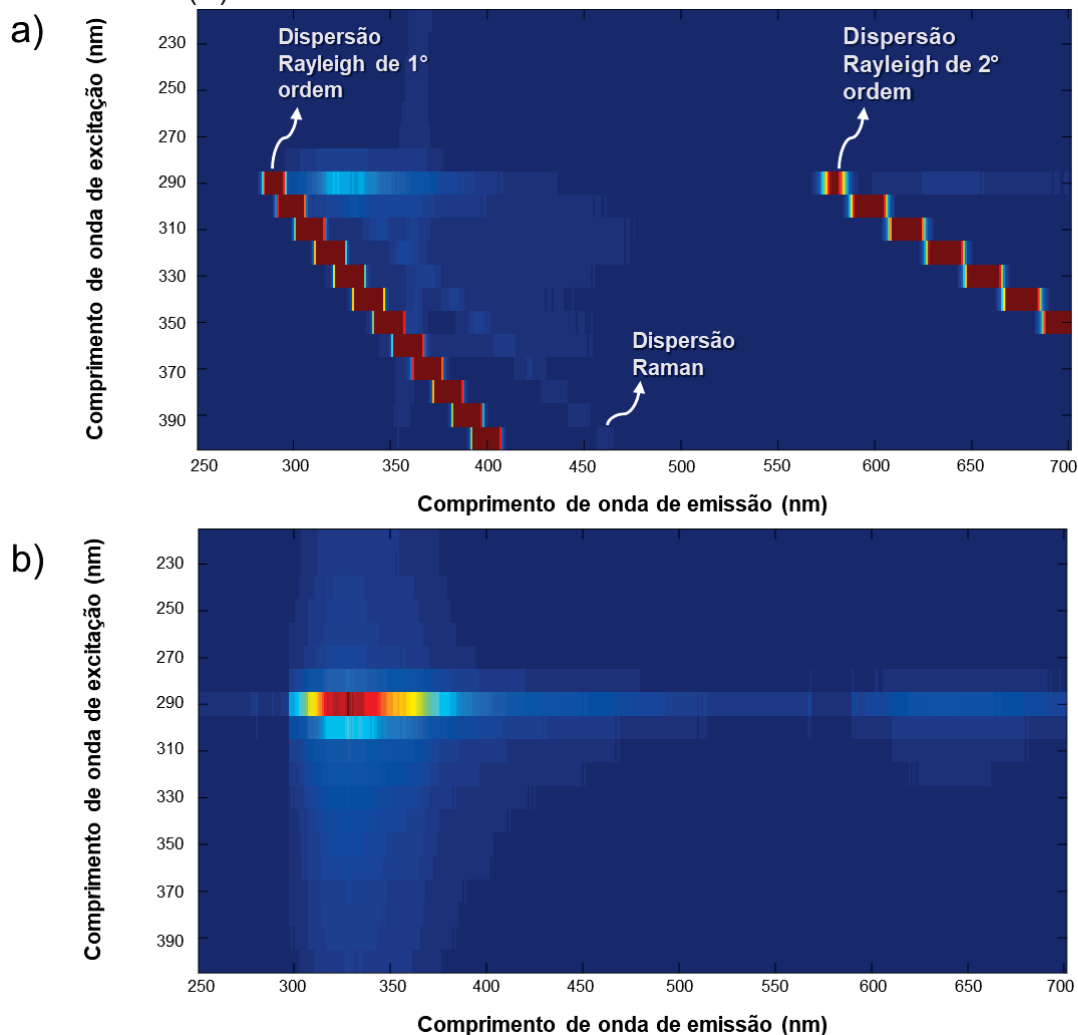
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 ANÁLISE ESPECTRAL E PRÉ-TRATAMENTO

O EEM é essencialmente uma coleção de espectros de emissão coletados em vários comprimentos de onda de excitação. Desta forma é possível obter uma matriz de Excitação-Emissão que permite visualizar, simultaneamente, uma vasta gama de compostos fluoróforos em um único gráfico tridimensional. A resposta de fluorescência de qualquer fluoróforo detectado na EEM depende principalmente de três parâmetros: perfil espectral de excitação, perfil espectral de emissão e sua concentração (Kumar & Mirsha, 2013; Kumar & Mirsha, 2012).

Os espectros EEM podem ser usados como “*fingerprints*” dos fluoróforos constituintes da matriz, uma vez que cada composto detectado terá apenas um único perfil de excitação e/ou emissão. Entretanto, conforme observado na FIGURA 10a, os sinais de espalhamentos Rayleigh e Raman são inevitáveis na espectroscopia de fluorescência EEM. Esses sinais de dispersão não contêm nenhuma informação do fluoróforo e muitas vezes interferem na análise, e reduzem significativamente as informações analíticas valiosas que, de outra forma, estariam ocultas em um espectro EEM, além de não estar em conformidade com a estrutura bilinear e trilinear das matrizes de excitação-emissão de fluorescência (EEM) (Yu *et al.*, 2016).

FIGURA 10 – MATRIZ EEM SEM O PRÉ-TRATAMENTO (A) E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (B)



Fonte: O Autor

O espalhamento Rayleigh de primeira ordem refere-se a dispersão elástica da luz ou radiação eletromagnética por partículas. Normalmente é um fenômeno comum em espectros EEM, em que os comprimentos de onda de excitação são iguais aos comprimentos de onda de emissão (Valuer, 2001; Lakowicz, 2006). Os sinais de espalhamento Rayleigh de segunda ordem por sua vez, podem ser observados em comprimentos de onda de emissão duas vezes o comprimento de onda de excitação.

O efeito Raman surge principalmente das substâncias constituintes da mistura, por exemplo, os solventes. A molécula do solvente sofre uma transição não permitida para seu estado virtual, e o espalhamento de luz proveniente dessa interação resulta em um sinal observado no espectro de emissão. A energia relacionada com o

espalhamento Raman para determinado solvente (ou molécula) é constante, independentemente do comprimento de onda de excitação (Valuer, 2001). Por exemplo, em meio aquoso, solvente utilizado neste trabalho, o sinal Raman aparece aproximadamente em 3600 cm^{-1} , independentemente do comprimento de onda de excitação. Esse comprimento de onda será observado como a diferença entre a banda Raman e a banda Rayleigh de primeira ordem no espectro EEM (Valuer, 2001; Kumar *et al.*, 2017; Lakowicz, 2006). Ambas as bandas Rayleigh e Raman aparecem diagonalmente no espectro EEM, como ilustrado na FIGURA 10a. A aparência diagonal desses sinais de espalhamento é devida à diferença de energia constante entre a excitação e a luz espalhada (Kumar *et al.*, 2017), sendo que o espalhamento Rayleigh é sempre mais intenso que o espalhamento Raman.

Antes de processar um espectro EEM para análise, é necessária a utilização de um pré-tratamento espectral, para que os sinais de espalhamento Rayleigh e Raman sejam eliminados ou minimizados e que não haja perda de informações analíticas importantes. Na literatura já se encontram diversos trabalhos com ferramentas quimiométricas para minimizar ou eliminar tais efeitos, como: subtração de espalhamento baseada em modelagem, reponderação de sinal, substituição de espalhamento, interpolação e assim por diante (Li *et al.*, 2012; Bahram *et al.*, 2006; Rinnan *et al.*, 2005; Bro *et al.*, 2002). Em face disso, neste trabalho utilizaremos um algoritmo desenvolvido por Tan *et al.*, (2020) baseado em recuperação de dados perdidos acoplado a análise de componentes principais (“*Missing data recovery*” MDR-PCA), em que primeiramente trata-se os sinais na região de espalhamento Rayleigh como dados faltantes, utilizando zeros, após aplica-se à PCA recuperando os vetores dos *scores* t e os *loadings* p , reconstruindo a matriz com base nos sinais restantes, aqueles fora da região faltante definida. Além disso, para os EEM com perda significativa de informação devido ao espalhamento Rayleigh severo, os sinais recuperados associados aos espectros de excitação e emissão na região ausente são ainda mais restritos a seguir as leis físicas e químicas dos espectros de fluorescência para obrigá-los a conformar bilinearidade ou trilinearidade, conforme ilustrado na FIGURA 10b.

3.4.2 PLANEJAMENTO DE MISTURAS SIMPLEX-CENTROID DESIGN PARA A CALIBRAÇÃO DOS MODELOS PARAFAC E MCR-ALS

Após o pré-tratamento dos espectros EEM, um planejamento de misturas *Simplex-Centroid Design* conforme descrito na seção 3.4, foi empregado com o intuito de se obter uma matriz de calibração, no qual foram organizadas em um conjunto de dados de três vias que contemple os três analitos alvos, além de uma avaliação dos efeitos de interação de modo isolado (espectros puros) e misturas binárias e ternárias.

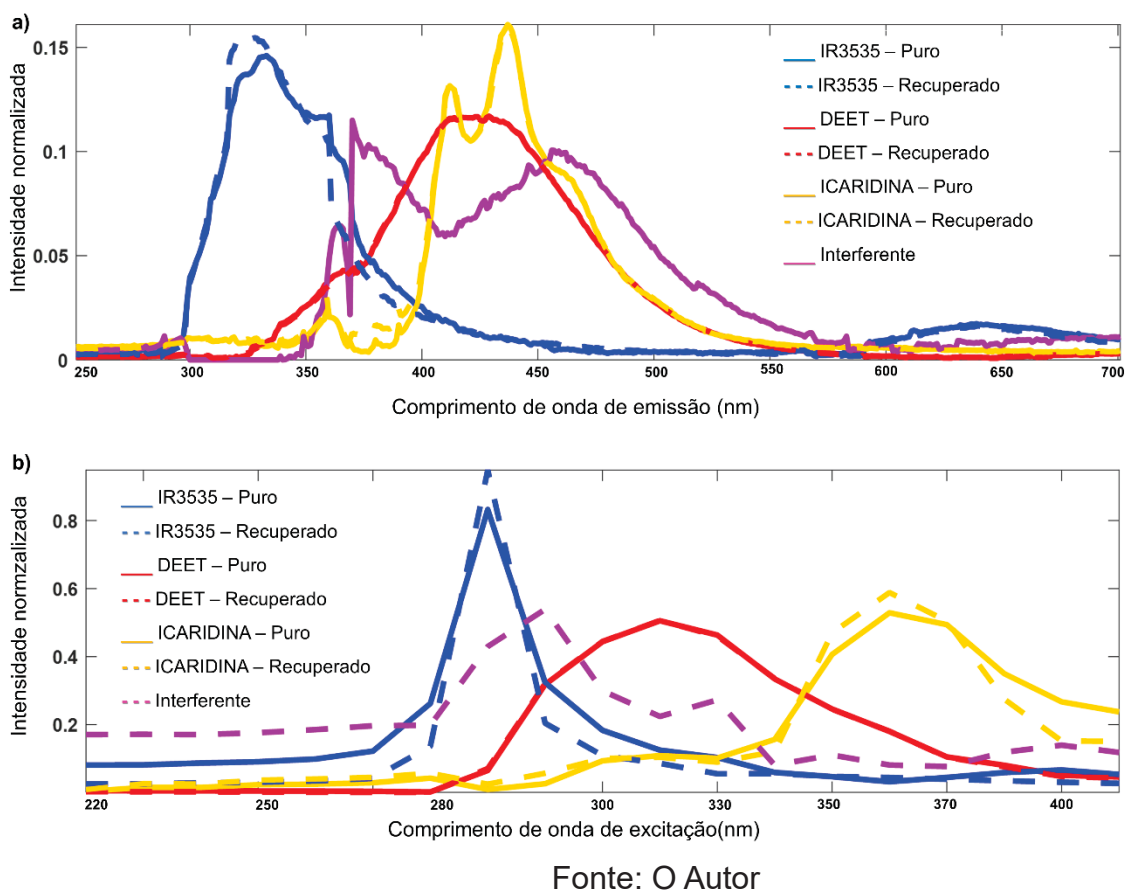
O conjunto de dados de três vias para a matriz de calibração $\overline{X}_1$ possui a dimensão 10x19x451, em que a primeira dimensão do conjunto de dados de três vias representa o número de amostras (número de pontos que constituem o planejamento de misturas), enquanto a segunda e a terceira dimensão correspondem ao número de comprimento de onda de excitação e emissão registrados, respectivamente.

Para a decomposição PARAFAC foi aplicado ao conjunto de dados de três vias da calibração ($\overline{X}_1$) restrição de não negatividade nas três vias (matrizes **A**, **B** e **C**), pois os perfis espectrais de emissão e excitação e a concentração relativa das amostras, devem ser positivos para não se obter informações equivocadas (por exemplo, concentração negativa).

O modelo foi construído com 4 componentes e o algoritmo CONCORDIA (*"core consistency"*) foi usado para estimar o número de componentes do sistema (Bro *et al.*, 2003). Quando o valor do *core consistency* diminui acentuadamente à medida que o número de componentes aumenta, a composição ótima pode ser estimada. Neste trabalho, o número ótimo de componentes foi 4, o que indica a presença de três analitos e um componente cofator interferente.

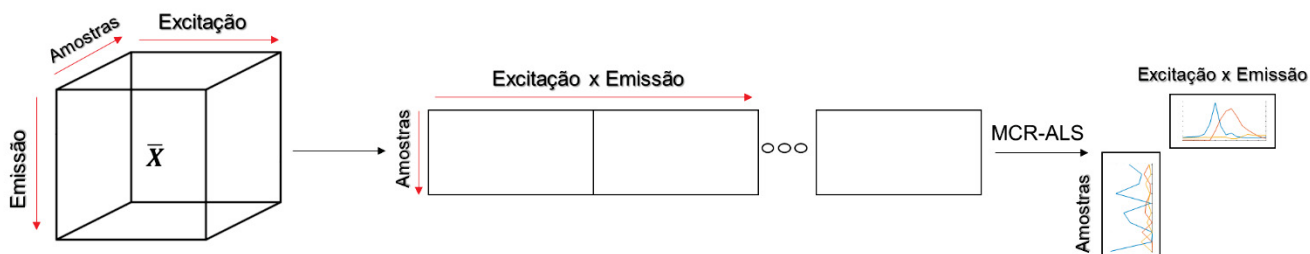
A FIGURA 11a mostra os espectros de emissão e a FIGURA 11b os espectros de excitação recuperados pelo modelo PARAFAC (em tracejado) e os espectros puros obtidos para os analitos DEET, Icaridina e IR3535 e um interferente (em sólido). É possível observar um perfil espectral semelhante ao comparar o espectro recuperado com os espectros de emissão pura, mesmo na presença de potenciais interferentes de natureza e composição desconhecida (conhecido como "vantagem de segunda ordem"). Isso é digno de nota, visto que a matriz de calibração baseada no projeto da mistura foi gerada a partir de amostras comerciais, que são complexas e contêm vários excipientes em sua formulação, como óleos essenciais, que podem interferir na análise.

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS ESPECTRAIS DE EMISSÃO PUROS (A) E EXCITAÇÃO (B) E AQUELES RECUPERADOS PELO MODELO PARAFAC PARA OS ANALITOS DEET, ICARIDINA, IR3535 E UM COFATOR INTERFERENTE



Para aplicar o modelo MCR-ALS às matrizes EEM de fluorescência, o tensor de calibração de três vias (trilinear) $\overline{X}_1$ dos dados EEM foi desdobrado em matrizes bilineares (ou matrizes de dados aumentadas) com as seguintes dimensões $10 \times (19 \times 451)$, sendo amostras $\times$ (excitação $\times$ emissão), conforme elucidado na FIGURA 12. Essa decomposição foi utilizada para se beneficiar da principal característica do MCR-ALS que é a decomposição de sinal. Ao desdobrar os espectros na forma de excitação $\times$ emissão, o novo pseudo-espectro criado contém 8569 variáveis que carrega as informações de unicidade presentes nos espectros de excitação e emissão.

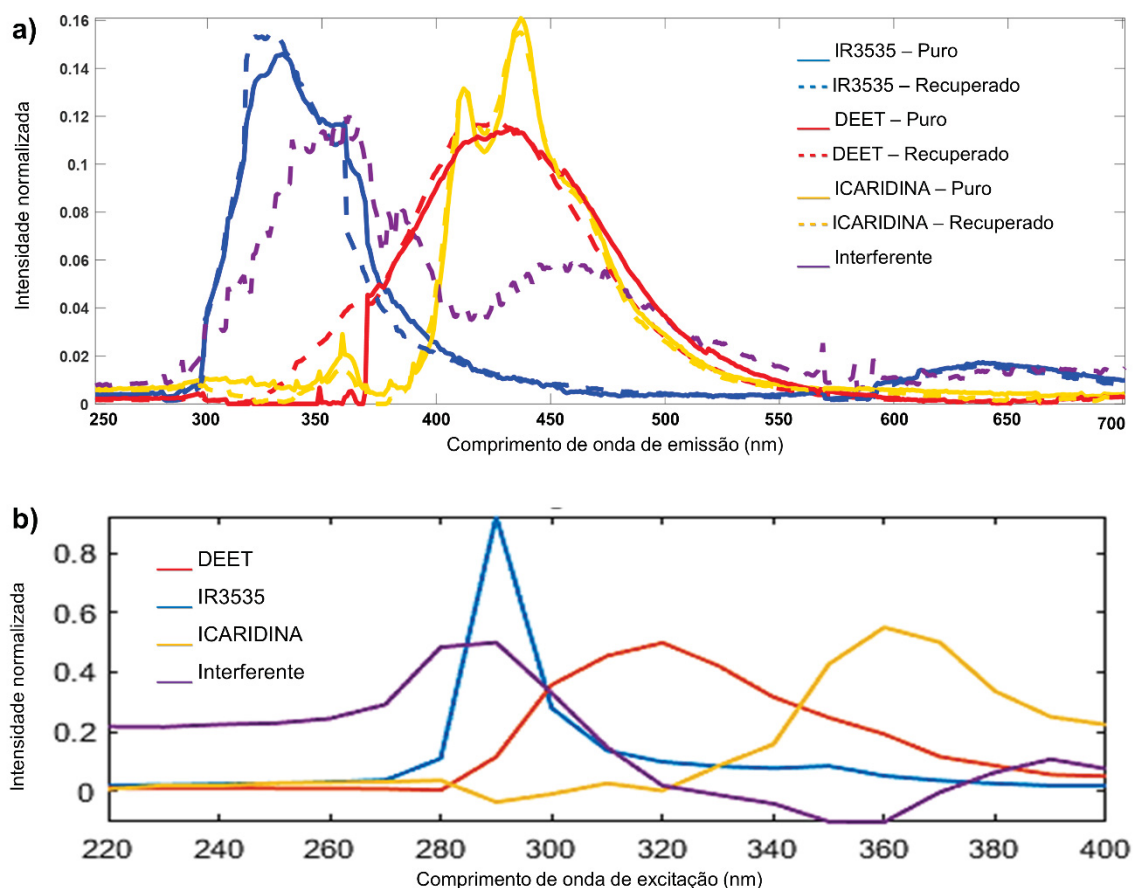
FIGURA 12 – DESDOBRAMENTO DE DADOS DE TRÊS VIAS EM MATRIZES BIDIRECIONAIS E DECOMPOSIÇÃO DE MATRIZES DE DADOS AUMENTADAS POR MCR-ALS



Fonte: O Autor

A construção do modelo bilinear usando MCR-ALS foi baseada em 4 componentes, verificando a variância explicada pela PCA da matriz aumentada de 97,68%. Restrições de trilinearidade e não negatividade foram aplicadas tanto aos espectros quanto às concentrações. O ajuste do modelo foi estimado pelo critério de convergência usando a falta de ajuste (lof) (Kumar & Mirsha, 2015; Shariati-Rad & Hasani, 2009). No método proposto, a falta de ajuste do modelo foi de 14,06% com 31 interações e uma variância explicada de 98,02%. A Fig. 13a mostra os espectros de emissão, e a Fig. 13b os espectros de excitação recuperados pelo modelo PARAFAC (em tracejado), e os espectros puros obtidos para os analitos DEET, Icaridina e IR3535 e um interferente (em sólido).

FIGURA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS ESPECTRAIS DE EMISSÃO (A) E EXCITAÇÃO (B) E AQUELES RECUPERADOS PELO MODELO MCR-ALS PARA OS ANALITOS DEET, ICARIDINA, IR3535 E UM COFATOR INTERFERENTE

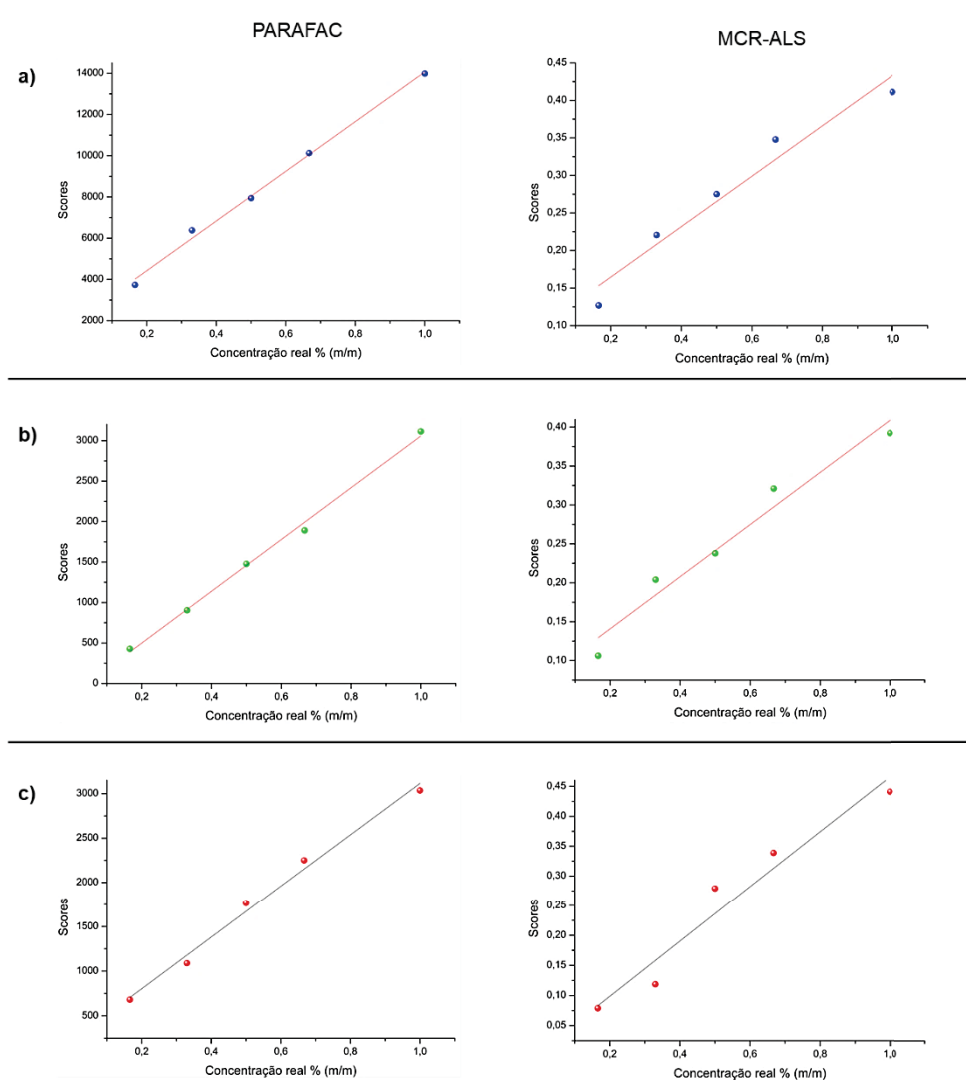


Fonte: O Autor

Após recuperar os espectros correspondentes aos analitos, uma regressão de mínimos quadrados foi construída para todos os analitos usando as matrizes representando a concentração relativa (*scores do MCR-ALS*) recuperados pelos modelos trilinear (PARAFAC) e bilinear (MCR-ALS), e a concentração real usada no planejamento de mistura, resultando em uma curva pseudo-univariada para cada analito (FIGURA 14) (Dinç *et al.*, 2023; Lakhal *et al.*, 2012). A linearidade foi avaliada para os três analitos na faixa de concentração de 0,166 – 1% (m m^{-1}). Para todos os casos (3 analitos e 2 modelos), a curva analítica foi avaliada usando análise de variância unidirecional (ANOVA) para avaliar o ajuste do modelo. O valor de F_{cal} ($\text{MQ}_{\text{regressão}}/\text{MQ}_{\text{resíduo}}$) excedeu significativamente F_{tab} (10.13), sugerindo que o modelo linear é significativo e retrata a correlação entre os carregamentos do analito e a

concentração real, em um nível de confiança de 95%. A TABELA 3 apresenta resumidamente os parâmetros de calibração para cada analito.

FIGURA 14 – CURVA ANALÍTICA OBTIDAS PELOS MÉTODOS PARAFAC E MCR-ALS PARA O A) DEET, B) ICARIDINA E C) IR3535



Fonte: O Autor

TABELA 3 - ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR E SEUS RESULTADOS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS PROPOSTOS

	PARAFAC			MCR-ALS		
	DEET	Icaridina	IR3535	DEET	Icaridina	IR3535
m	0,01415	0,01167	0,02529	0,3359	0,3351	0,4590
n	0,01230	0,00981	0,00634	0,0974	0,0737	0,0068
r	0,9979	0,9982	0,9953	0,9780	0,9813	0,9740
SD(m)	0,0003	0,0010	0,0007	0,0414	0,0378	0,0615
SD(n)	0,0002	0,0006	0,0004	0,0250	0,0229	0,0372

m: inclinação; n: intercepto; r: coeficiente de correlação; SD(m): desvio padrão da inclinação; SD(n): desvio padrão do intercepto.

De acordo com a TABELA 3, nota-se que o modelo trilinear PARAFAC obteve um melhor ajuste comparado com o modelo bilinear MCR-ALS. Isso pode estar relacionado com a natureza dos dados das matrizes de excitação-emissão de fluorescência (EEM), que representam dados de segunda-ordem. Estes dados trilineares são compatíveis com o algoritmo PARAFAC, sendo bem consolidado na literatura (Catena *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023; Chang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020).

Outra diferença entre PARAFAC e o MCR-ALS é que o PARAFAC leva a soluções únicas, enquanto o MCR-ALS necessita da aplicação de uma série de restrições (todas elas baseadas em suposições físico-químicas) para alcançar uma solução quimicamente razoável (Tauler, 1995; Tauler *et al.*, 2020).

3.4.3 PREVISÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535 EM AMOSTRAS DESCONHECIDAS UTILIZANDO OS MODELOS PARAFAC E MCR-ALS

Após obter os parâmetros de calibração para ambos os modelos, três conjuntos de predição foram construídos, com a finalidade de se testar os modelos na predição da concentração de novas amostras contendo os três analitos estudados neste trabalho. Sendo assim, os tensores para os três analitos, denominados $\overline{X_{deet}}$, $\overline{X_{ica}}$ e $\overline{X_{ir3535}}$, foram arranjados nas dimensões 6x19x451 (amostras x excitação x emissão). Para comparar o desempenho dos modelos PARAFAC e MCR-ALS na quantificação

dos ingredientes ativos em repelentes, a TABELA 4 apresenta os parâmetros de validação.

TABELA 4 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA A AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO MODELOS PARAFAC E MCR-ALS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM REPELENTE

Fatores	RMSEC (% m m ⁻¹)	r _{cal}	RMSEP (% m m ⁻¹)	RR (%)	REP (%)	SEN (% m m ⁻¹)	SEL (% m m ⁻¹)	LOD (% m m ⁻¹)	LOQ (% m m ⁻¹)
PARAFAC									
DEET	1.70	0.990	1.84	98	0.568	4,470.00	0.9234	0.011	0.044
Icaridina	1.50	0.997	1.83	101	0.630	2,564.00	0.8918	0.012	0.046
IR3535	1.70	0.990	1.79	102	0.768	2,705.00	0.9897	0.011	0.045
MCR-ALS									
DEET	4.30	0.983	4.20	91	1.920	563.7667	0.8383	0.022	0.055
Icaridina	11.20	0.981	11.30	79	12.130	112.2142	0.9184	0.023	0.057
IR3535	6.60	0.970	6.80	111	4.450	84.5577	0.9261	0.022	0.055

TR: Taxa de recuperação (média das 6 concentrações); RMSEC: erro médio quadrático de calibração;

RMSEP: erro médio quadrático da predição; REP: Erro relativo de predição; LOD: Limite de

Deteção; LOQ: Limite de quantificação; SEN: Sensibilidade; SEL: Seletividade.

Fonte: O Autor

Comparando os melhores resultados para os modelos PARAFAC e MCR-ALS, apresentados na TABELA 4, podemos observar que o modelo PARAFAC apresenta um melhor desempenho analítico para os três analitos (DEET, Icaridina e IR3535) em comparação ao modelo MCR-ALS. Isso pode estar relacionado à natureza dos dados, uma vez que os espectros EEM têm uma trilinearidade bem definida, sendo mais compatíveis com a ferramenta PARAFAC. Isso fica evidente quando comparamos os valores de RMSEC e RMSEP, em que para o modelo PARAFAC os resultados para os três analitos foram menores que 1,84%, enquanto para o modelo MCR-ALS, os valores variaram entre 4,30 e 11,20%. Para avaliar a capacidade preditiva do modelo (REP), observamos que o modelo PARAFAC apresentou valores abaixo de 0,768%, indicando uma boa correlação entre os valores reais e previstos, além de apresentar um resíduo baixo, porém para o modelo MCR-ALS os valores foram ligeiramente superiores, variando de 1,92 a 12,13%, concordando com os valores do RMSEP. Outra métrica importante para avaliação é a sensibilidade do modelo (SEN), que corresponde à fração do sinal responsável pela adição de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (Valderrama *et al.*, 2009). Pode-se notar que o modelo PARAFAC apresenta uma SEN muito maior que o modelo MCR-ALS. Os

demaís parâmetros, seletividade (SEL), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), não apresentaram alterações significativas quando comparados ambos os modelos.

3.4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR HPLC-DAD

Para avaliar a exatidão analítica dos modelos PARAFAC e MCR-ALS em prever as concentrações de novas amostras, as seis amostras do conjunto de validação externa foram submetidas a cromatografia à líquido com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), utilizado neste trabalho como uma técnica de referência. Para isso, foram realizados o teste t pareado com um nível de confiança de 95% (TABELA 4) e o teste da região de confiança conjunta elíptica (EJCR) (FIGURA 15).

O teste t pareado (TABELA 5) nos fornece a informação de que o método MCR-ALS difere do método de referência HPLC no nível de confiança de 95%, uma vez que T_{cal} para todos os analitos foi maior que T_{tab} .

TABELA 5 – DETERMINAÇÃO DE DEET, ICARIDINA E IR3535 EM AMOSTRAS DE REPELENTES COMERCIAIS USANDO OS MÉTODOS PROPOSTOS (PARAFAC E MCR-ALS) E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO DE REFERÊNCIA HPLC-DAD

Amostra	Analito	Concentração (% m m ⁻¹)			t _{cal} PARAFAC	t _{cal} MCR-ALS
		Referência (HPLC)	Predito PARAFAC	Predito MCR-ALS		
1	DEET	0,25	0,22	0,22	1,58	3,31
2		0,35	0,33	0,31		
3		0,48	0,48	0,44		
4		0,57	0,55	0,53		
5		0,69	0,69	0,62		
6		0,80	0,81	0,81		
7	Icaridina	0,25	0,25	0,17	1,57	2,76
8		0,35	0,35	0,23		
9		0,48	0,47	0,34		
10		0,57	0,60	0,49		
11		0,69	0,71	0,64		
12		0,80	0,82	0,84		
13	IR3535	0,25	0,27	0,33	1,46	3,84
14		0,35	0,36	0,41		
15		0,48	0,51	0,52		
16		0,57	0,55	0,68		
17		0,69	0,70	0,71		
18		0,80	0,81	0,83		

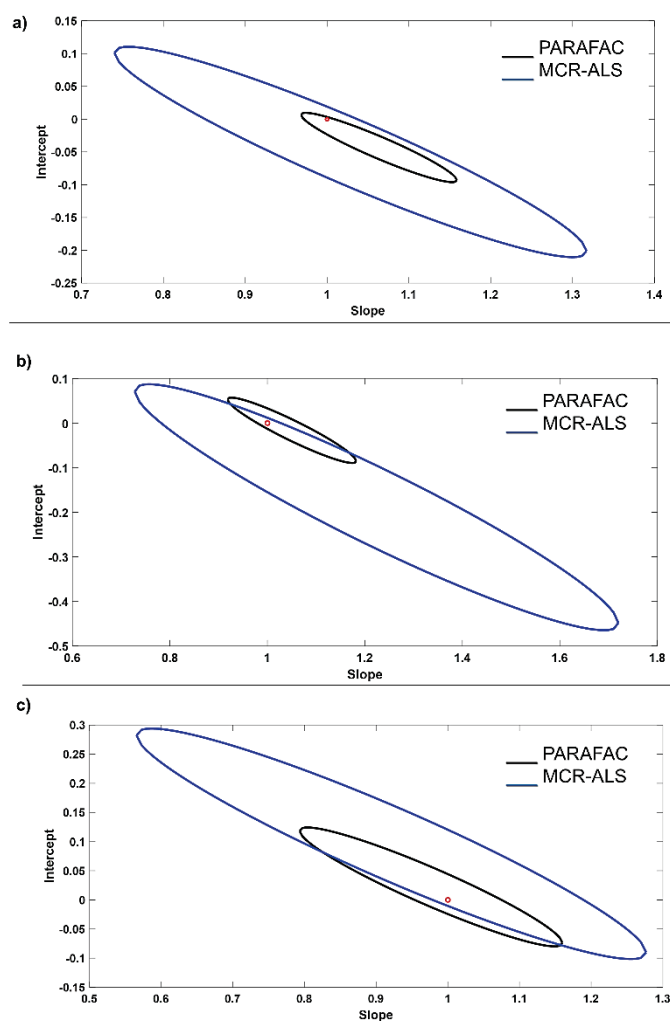
t_{tab} (n = 5, 95% nível de confiança) = 2,57

Fonte: O Autor

Uma possível explicação para a diferença observada no teste t pareado pode ser observada quando aplicamos a região de confiança da junta elíptica (EJCR) (FIGURA 15), na qual para todos os analitos os métodos PARAFAC e MCR-ALS provaram ser exatos, uma vez que o ponto ideal (0,1) está dentro da elipse de confiança. No entanto, pode-se notar que a circunferência no EJCR para os modelos PARAFAC é menor e conseqüentemente mais próximo ao ponto ideal comparado com os modelos MCR-ALS. O menor EJCR representa uma maior precisão do resultado

esperado ao aplicar PARAFAC em comparação aos modelos MCR-ALS. Além disso, vale ressaltar que o modelo PARAFAC para os três analitos mostrou-se mais preciso do que o modelo MCR-ALS ao comparar tanto o RMSEP quanto o EJCR (Goicoechea & Olivieri, 2002).

FIGURA 15 – ELIPSE DE CONFIANÇA PARA OS MÉTODOS PARAFAC (PRETO) E MCR-ALS (AZUL) PARA A) DEET, B) ICARIDINA E C) IR3535



Fonte: O Autor

Por conseguinte, a TABELA 6 nos fornece a concentração dos três princípios ativos estudados neste trabalho em amostras comerciais, que foram testadas pelo método de referência (HPLC-DAD) e pelos métodos PARAFAC e MCR-ALS para avaliar se a quantidade de princípio ativo descrito no rótulo, de fato se faz condizente com o encontrado no produto comercial. Além disso, pode-se averiguar a

confiabilidade em prever as concentrações de novas amostras pelos métodos PARAFAC e MCR-ALS em relação ao método de referência (HPLC-DAD).

TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES DESCRITAS NO RÓTULO, DETERMINADOS POR HPLC-DAD E ESTIMADOS PELOS MODELOS PARAFAC E MCR-ALS

Valor Rotulado DEET	HPLC-DAD	PARAFAC	MCR-ALS
% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)
15,00	15,08	13,20	13,20
6,79	6,83	6,49	6,04
25,00	24,95	24,95	22,87
7,60	7,51	7,33	7,06
10,00	10,02	10,02	9,16
15,00	15,01	14,82	14,82

Valor Rotulado Icaridina	HPLC-DAD	PARAFAC	MCR-ALS
% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)
9,98	9,99	9,99	6,79
20,00	19,97	19,97	13,12
25,00	25,03	24,51	18,01
5,50	5,50	5,78	4,73
25,00	25,03	25,75	23,21
12,40	12,48	12,79	13,10

Valor Rotulado IR3535	HPLC-DAD	PARAFAC	MCR-ALS
% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)	% (m m⁻¹)
20,00	19,98	21,57	26,37
25,00	25,01	25,72	29,29
7,50	7,59	8,06	8,22
12,50	12,49	12,05	14,95
10,00	9,99	10,01	10,27
12,50	12,55	12,70	12,96

Fonte: O Autor

Pode-se notar que tanto o PARAFAC quanto o MCR-ALS alcançam a vantagem de segunda ordem ao processar simultaneamente múltiplas amostras de calibração.

Por se tratarem de modelos de decomposição de sinais, é possível decompor a contribuição dos potenciais agentes interferentes e dos analitos a partir do sinal total, e assim quantificar os analitos de interesse na presença de interferentes (Hai-Long *et al.*, 2020).

No entanto, ao se comparar a eficiência geral dos modelos, o PARAFAC obtém melhores resultados, sendo o mais indicado para este tipo de dados. Isso se deve, em grande parte, à sua estrutura ser altamente compatível com os dados de Espectroscopia de Matriz de Emissão de Excitação (EEM).

3.5 CONCLUSÃO

Este capítulo propôs uma nova metodologia analítica para a determinação simultânea de princípios ativos (DEET, Icaridina e IR3535), utilizando matrizes Excitação-Emissão de fluorescência molecular (EEM) acoplado a ferramentas quimiométricas.

O uso de espectroscopia de excitação-emissão (EEM) juntamente com técnicas quimiométricas de ordem superior, como PARAFAC e MCR-ALS, demonstrou eficiência e confiabilidade na quantificação de ingredientes ativos em repelentes de insetos. O método analítico proposto exibiu baixos erros de predição ($RMSEP < 2,0\%$ para PARAFAC e $RMSEP < 11,3\%$ para MCR-ALS), indicando a viabilidade de empregar esta técnica espectral como uma ferramenta de custo-efetivo e altamente precisa para o controle de qualidade destas amostras comerciais.

Além disso, a utilização de dados de fluorescência EEM em combinação com técnicas quimiométricas de ordem superior apresenta a vantagem de modelar o sistema mesmo sem o conhecimento prévio dos potenciais interferências. Esta propriedade permite a detecção dos compostos de interesse mesmo em formulações onde potenciais fluoróforos são adicionados, ou na predição das concentrações de todos os três ingredientes ativos, apesar da complexidade da matriz repelente.

A metodologia proposta demonstrou níveis de precisão semelhantes aos resultados obtidos pelo método HPLC, com um nível de confiança de 95%. Além disso, oferece as vantagens de ser mais rápido e simples (do ponto de vista de aquisição de dados) em comparação ao HPLC, e não requer solventes orgânicos de alta pureza, o que o torna uma alternativa mais ecológica e em concordância com os princípios da Química Verde.

4. SEÇÃO II - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EMULSÕES: REOLOGIA, IMAGEAMENTO HIPERESPECTRAL E ESPECTROSCOPIA RAMAN ASSOCIADOS À QUIMIOMETRIA

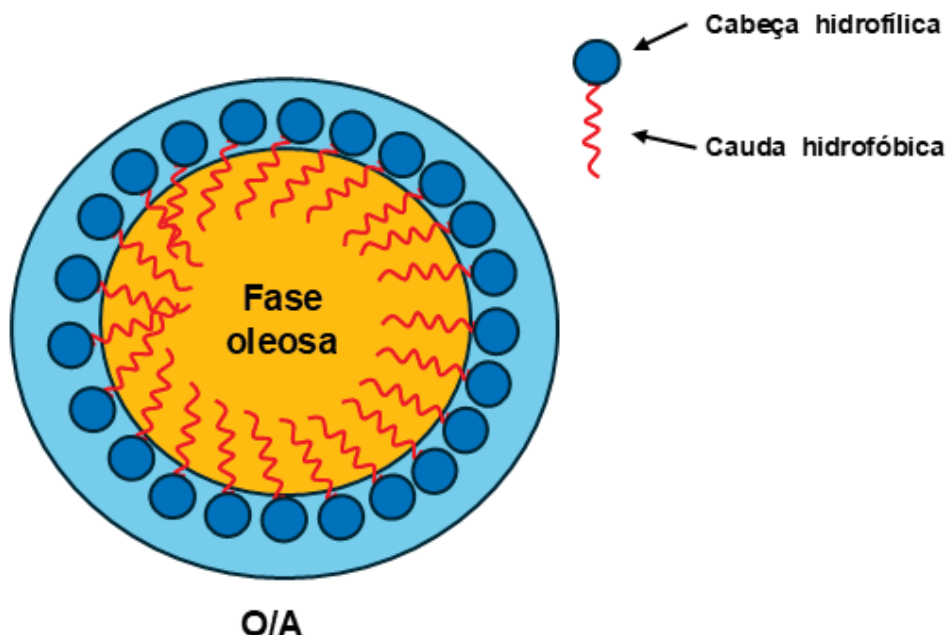
4.1 INTRODUÇÃO

Devido à crescente globalização e competitividade do mercado, a inovação em produtos e processos químicos tem se tornado imprescindível. Nesse contexto, a indústria química passou por uma transformação ao longo do tempo, mudando o foco da produção a granel para o desenvolvimento de produtos com identidade própria e maior valor agregado. Um exemplo disso está concentrado na indústria cosmética, mais especificamente as emulsões cosméticas (Calvo *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2006).

Emulsões são sistemas interfaciais termodinamicamente instáveis devido à alta tensão superficial de um líquido em outro líquido imiscível, estabilizados por meio do uso de surfactantes e/ou partículas sólidas. Surfactantes são a escolha comumente usual para esse propósito e são usados para emulsões de água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) (FIGURA 16). O papel de um surfactante é reduzir a tensão interfacial entre as fases, minimizando assim a energia livre do sistema e subsequentemente estabilizando a interface para resistir à coalescência (Binks, 2002; Venkataramani *et al.*, 2020).

A estabilidade e a liberação de compostos/princípios ativos em sistemas emulsionados estão diretamente relacionadas à sua localização dentro das fases, seja na fase dispersa (oleosa) ou contínua (aquosa). Na indústria cosmética, as emulsões destacam-se como um dos sistemas mais versáteis e amplamente utilizados, sendo fundamentais em diversas aplicações, como cosméticos com adição de fragrância e cor específicos, produtos para cuidados com a pele/cabelo e itens de higiene pessoal (Venkataramani *et al.*, 2020; Knowlton, 2000).

FIGURA 16 – ILUSTRAÇÃO DE EMULSÃO DE ÓLEO EM ÁGUA (O/A) ESTABILIZADA UTILIZANDO SURFACTANTE



FONTE: adaptado de (Venkataramani et. al., 2020).

No entanto, diante da diversidade de produtos cosméticos disponíveis no mercado, com uma ampla gama de aplicações e formulações, não existe uma uniformidade clara na definição do prazo de validade desses produtos (Choi *et al.*, 2021). Essa falta de padronização pode representar sérios riscos à saúde e segurança dos consumidores. Ademais, o manuseio inadequado, a preservação insuficiente e as práticas inadequadas de armazenamento podem acelerar a deterioração dos cosméticos, comprometendo ainda mais sua segurança e eficácia (Choi *et al.*, 2021; Giacomel *et al.*, 2013).

Posto isto, as etapas de distribuição e armazenamento são as mais críticas, visto que frequentemente nessas etapas as emulsões cosméticas estão mais expostas à luz solar e ao estresse térmico, o que pode levar à desestabilização do produto, ou ainda a decomposição e contaminação aceleradas (Hans *et al.*, 2008). Como os ingredientes que influenciam sua estabilidade estão diretamente ligados à sua taxa de degradação, alguns trabalhos têm sido reportados na literatura com o intuito de compreender o mecanismo exato pelo qual o estresse térmico desencadeia a decomposição e desestabilização das emulsões. No entanto, os estudos foram conduzidos em

cosméticos utilizando métodos termoanalíticos, como termogravimetria (TG) e calorimetria de varredura diferencial (DSC) (de Almeida *et al.*, 2014; Shukat *et al.*, 2012; de Almeida *et al.*, 2010). Esses métodos, apesar de trazerem informações cruciais quanto as alterações físicas do produto, falham em agregar informações sobre as mudanças na sua composição, ou até mesmo na caracterização química do ingrediente ativo. Essa limitação dificulta a compreensão dos mecanismos de degradação do sistema.

Para mitigar esses efeitos, a indústria cosmética realiza uma série de análises com o objetivo de assegurar a qualidade das emulsões e, conseqüentemente, do produto final antes de ser disponibilizado ao consumidor. Essas análises são fundamentadas internacionalmente pela International Federation of Societies of Cosmetic Chemists – IFSCC com o título “*The Fundamentals of Stability Testing*” (IFSCC, 1992) e no Brasil pela ANVISA no título “Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos” (Brasil, 2004), que atua como órgão regulador.

Entre os principais fatores analisados nos estudos de estabilidade acelerada estão os fatores intrínsecos, relacionados aos componentes da formulação cosmética, como incompatibilidades físicas e químicas (pH e interações entre os ingredientes), e os fatores extrínsecos, vinculados a agentes externos, como tempo de armazenamento, temperatura, luz e umidade. Segundo o Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2012) entende-se por estabilidade física, àqueles produtos farmacêuticos que mantêm suas características físicas como: aparência da suspensão, uniformidade, dissolução e suspensabilidade durante todo o período de estudo.

Para a estabilidade química, o produto farmacêutico deve manter integridade química e a concentração do ativo dentro dos limites especificados. A perda da estabilidade química pode ser determinada por fatores intrínsecos e extrínsecos e levar à alteração na concentração do princípio ativo, acarretando na diminuição da dose destinada ao paciente. Adicionalmente, produtos provenientes da degradação do princípio ativo podem apresentar alta toxicidade, trazendo riscos ao paciente. O limite geralmente aceito para a decomposição química dos produtos farmacêuticos é de, no máximo, 10%, desde que os produtos de decomposição estejam seguramente identificados e seus efeitos sejam previamente conhecidos. Em geral, os produtos farmacêuticos devem conter de 90 a 110% do princípio ativo declarado no rótulo (Brasil, 2012).

Entretanto, nos estudos de degradação forçadas sugeridos pelos órgãos reguladores, os fatores são estudados de forma isolada. Este tipo de abordagem, limita

observar efeitos de interação entre as variáveis, como por exemplo, temperatura e tipo de embalagem para armazenamento. No entanto, no mundo real, os produtos cosméticos são frequentemente expostos a múltiplos efeitos extrínsecos simultaneamente, o que pode resultar em interações complexas não captadas por esses estudos (Rente *et al.*, 2022; Martins & Marto, 2023).

Diante disso, estudos de degradação forçada baseados em sistemas multivariados surgem como uma excelente alternativa para emulsões em matrizes complexas. Essas abordagens permitem não apenas avaliar as características químicas da emulsão, mas também considerar todos os fatores simultaneamente, reduzindo o número de experimentos necessários. O mais importante é que essas metodologias possibilitam a análise do efeito de interação entre os diversos fatores constituintes da emulsão cosmética, proporcionando uma compreensão mais abrangente do comportamento da formulação (Neto *et al.*, 2010).

Para avaliar os aspectos físicos das emulsões, recomenda-se a análise via centrifugação do produto, a fim de verificar a separação de fases. Enquanto a estabilidade química é comumente avaliada por técnicas cromatográficas, como LC e GC (Brasil, 2004; IFSCC, 1992).

Atualmente, diversas abordagens estão sendo implementadas para investigar a estabilidade de emulsões. A pesquisa tem se concentrado em duas vertentes principais: o aprimoramento da caracterização e da modelagem da estabilidade por meio de Inteligência Artificial e o desenvolvimento de novos sistemas via modificações de ingredientes, como no caso das emulsões de Pickering (estabilizadas por partículas sólidas).

Um exemplo da primeira vertente é demonstrado no trabalho de Patil *et al.*, (2022), que utilizou Aprendizado Profundo (*Deep Learning*) para a análise de imagens de emulsões. Para esse fim, o método *Faster R-CNN* foi empregado para prever os tamanhos das gotículas da emulsão, visando fornecer uma base mais robusta para a compreensão de parâmetros de estabilidade, como coeficientes de estabilidade das gotículas e escalas de tempo de relaxamento. No entanto, este estudo apresenta certas limitações; notadamente, o modelo treinado pode ser altamente específico para o tipo de emulsão e as condições de imagem empregadas (emulsões óleo-em-água Exxsol D80), necessitando de recalibração ou da inclusão de novas amostras no modelo para uma aplicação mais ampla.

Em relação à segunda vertente, que envolve a modificação química dos ingredientes (Pickering), Tao et al. (2023) propuseram uma nova emulsão de Pickering utilizando um complexo de proteína isolada do soro do leite (WPI) modificado com um antioxidante natural (cianidina-3-glicosídeo, C3G), com o objetivo de encapsular e proteger a curcumina. A modificação resultou em alta estabilidade, com o complexo WPI-SCI/C3G demonstrando menor tensão superficial e interfacial, indicando propriedades emulsificantes superiores. No entanto, algumas limitações foram identificadas, como maior complexidade do processo, desafios relacionados à viabilidade econômica em escala industrial e dependência do sistema específico.

É nesse cenário em que a técnica de imageamento hiperespectral pode ser destacada, apresentando como vantagem, por avaliar informações químicas tanto qualitativas quanto quantitativas além das informações físicas relacionadas com a estabilidade a partir do mapeamento da amostra.

Esse método gera uma matriz tridimensional conhecida como “hipercubo”, que consiste em duas dimensões espaciais, contendo as coordenadas de posição, e uma terceira dimensão, que armazena as informações espectrais de cada pixel da imagem. Essa técnica permite a identificação e localização precisa dos constituintes químicos em uma amostra, baseando-se na seletividade das técnicas espectrais utilizadas, como a espectroscopia Raman. No entanto, devido à vasta quantidade de informações contidas nas imagens hiperespectrais, é essencial o uso de ferramentas quimiométricas para identificar e extrair os dados mais relevantes (Gowen *et al.*, 2007).

Sendo assim, as ferramentas quimiométricas frequentemente empregadas são baseadas em métodos de recuperação de sinal, como exemplo a Resolução de Curvas Multivariadas por Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS) e a Análise de Componentes Independentes (ICA). Um exemplo destas aplicações é reportado por Araya *et al.*, (2017) que utilizaram imageamento hiperespectral combinado com espectroscopia no infravermelho médio para quantificar lignina e glucanos em fibras lignocelulósicas, empregando o método MCR-ALS. De maneira semelhante, Boiret *et al.*, (2014) utilizaram imageamento hiperespectral associado à espectroscopia Raman para avaliar a distribuição espacial de um princípio ativo em fármacos, utilizando o método ICA.

Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi aplicar métodos multivariados para investigar a estabilidade química e física de emulsões em cosméticos. Os fatores extrínsecos descritos no "Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos" da ANVISA (Brasil, 2004), foram avaliados por meio de um planejamento fatorial, e a resposta analítica foi analisada por meio de imageamento hiperespectral combinado com espectroscopia Raman, utilizando o método MCR-ALS.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade de emulsões, incluindo sua vida de prateleira (*Shelf-life*) de forma multivariada, utilizando imageamento hiperespectral associado a espectroscopia Raman e quimiometria (MCR-ALS).

4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a degradação de uma emulsão do tipo O/A e do princípio ativo Benzofenona-5 em diferentes condições de armazenamento, por meio de um estudo acelerado.
- Comparar a estrutura química e reológica em função do tempo e armazenamento.
- Utilizar a ferramenta quimiométrica MCR-ALS para avaliar o possível perfil químico de degradação da emulsão.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o preparo das emulsões, foram adquiridos Vaselina Líquida via Synth® (Diadema, SP, BRA) e uma pasta base de creme hidratante no comércio local da cidade de Curitiba-PR, Brasil. Todas as emulsões foram preparadas utilizando água ultrapura (18.2 MΩ cm) obtida por meio de um sistema de purificação UV Millipore Simplicity®. O padrão de ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metoxibenzenossulfônico (benzofenona-5) foi adquirido via Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Para evitar qualquer risco de contaminação, toda vidraria foi mantida em solução de ácido nítrico a 10,0% (v v⁻¹) por 24h com posterior limpeza com água ultrapura.

4.3.2 PREPARO DA EMULSÃO

As emulsões cosméticas O/A (óleo/água) foram preparadas conforme descrito na Farmacopeia Nacional Brasileira (Brasil, 2012) com algumas modificações, a partir de uma pasta base de creme hidratante comercial que contém em sua formulação ingredientes típicos usados para aplicações cosméticas. Sua composição apresenta, emulsificantes, espessantes (formadores de filme), surfactantes (Tween 80®) e emolientes como detalhado na TABELA 7 (Barel *et al.*, 2014; Calvo *et al.*, 2022).

Para o preparo da emulsão, pesou-se 2 g de pasta base comercial de creme hidratante e adicionou-se 10 mL de água ultrapura e 200 mg do padrão fotoprotetor benzofenona-5. Em seguida homogeneizou-se o sistema manualmente com auxílio de uma espátula e a seguir adicionou-se 10 mL da fase oleosa (Vaselina líquida). Para a incorporação da fase contínua (óleo) e da fase dispersa (água) o sistema foi homogeneizado mecanicamente utilizando um homogeneizador portátil (Ultra Stirrer - modelo ultra-80) a 9.000 RPM por 2 minutos.

TABELA 7 - LISTA DE INGREDIENTES USADOS PARA PREPARAR AS EMULSÕES COSMÉTICAS A/O

Componentes	% m m ⁻¹
Água	45,0
Tween 80®	3,0
copolímeros de acrilato	1,0
Álcool cetosteárfílico	2,5
estearato de trietanolamina	2,0
carbomero	0,5
Vaselina líquida	45,0
benzofenona-5	1,0

FONTE: O Autor

4.3.3 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA O TESTE DE ESTABILIDADE

Com o intuito de avaliar a estabilidade das emulsões, a emulsão preparada e descrita na seção 4.3.2 foi submetida à diversas condições experimentais por meio de

um planejamento 2^3 com ponto central contendo os principais fatores extrínsecos descritos no “Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos” da ANVISA (Brasil, 2004) conforme a TABELA 8. As amostras submetidas às condições do planejamento experimental foram avaliadas em tempos diferentes com o intuito de se avaliar um possível perfil de degradação química e física da emulsão em função do tempo.

Os tempos neste estudo acelerado foram de 24 horas, 7, 15 e 30 dias. Em face do imageamento hiperespectral demandar um alto de tempo de análise, só foi possível analisar dois pontos do planejamento, em seus respectivos tempos, por dia. Desta forma, para cada novo ponto do planejamento de experimentos uma nova formulação foi preparada. As fotos das emulsões em cada ponto do planejamento de experimentos se encontram no APÊNDICE A.

TABELA 8 - VARIÁVEIS E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL PARA TRIAGEM DO EFEITO DAS VARIÁVEIS NA FORMULAÇÃO DE CREME COSMÉTICOS

Variável	Níveis decodificados		
	(-1)	0	(+1)
Temperatura (°C)	5	25	40
Luz	Ausente	Visível	UV
Material (Tipo)	Vidro	Plástico	Metal

Ensaio	Temperatura (°C)	Luz	Material (Tipo)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

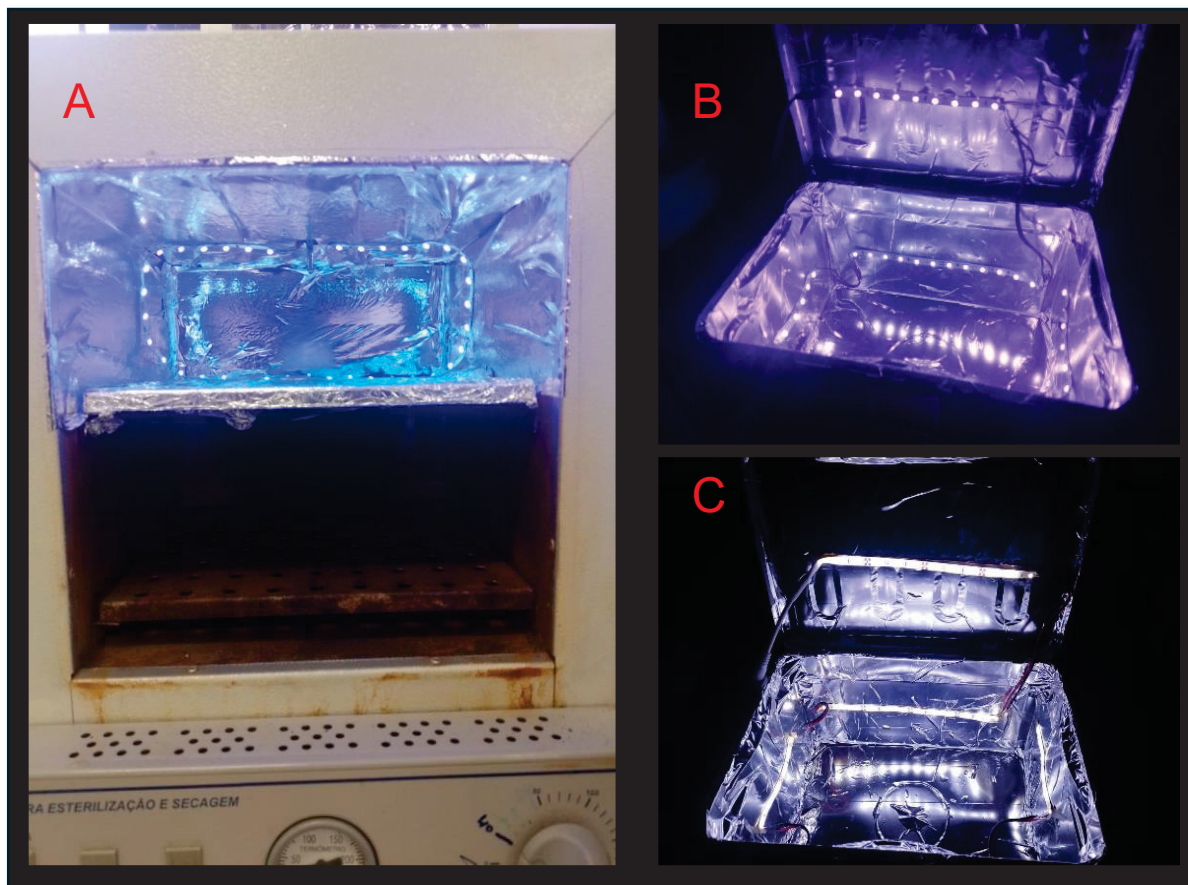
Para cada um dos ensaios a resposta analítica foi obtida por meio de imageamento hiperespectral associado a espectroscopia Raman, além de dados físicos obtidos por reologia, por meio da análise de varredura de frequência.

Para replicar cada condição experimental descrita no planejamento, foram confeccionadas caixas acondicionadoras específicas. Nos experimentos 2, 4, 6 e 8, que requerem uma temperatura de 40°C, utilizou-se uma estufa. Nos experimentos 2 e 6, que devem ser realizados na ausência de luz, as amostras foram colocadas diretamente na estufa, acondicionadas em vidro e metal. Para os experimentos 4 e 8, a estufa foi previamente preparada com fita laminada e luz UV LED (12V), e as amostras foram acondicionadas nos respectivos materiais (vidro e metal) antes de serem colocadas na estufa (Figura 17a).

Nos experimentos 1, 3, 5 e 7, que requerem uma temperatura de 5°C, utilizou-se uma geladeira com controle de temperatura. Nos experimentos 1 e 5, que necessitam de ausência de luz, as amostras foram acondicionadas em vidro e metal e colocadas diretamente em uma caixa organizadora que foi previamente preparada para isolar a entrada de luz, então, armazenada na geladeira. Para os experimentos 3 e 7, uma caixa organizadora foi previamente preparada com fita laminada e luz UV LED (12V), e as amostras foram acondicionadas nos materiais correspondentes (vidro e metal) antes de serem colocadas na geladeira (Figura 17b).

Por fim, para os experimentos que correspondem ao ponto central, uma caixa organizadora foi preparada com fita laminada e luz LED branca (12V). O material acondicionante utilizado foi o plástico, e a temperatura da sala foi mantida a 25°C (Figura 17c).

FIGURA 17 – CAIXAS SIMULANDO OS NÍVEIS PROPOSTOS NO PLANEJAMENTO 2³ COM PONTO CENTRAL A) ENSAIOS 2,4,6 E 8. B) ENSAIOS 3 E 7. C) ENSAIOS DO PONTO CENTRAL



FONTE: O Autor

4.3.4 ANÁLISE RAMAN

As análises Raman foram realizadas em um espectrômetro Raman Confocal Witec Alpha 300R, utilizando um laser no infravermelho próximo (785 nm) e com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} . Para a aquisição das imagens hiperespectrais, o microscópio confocal, equipado com uma lente de 10x ($100\text{ }\mu\text{m}$), foi posicionado sobre a amostra em uma mesa posicionadora XY, permitindo a obtenção dos espectros em função espacial. Os mapas hiperespectrais foram adquiridos em uma área de $25 \times 25\text{ }\mu\text{m}$, com uma potência de laser de 55 mW, coletando-se 25 pontos por linha em 25 linhas, totalizando 625 espectros por amostra. O tempo de integração foi de 10 segundos por pixel.

4.3.5 DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Estudos reológicos foram realizados usando um reômetro TA Instruments modelo HR-10 (TA Instruments, New Castle, EUA), equipado com uma geometria de cone de 40 mm de diâmetro e 350 mm de abertura. As medições ocorreram a uma temperatura constante de 25 °C. Varreduras de frequência foram realizadas com uma amplitude de tensão (τ) variando de 0,01 a 500 Pa, a uma frequência de 1 Hz, registrando-se o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'').

4.3.6 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

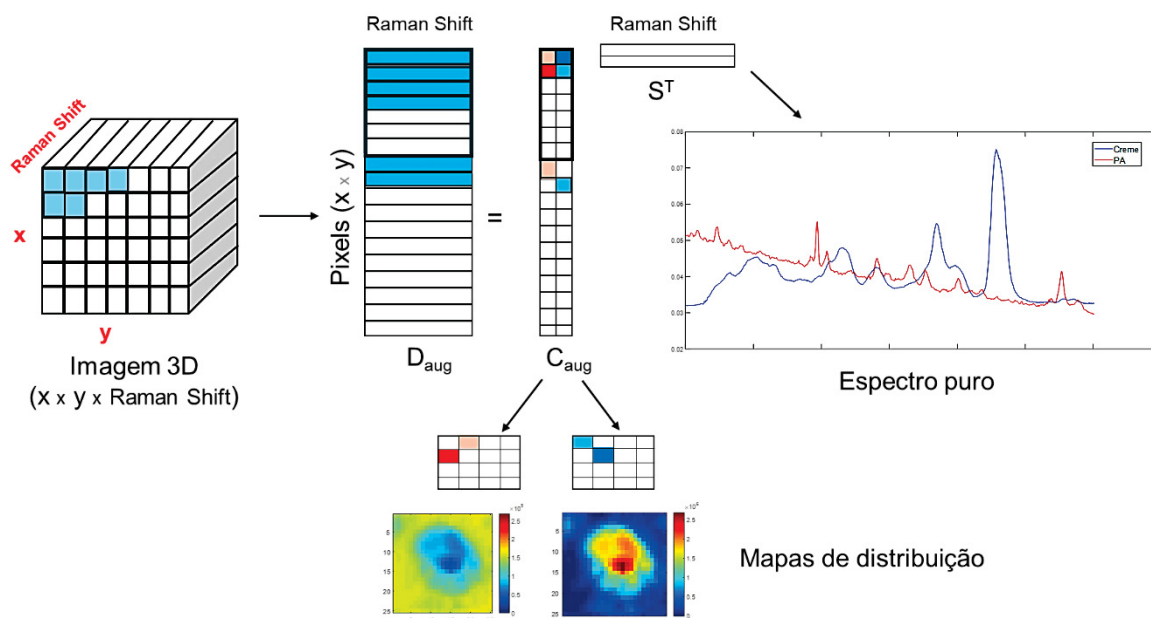
Imagens hiperespectrais podem ser consideradas como um cubo de dados, com duas dimensões associadas às coordenadas de posição dos pixels e uma terceira dimensão contendo as informações espectrais. Como os espectros correspondem a uma mistura de todos os componentes presentes em um pixel, é necessário “extrair” a informação química da imagem hiperespectral.

Para isso, utilizou-se a ferramenta quimiométrica MCR-ALS com o intuito de recuperar o espectro do creme puro e o espectro do princípio ativo (benzofenona-5) incorporado nas emulsões, as quais gerou-se uma matriz de dados aumentada D_{aug} contendo todos os experimentos em todos os tempos do estudo acelerado, conforme ilustrado na FIGURA 18 (Jaumot *et al.*, 2005; Juan, 2019). Todo o tratamento quimiométrico foi realizado usando o ambiente MATLAB 2018a, utilizando rotinas desenvolvidas no laboratório (disponível em: https://github.com/UFPR-DATALab/DATALab_toolbox), para o pré-tratamento dos espectros Raman foi utilizado o algoritmo desenvolvido por (Sabin *et al.*, 2012), e a toolbox MCR GUI 2.0 (disponibilizada online) para a decomposição dos sinais por MCR-ALS (Jaumot *et al.*, 2005).

Para a construção do modelo quimiométrico em cada ensaio do planejamento de experimentos, o número de componentes foi estimado verificando em cada caso a estimativa dada pela decomposição de valor singular (SVD), que tem como princípio diminuir a dimensionalidade dos dados e encontrar padrões. Para iniciar o processo de interação por meio da ALS (Mínimos quadrados alternados) é necessária uma estimativa inicial, o qual foi utilizado o método baseado na aproximação da variável pura (PURE), que tem como fundamento selecionar as colunas com as variáveis mais puras de acordo com o número de fatores que foi selecionado pelo SVD (Março *et al.*,

2014). Por fim, foi aplicado a restrição de não-negatividade, tanto nas concentrações quanto nos perfis espectrais.

FIGURA 18 – CUBO DE IMAGEM E MODELO BILINEAR



FONTE: O Autor

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

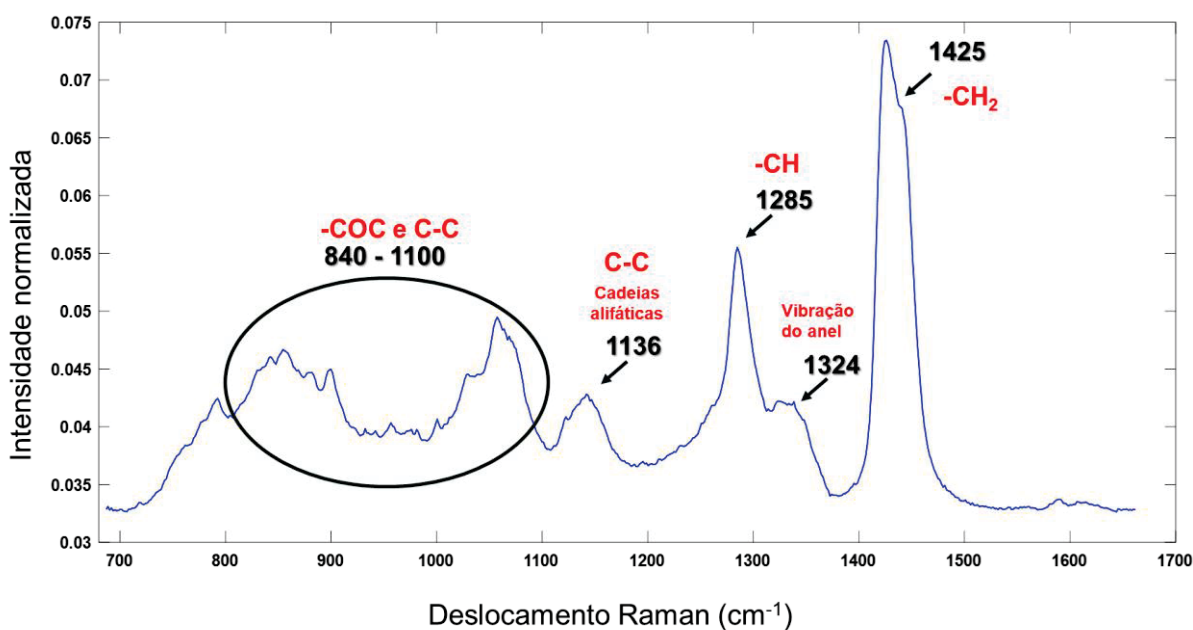
4.4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN PARA O CREME PURO E O PRINCÍPIO ATIVO BENZOFENONA-5

Para avaliar a estabilidade e degradação dos componentes químicos presentes na emulsão, é necessário, primeiramente, caracterizar os espectros puros Raman do creme hidratante e do princípio ativo. A FIGURA 19 ilustra o espectro Raman do creme hidratante, no qual é possível observar uma banda muito intensa, em 1425 cm^{-1} , relacionado com desdobramentos CH_2 característicos de polímeros de cadeias longas, como surfactantes e óleos como a vaselina líquida (Alvarenga *et al.*, 2018; Assi *et al.*, 2022). A segunda banda mais intensa, em 1285 cm^{-1} , está associada a desdobramentos CH , também devido à presença de polímeros de cadeias longas e óleos minerais (Socrates, 2004).

As bandas mais intensas na região de $840\text{ a }1100\text{ cm}^{-1}$ (843 , 854 , 878 , 898 , 956 , 1028 e 1057 cm^{-1}) são usualmente atribuídas a ligações estruturais COC e C-C ,

ambos presentes nos polímeros. A banda em 792 cm^{-1} é uma banda deslocada, relativo à respiração simétrica do anel, que normalmente ocorre entre 755 e 785 cm^{-1} . A banda em 1324 cm^{-1} está relacionado à vibração estrutural do anel. Por fim, a banda em 1136 cm^{-1} é referente ao estiramento C–C de cadeias alifáticas presentes no surfactante (Larkin, 2017; Socrates, 2004). Os espectros do creme são similares a outros cremes reportados na literatura (Jung *et al.*, 2022; Tippavajhala *et al.*, 2018).

FIGURA 19 – ESPECTRO RAMAN DO CREME PURO

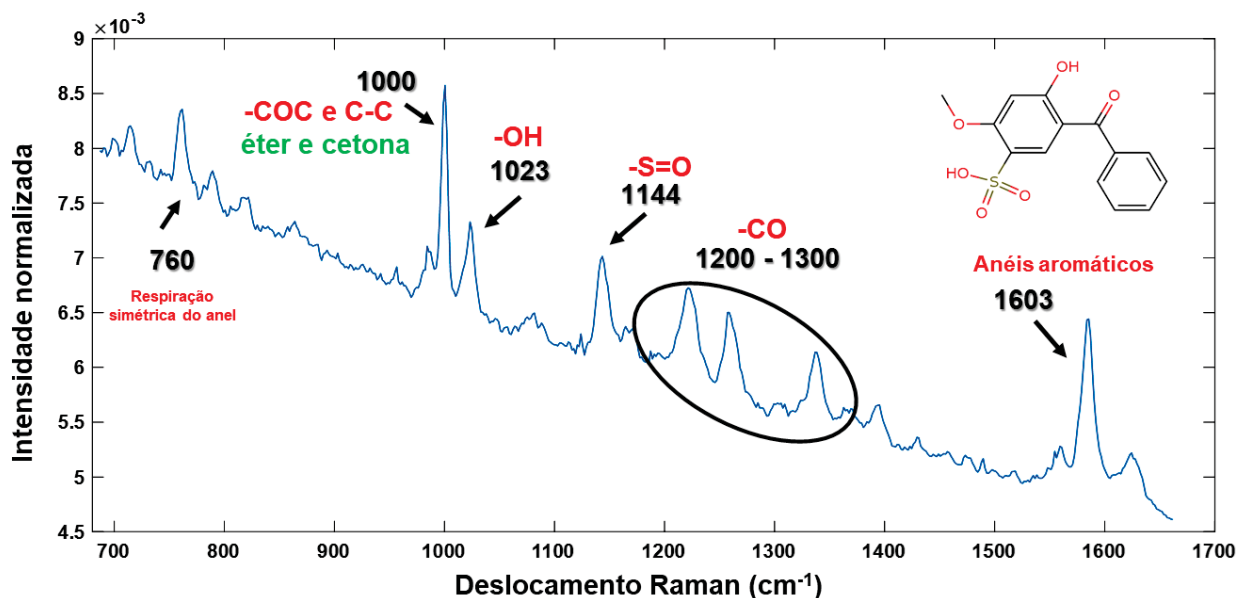


FONTE: O Autor

No espectro Raman do princípio ativo fotoprotetor benzofenona-5, ilustrado na FIGURA 20, observa-se que as bandas mais intensas entre 840 a 1100 cm^{-1} , estão relacionados às ligações estruturais COC e C–C dos grupos funcionais éter e cetona presentes na molécula. A segunda banda mais intensa, em 1603 cm^{-1} , está associada aos dois anéis aromáticos da molécula. Outra banda característica é o de 1023 cm^{-1} , referente ao desdobramento de OH. As bandas em torno de 716 cm^{-1} podem estar relacionadas às flexões CH ou do anel aromático fora do plano. A banda em 760 cm^{-1} é relativa à respiração simétrica do anel, que normalmente ocorre entre 755 e 785 cm^{-1} . A banda de menor intensidade em torno de 820 cm^{-1} está relacionado com a deformação do anel aromático. As bandas de 1200 a 1300 cm^{-1} estão relacionados com a vibração de estiramento C–O para o fenol presente na molécula. Por fim, uma outra

característica importante da molécula é o grupo do ácido sulfônico, identificado pela banda em 1144 cm^{-1} , correspondente à vibração S=O (Socrates, 2004).

FIGURA 20 – ESPECTRO RAMAN DO PRINCÍPIO ATIVO FOTOPROTETOR BENZOFENONA-5



FONTE: O Autor

4.4.2 ESTUDO MULTIVARIADO DA ESTABILIDADE DE EMULSÃO

O estudo de degradação forçada da emulsão e do princípio ativo foi conduzido sob dois aspectos principais: primeiro, pelo emprego do imageamento hiperespectral, que fornece tanto informação química, quanto informação espacial; e segundo, pela comparação dos espectros recuperados pelo MCR-ALS com os espectros puros previamente caracterizados. Embora a espectroscopia Raman não ofereça a mesma seletividade elevada das técnicas cromatográficas ou da espectrometria de massas, a associação com as ferramentas quimiométricas na análise dos dados, permite a análise de amostras de creme (matrizes de alta complexidade). Essa abordagem permite a análise sem uma etapa extensa de preparo de amostras, o que seria indispensável em técnicas como cromatografia e espectrometria de massas.

Para uma discussão mais clara e concisa dos mapas recuperados pelo MCR-ALS e das análises de reologia em cada tempo estudado, serão apresentados os experimentos 2, 8 e 10 (ponto central), nos quais apresentam altas temperaturas e o acondicionamento em embalagens metálicas e vidro, os quais propiciam uma maior

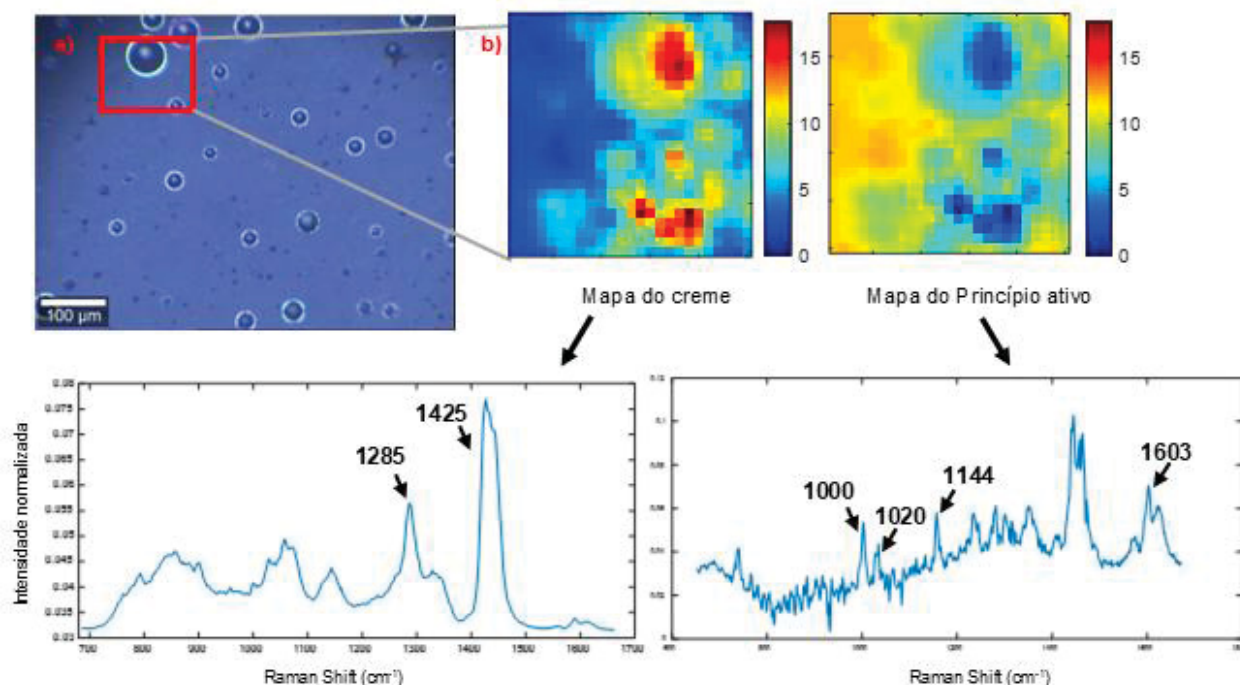
transferência de calor. A escolha desses experimentos possibilitou uma maior comparação com a condição “controle” situada no ponto central.

A avaliação inicial do estudo multivariado ocorreu no tempo de 24 horas, correspondente ao Experimento 10 do planejamento experimental (descrito na Seção 3.3). Nestas condições, a emulsão foi acondicionada em frasco plástico e mantida à temperatura ambiente (25°C), simulando o armazenamento típico de produtos comerciais.

A Figura 21a apresenta a microscopia óptica característica da amostra, permitindo a distinção entre a fase contínua (aquosa) e a fase dispersa (oleosa). A formação desta emulsão O/A é atribuída às propriedades do surfactante empregado, o Tween® 80. Este composto apresenta um valor de HLB (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) próximo a 15 (em escala de 0 a 20), conferindo-lhe caráter hidrofílico. Surfactantes com alto HLB são tipicamente utilizados na estabilização de emulsões do tipo óleo-em-água (O/A) e influenciam diretamente a distribuição de tamanho das gotículas (Wang *et al.*, 2023).

Do ponto de vista químico, a emulsão permaneceu estável, conforme evidenciado pelos mapas e perfis espectrais recuperados via MCR-ALS (Fig. 21b). Os espectros das duas componentes resolvidas demonstraram alta similaridade com os espectros puros. A interpretação dos dados confirma a partição química esperada: a base do creme, rica em cadeias apolares (Fig. 19), encontra-se incorporada na fase dispersa (óleo), enquanto o princípio ativo, caracterizado por grupos polares como hidroxila (-OH) e sulfônico (-SO₃H) (Fig. 20), está solubilizado na fase contínua (aquosa).

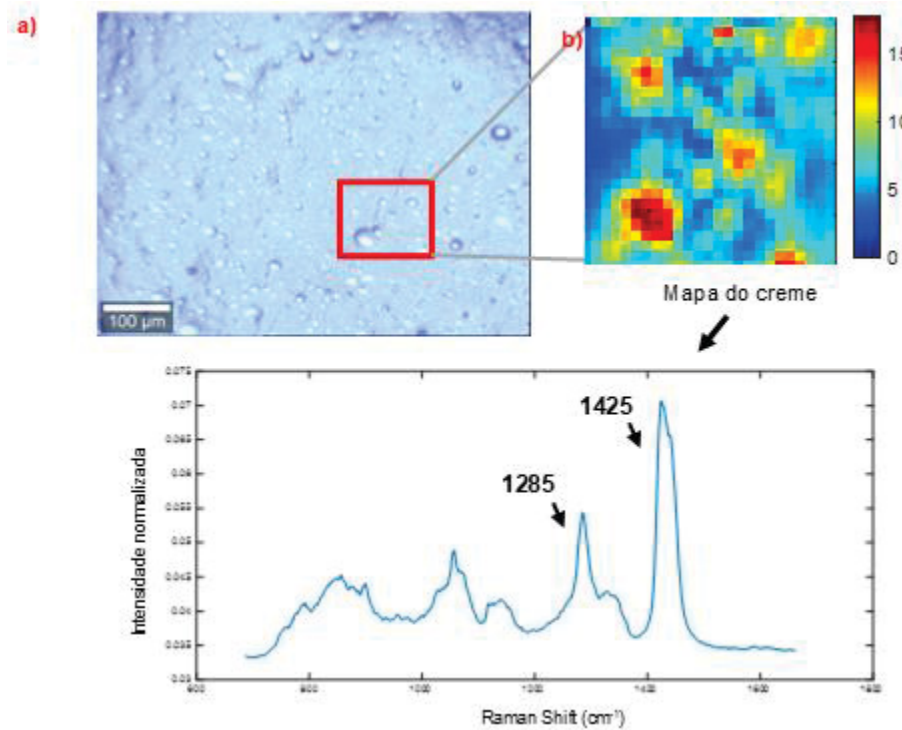
FIGURA 21 – ANÁLISE DO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 24 HORAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS



FONTE: O Autor

No entanto, para o experimento 2, pode-se observar uma mudança já nas primeiras 24 horas, uma vez que o produto permaneceu em uma temperatura de 40°C. Primeiramente, têm-se uma mudança visível na característica da emulsão (FIG. 22a), em comparação com a emulsão no experimento 10 nas mesmas 24 horas. Contudo, quando os espectros recuperados pelo MCR-ALS são comparados quimicamente nota-se que na primeira componente recuperada pelo MCR-ALS o perfil espectral se assemelha ao espectro previamente caracterizado como creme (FIG. 22b).

FIGURA 22 – ANÁLISE DO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 24 HORAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS



FONTE: O Autor

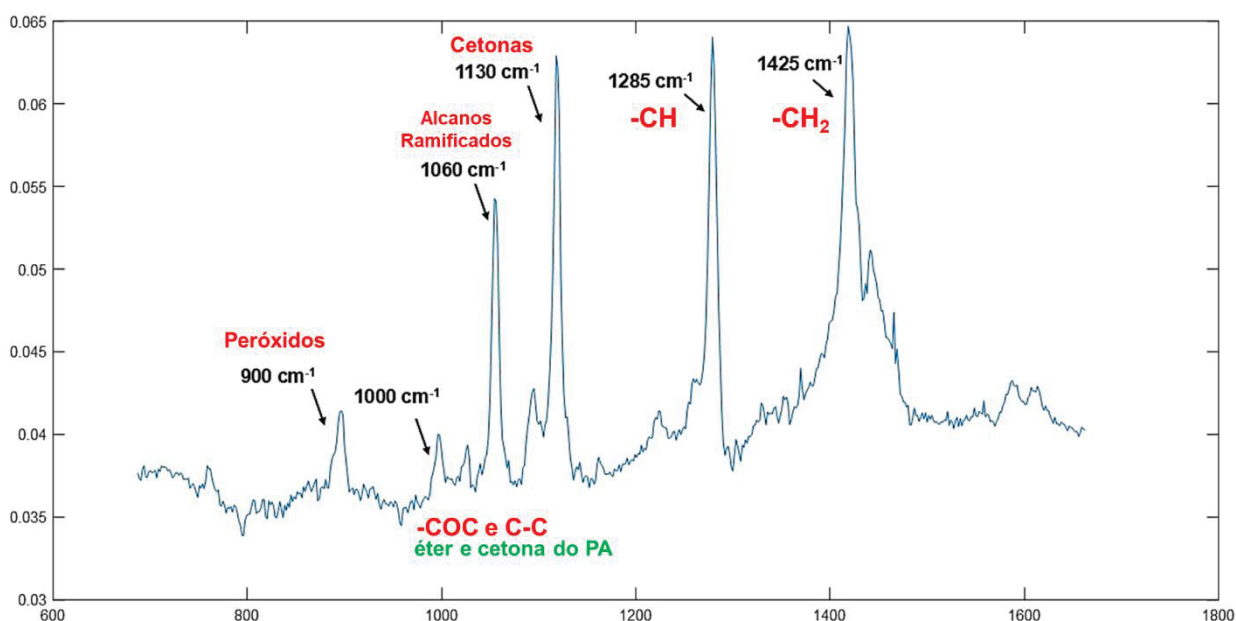
No entanto, na outra componente recuperada nota-se que além das bandas características do princípio ativo em 1000 cm^{-1} e do creme em 1285 e 1425 cm^{-1} há presença de duas bandas em 1060 e 1130 cm^{-1} , os quais não são encontrados nos espectros do creme nem do princípio ativo (FIG. 23).

A presença dessas bandas pode levar a uma hipótese de que há uma possível oxidação (total/parcial) do polissorbato Tween[®] 80 (surfactante). A oxidação do polissorbato é alvo de estudos há bastante tempo, sendo que as principais causas relatadas são: a exposição à radiação UV, temperatura, composição dos ácidos graxos, traços de metais potencialmente tóxicos e resíduos de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kishore *et al.*, 2011a; Kishore *et al.*, 2011b; Dahotre *et al.*, 2018; Dwivedi *et al.*, 2018; Labrenz, 2014; Kerwin, 2008; Martos *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2023).

Alguns trabalhos apresentam um possível mecanismo de reação para a oxidação do PS80 (Tween[®] 80) que apresenta em sua composição pelo menos 58% de ácidos graxos insaturados (considerando apenas o ácido oleico) (Farmacopeia Europeia, 2022; Martos *et al.*, 2017). A degradação oxidativa do PS80 pode ocorrer no sítio

de insaturação do hidrocarboneto baseada na transferência de elétrons seguida pela oclusão do átomo de hidrogênio, no qual ácidos graxos insaturados são mais propensos à oxidação. Os principais subprodutos da oxidação do polissorbatato são a formação de aldeídos, cetonas, ésteres de ácidos graxos, peróxidos e alcanos ramificados (Dahotre *et al.*, 2018; Dwivedi *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2023). Sendo assim, o surgimento das bandas em 900, 1060 e 1130 cm^{-1} , referem-se respectivamente ao estiramento O-O dos peróxidos e aos grupos alcanos ramificados e cetonas (Socrates, 2004).

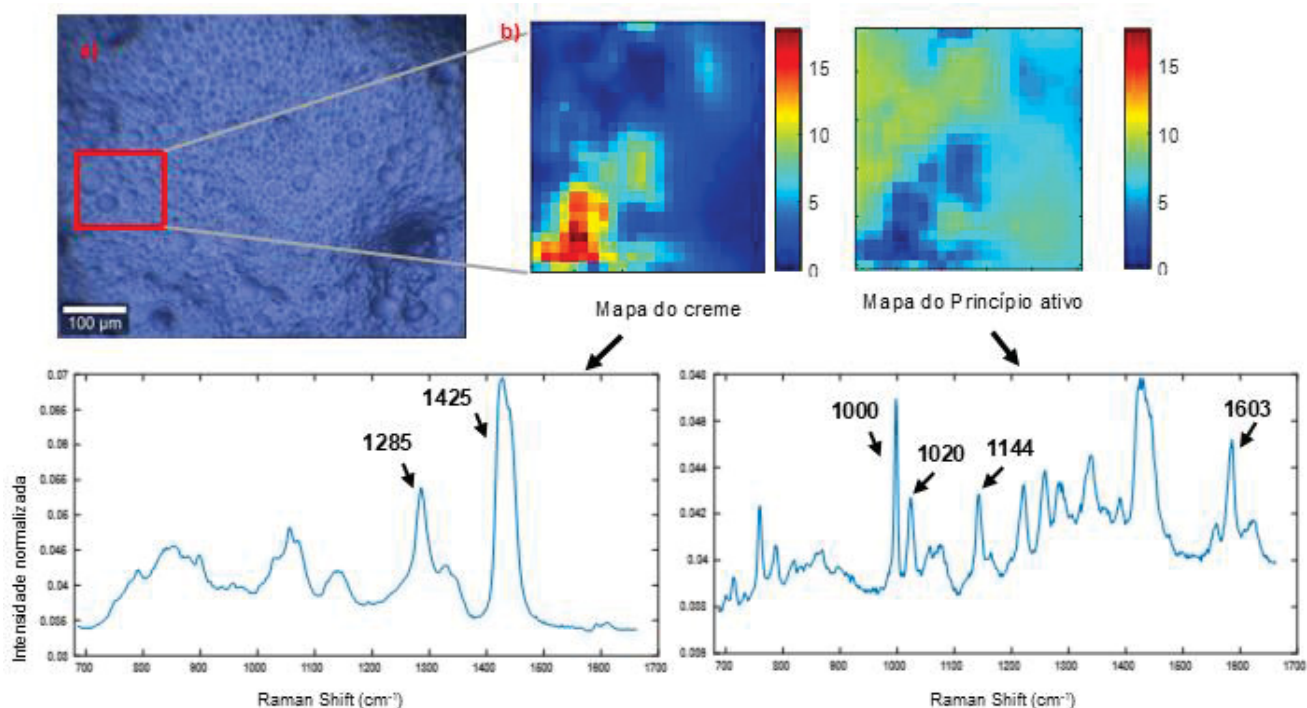
FIGURA 23 – ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS DO ENSAIO 2 EM 24 HORAS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO



FONTE: O Autor

De maneira análoga ao experimento 2, no ensaio 8, observou-se que a estrutura física da emulsão tende a se modificar devido à ação combinada da temperatura e do material condicionante metálico, o qual aumenta a transferência de calor (FIG. 24a). Embora a fase dispersa (óleo) seja visível, a fase contínua (água) sofreu uma leve evaporação. Apesar dessa mudança física, a estrutura química da emulsão foi preservada, conforme indicado pelos mapas e espectros recuperados pelo MCR-ALS (FIG. 24b) nas componentes 1 e 2, respectivamente, que mostram semelhança entre as bandas característicos do creme e do princípio ativo.

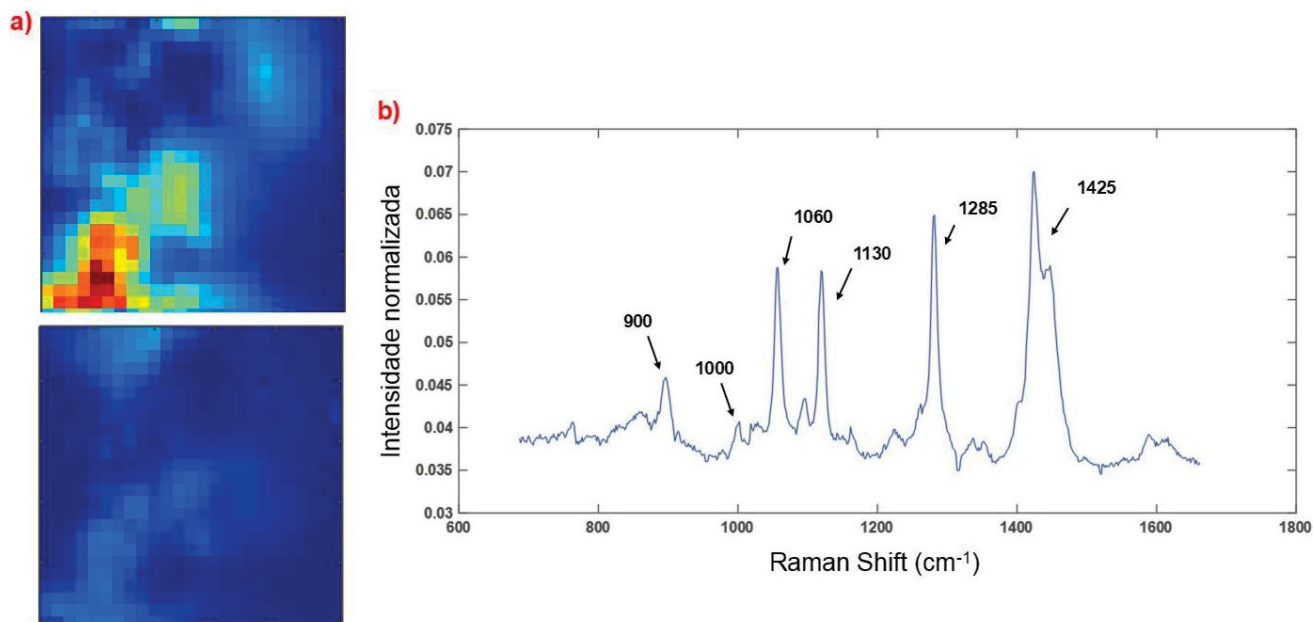
FIGURA 24– ANÁLISE DO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 24 HORAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS



FONTE: O Autor

No entanto, assim como no experimento 2, no experimento 8 observou-se uma possível oxidação do polissorbato, indicado pela presença das bandas em 900, 1060 e 1130 cm^{-1} (FIG. 25), no qual foi possível observar por meio do mapa recuperado pelo MCR-ALS em uma terceira componente que a localização do espectro contendo as bandas características dos subprodutos de oxidação (peróxido, cetona e alcanos ramificados), estão localizados na mesma região da fase dispersa (óleo), consequentemente, do espectro do creme.

FIGURA 25 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MAPAS RECUPERADOS PELO MCR-ALS PARA O CREME E PARA A OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO NO EXPERIMENTO 8 EM 24 HORAS (A) E (B) ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO



FONTE: O Autor

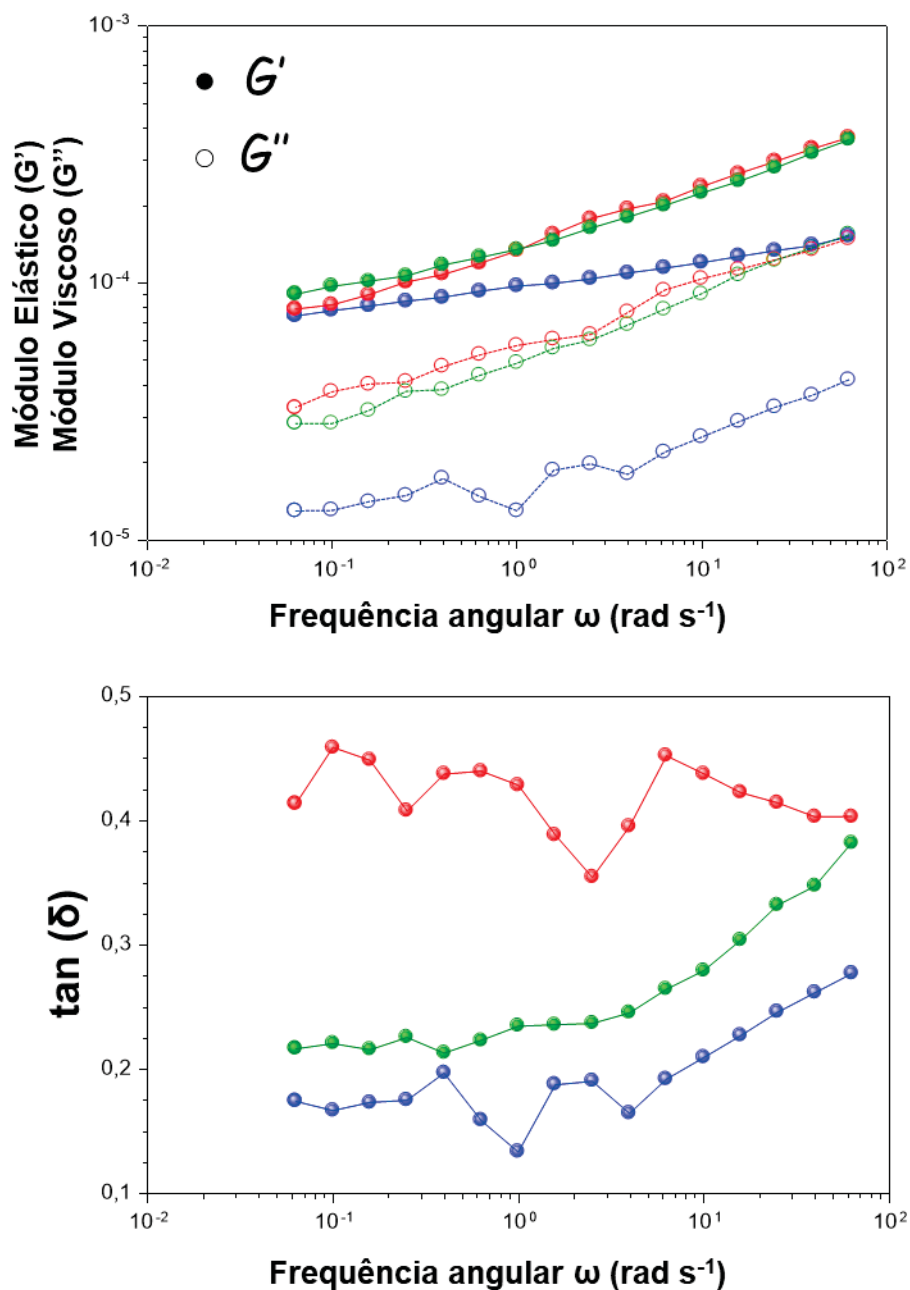
Para avaliar a estabilidade física da emulsão por medidas reológicas, primeiramente avaliou-se a determinação da região viscoelástica linear (LVER) da emulsão, em seguida foi utilizado o método de varredura de frequência, que fornece dados sobre a resposta dos módulos viscoelásticos da amostra em relação a um intervalo de frequência oscilatória, que pode ser interpretado como o comportamento viscoelástico em função do tempo de observação. Essa região é importante porque indica a quantidade de tensão de cisalhamento que a emulsão pode suportar antes de se desestabilizar (Mezger, 2014). Dois parâmetros-chave para este estudo são o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G''). Esses parâmetros são essenciais para entender como um material responde ao estresse ou à deformação. O parâmetro G' mede a elasticidade do material, representando a energia armazenada durante a deformação. O parâmetro G'' , por sua vez, mede o comportamento viscoso, representando a energia dissipada como calor durante a deformação, indicando a quantidade de energia perdida (Li & Zhang, 2015; Derakhshandeh *et al.*, 2018; Schramm, 2006; Pal, 2008).

A FIGURA 26 apresenta os dados das varreduras de frequência para as amostras dos ensaios 2, 8 e 10, que exibem um comportamento de gel característico de

cremes hidratantes (Xiao *et al.*, 2021). Ao longo da faixa de frequência medida, o módulo de armazenamento G' foi sempre maior que o módulo de perda G'' , sugerindo que as amostras exibiram um comportamento reológico elástico, similar a géis do tipo sólido. O valor de G' das emulsões também aumentou com a frequência, mostrando uma clara dependência (Shevtsova *et al.*, 2025).

Nota-se que a razão entre G'' e G' ($\tan \delta = G''/G'$) representa o estado de gel das amostras, e os valores de $\tan \delta$ na figura foram consistentemente menores que 1. Isso confirma que as emulsões exibem características predominantemente elásticas (Li & Zhang, 2015; Brummer, 2006; Li *et al.*, 2024).

FIGURA 26 – GRÁFICOS DAS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA NO TEMPO DE 24 HORAS PARA OS ENSAIOS: 2 (AZUL), 10 (VERDE) E 8 (VERMELHO) DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

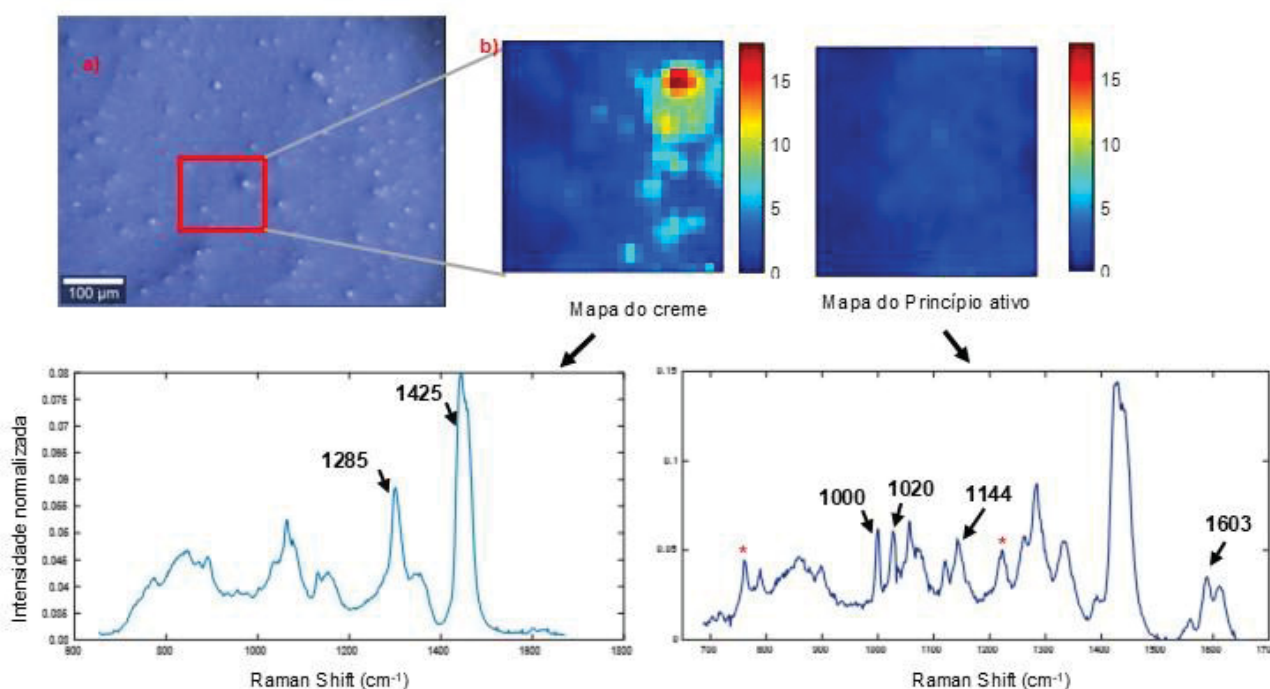


FONTE: O Autor

O segundo tempo avaliado no estudo acelerado da estabilidade de emulsão foi de 7 dias. A FIGURA 27 mostra que no experimento 2 os resultados em 7 dias foram semelhantes aos obtidos em 24 horas. No qual, ao se observar a imagem obtida no microscópio óptico (FIG. 27a), é possível identificar, uma mudança física na característica da emulsão. Além disso, pode-se inferir que não houve degradação total na

estrutura química da emulsão, uma vez que as bandas características do creme (1285 e 1425 cm^{-1}) e do princípio ativo (1000, 1020, 1144 e 1603 cm^{-1}) estão bem evidentes, sendo semelhantes aos espectros “puros” de cada substância (FIG. 27b).

FIGURA 27 – ANÁLISE DO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 7 DIAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS

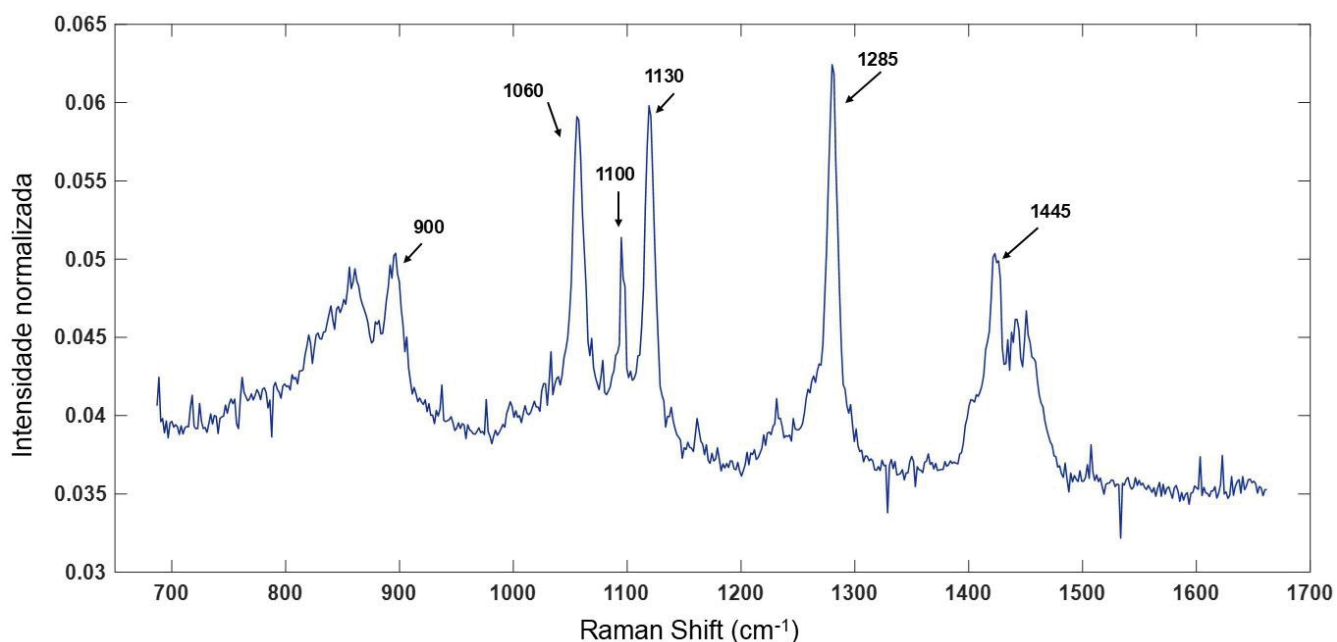


As bandas com (*) são característicos do PA e foram caracterizados na seção 4.1

FONTE: O Autor

Assim como no ensaio de 24 horas, em 7 dias (FIG. 28) foram observadas as mesmas bandas em 900, 1062 e 1130 cm^{-1} dos subprodutos (peróxidos, alcanos ramificados e cetona) da oxidação do polissorbató. Além disso, houve o aparecimento da banda em 1100 cm^{-1} característico de -O-CO de ésteres de ácido graxo. Este resultado corrobora a hipótese de que em 24 horas inicia-se a degradação oxidativa do polissorbató (resultando na formação de peróxido, alcanos e cetonas como subprodutos) e em 7 dias houve mais um processo de oxidação, gerando ésteres de ácido graxo como subproduto (Socrates, 2004; Dahotre *et al.*, 2018).

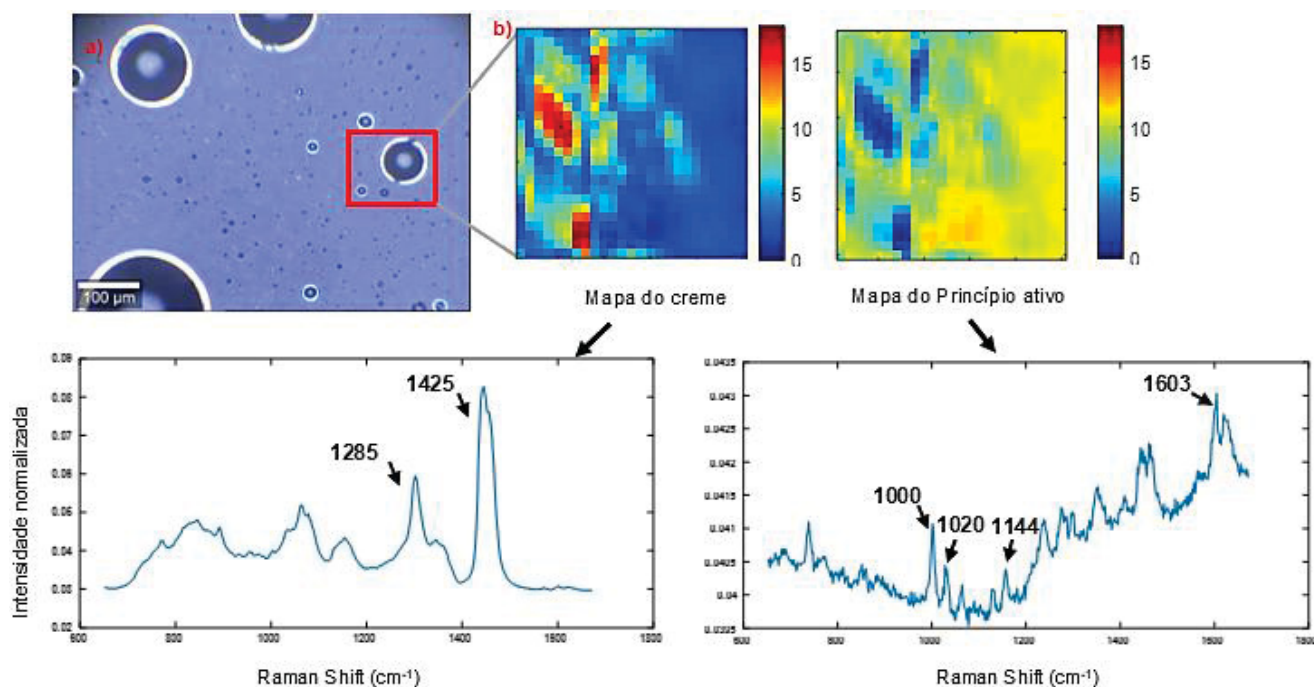
FIGURA 28 – ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS DA AMOSTRA DO ENSAIO 2 EM 7 DIAS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO



FONTE: O Autor

Em contraste ao ensaio 2, no experimento 10, a emulsão armazenada em condições semelhantes às do produto comercial mostrou-se estável durante o estudo de 7 dias. A FIGURA 29a mostra tanto a fase dispersa (óleo) quanto a fase contínua (água). Além disso, a emulsão não apresentou degradação de nenhum composto químico em sua estrutura, tendo seu perfil espectral recuperado pelo MCR-ALS bem semelhante ao espectro do creme e do princípio ativo. Os mapas de distribuição espacial são semelhantes à imagem obtida no microscópio óptico (FIG. 29b).

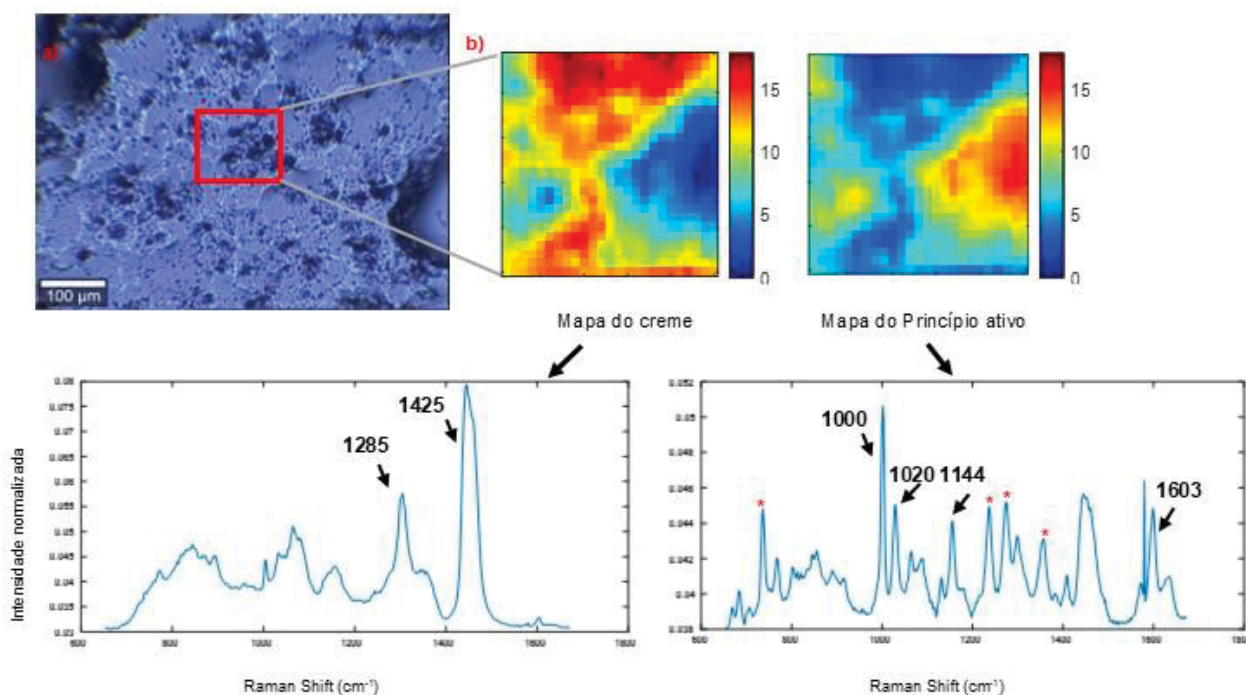
FIGURA 29 – ANÁLISE DO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 7 DIAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS



FONTE: O Autor

Para o experimento 8, o estudo em 7 dias demonstrou uma diferença significativa em relação ao estudo em 24 horas, principalmente na estrutura física da emulsão. A ação combinada da temperatura e do material condicionante metálico por tempo prolongado, acentuou o processo de evaporação da fase contínua (água) (FIG. 30a). Apesar dessa mudança física, a estrutura química do creme e do princípio ativo foi preservada, conforme indicado pelos espectros recuperados pelo MCR-ALS nas componentes 1 e 2, respectivamente, que mostram grande semelhança com os espectros “puros” tanto do creme quanto do princípio ativo (FIG. 30b). Vale ressaltar que mesmo o princípio ativo estando majoritariamente dissolvido na fase contínua (água), o processo de evaporação da água não alterou a estrutura química do princípio ativo.

FIGURA 30 – ANÁLISE DO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NO TEMPO DE 7 DIAS, SENDO: A) FOTO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) MAPAS E ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS

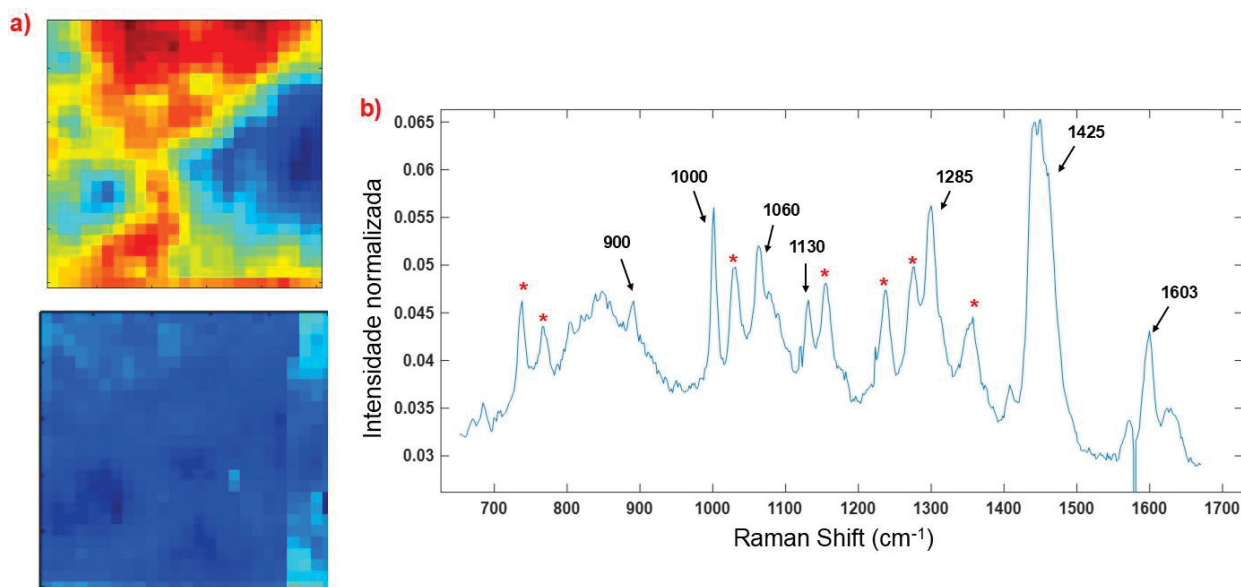


As bandas com * são característicos do PA e foram caracterizados na seção 4.1

FONTE: O Autor

Assim como em 24 horas, em 7 dias (FIG. 31) foram observadas as mesmas bandas em 900, 1062 e 1130 cm^{-1} dos subprodutos (peróxidos, alcanos ramificados e cetona) de uma possível oxidação do polissorbato. Além disso, devido a ação combinada de temperatura e o material condicionante metálico foi possível observar por meio do mapa recuperado pelo MCR-ALS em uma terceira componente que a localização do espectro contendo as bandas características dos subprodutos de oxidação, estão localizados em maior concentração na região da fase dispersa (óleo), mas também, é possível encontrá-los em toda emulsão.

FIGURA 31 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MAPAS RECUPERADOS PELO MCR-ALS PARA O CREME E PARA A OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO NA AMOSTRA DO ENSAIO 8 EM 7 DIAS (A) E (B) ESPECTRO RECUPERADO PELO MCR-ALS, INDICANDO POSSÍVEL OXIDAÇÃO DO POLISSORBATO



As bandas com (*) são características do PA e foram caracterizados na seção 4.1

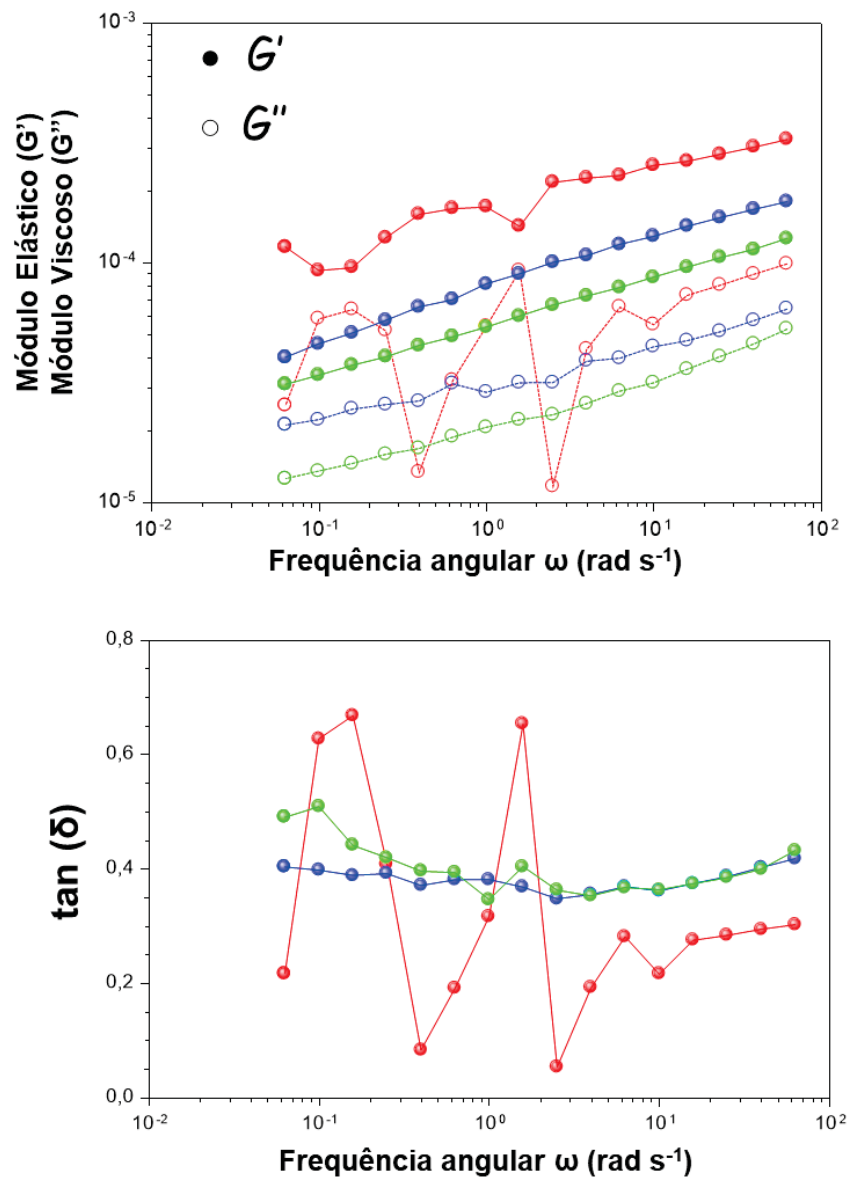
FONTE: O Autor

A FIGURA 32 apresenta os dados das varreduras de frequência para as amostras dos ensaios 2, 8 e 10, após um período de 7 dias. Mesmo com uma mudança visível na característica da emulsão do ensaio 2, ela conservou sua característica de gel, com o módulo G' sempre superior ao G'' . Esse comportamento reológico elástico, similar a géis do tipo sólido, é semelhante ao da emulsão do ensaio 10 (que não apresentou alteração aparente) e aos resultados das primeiras 24 horas de estudo (Shevtsova *et al.*, 2025).

No entanto, observa-se uma grande variação no módulo G'' e nos valores de $\tan \delta$ para o ensaio 8. Uma possível explicação para essa variação pode estar relacionada com a perda de água da emulsão, ocasionada pela combinação de alta temperatura e material condicionante metálico. Essa perda de água pode favorecer a coalescência das gotículas de óleo, alterando o comportamento reológico da amostra, isso pode nos dar indício que o experimento 8 já nos primeiros 7 dias de estudos demonstram o colapso da estabilidade da amostra (Ross-Murphy, 1992; Li & Zhang, 2015; Mezger, 2014).

Para avaliar as características das emulsões, a razão entre G'' e G' ($\tan \delta$) é utilizada para representar o estado de gel das amostras. Para os ensaios 2 e 10, os valores de $\tan \delta$ foram consistentemente menores que 1, o que confirma que as emulsões exibem características predominantemente elásticas. Em contraste, para o ensaio 8, os resultados também foram inferiores a 1, mas com uma grande variação de $\tan \delta$, indicando uma possível desestabilização do comportamento elástico do gel (Li & Zhang, 2015; Brummer, 2006; Li *et al.*, 2024).

FIGURA 32 – GRÁFICOS DAS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA NO TEMPO DE 7 DIAS PARA OS ENSAIOS: 2 (AZUL), 10 (VERDE) E 8 (VERMELHO) DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS



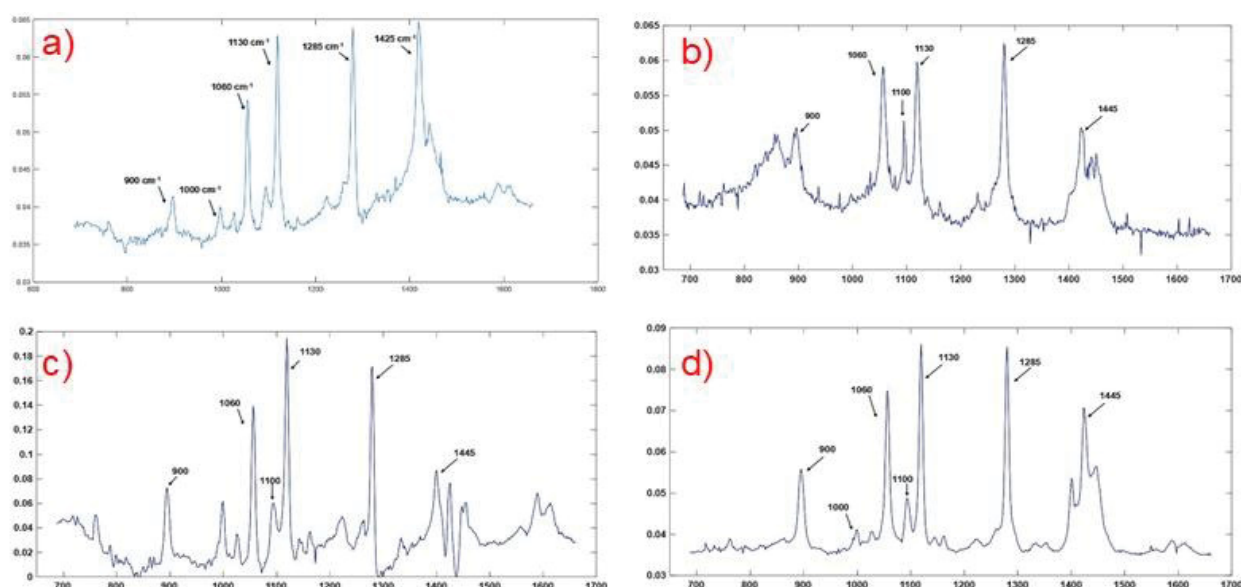
FONTE: O Autor

Após o estudo em 7 dias, em que já se observa a oxidação do polissorbato, com formação de subprodutos e mudanças na estrutura física (reológica) em alguns pontos do estudo acelerado, os próximos tempos avaliados foram de 15 e 30 dias.

Para o ensaio 2 nenhuma mudança espectral foi observada nos estudos de 15 e 30 dias, uma vez que os espectros recuperados pelo MCR-ALS tanto para o creme quanto para o princípio ativo foram semelhantes aos espectros previamente caracterizados. No que concerne a formação dos subprodutos da oxidação do polissorbato, nenhum outro subproduto foi formado, sendo que as mesmas bandas dos subprodutos já citados anteriormente foram novamente identificadas e nenhuma outra banda proveniente de uma possível oxidação foi observada.

Essa semelhança entre os tempos pode dar um indício que em 7 dias têm-se uma possível oxidação completa do polissorbato nessas condições experimentais e que todos os subprodutos já foram formados (Socrates, 2004; Dahotre *et al.*, 2018). Esta semelhança pode ser observada de maneira mais clara na FIGURA 33 que ilustra um compilado dos espectros para o ensaio 2 em todos os tempos estudados indicando a formação dos subprodutos (peróxidos (900), ésteres de ácido graxo (1100), alcanos ramificados (1062) e cetona (1130)) da oxidação do polissorbato.

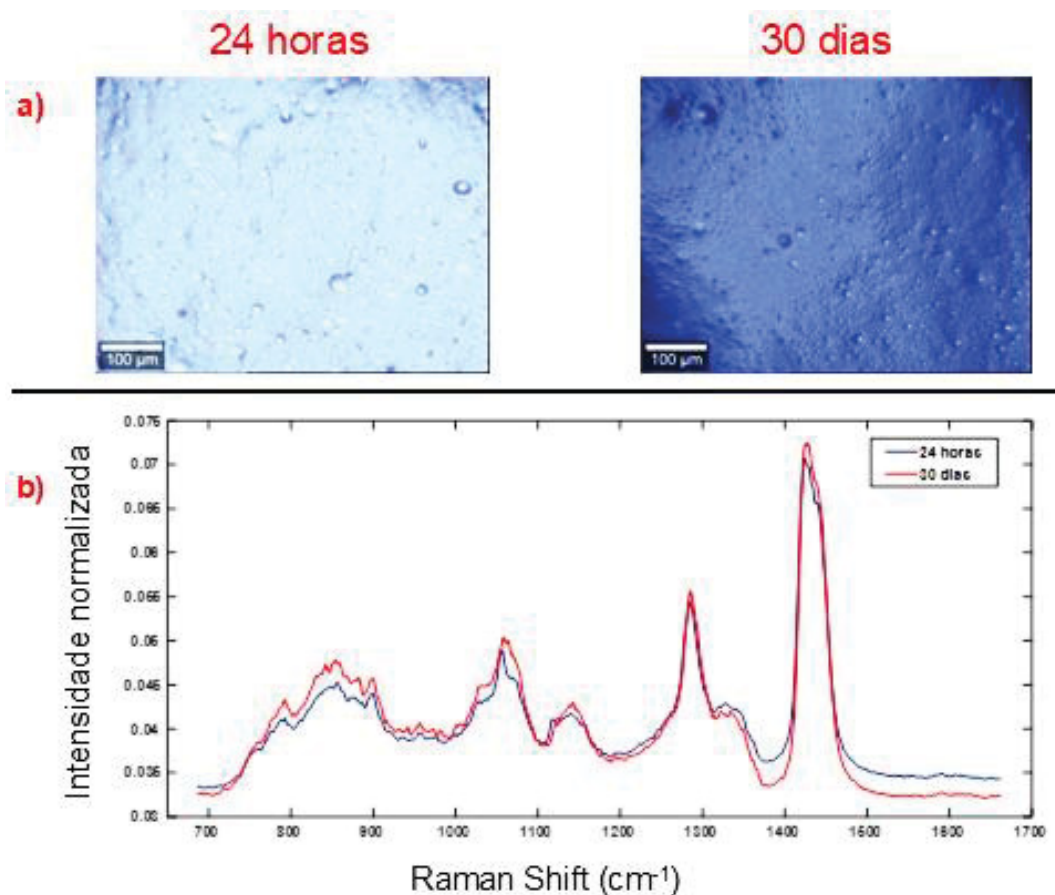
FIGURA 33 – COMPILADO DOS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS POSSIVELMENTE OXIDADOS NO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA A) 24 HORAS, B) 7 DIAS, C) 15 DIAS E D) 30 DIAS



FONTE: O Autor

De modo a corroborar a estabilidade química do creme hidratante após 30 dias, a FIGURA 34 ilustra a comparação para o ensaio 2 entre os espectros recuperados pelo MCR-ALS para o creme no período de 24 horas e 30 dias, no qual pode-se observar que apesar de uma possível oxidação do surfactante (polisorbato) e uma piora visível do ponto de vista do microscópio óptico, a estrutura química do creme permaneceu inalterada.

FIGURA 34 – COMPARAÇÃO DO ENSAIO 2 DO PLANEJAMENTO ENTRE OS TEMPOS 24 HORAS E 30 DIAS DE ESTUDO PARA A) ESTRUTURA FÍSICA OBSERVADA PELO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS DO CREME HIDRATANTE



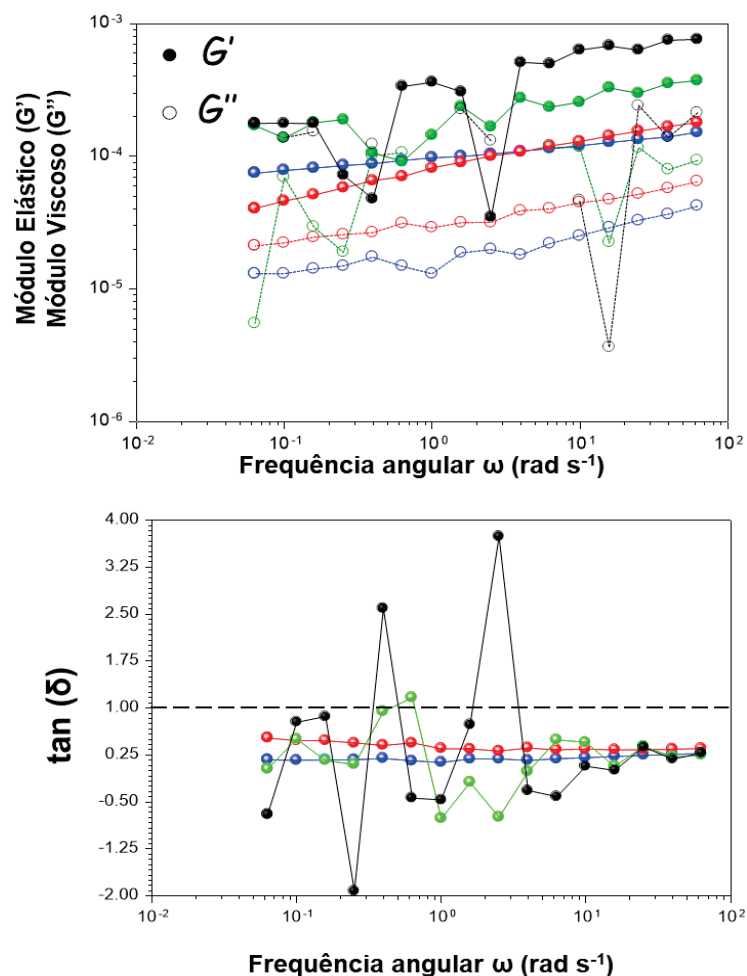
FONTE: O Autor

A análise visual por microscopia confocal revela que a emulsão do experimento 2 sofreu uma alteração entre o tempo inicial (24 horas) e o final (30 dias). Essa diferença é ainda mais evidente na FIGURA 35, que ilustra as curvas de frequência e $\tan \delta$ para todos os tempos avaliados. Nos tempos de 24 horas e 7 dias, observa-se que

o módulo de armazenamento (G') foi consistentemente maior que o módulo de perda (G'') e que os valores de $\tan \delta$ foram sistematicamente menores que 1, sem grandes dispersões nas medições, o que sugere um comportamento reológico elástico e estável, similar a géis do tipo sólido (Shevtsova *et al.*, 2025).

No entanto, nos tempos de 15 e 30 dias, as medições já demonstram instabilidade, com flutuações que se tornam mais extremas no último período. Essas flutuações sugerem que a estrutura interna da amostra não é mais homogênea ou estável, e que o reômetro está medindo uma mistura de áreas com diferentes propriedades. Isso pode ser um indício de degradação significativa ou de uma mudança estrutural, como a separação de fases (coalescência e formação de agregados) ou a cristalização de algum componente (Macosko, 1994; Brummer, 2006).

FIGURA 35 – COMPARAÇÃO ENTRE AS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA PARA O PONTO 2 EM: 24 HORAS (AZUL), 7 DIAS (VERMELHO), 15 DIAS (VERDE) E 30 DIAS (PRETO)

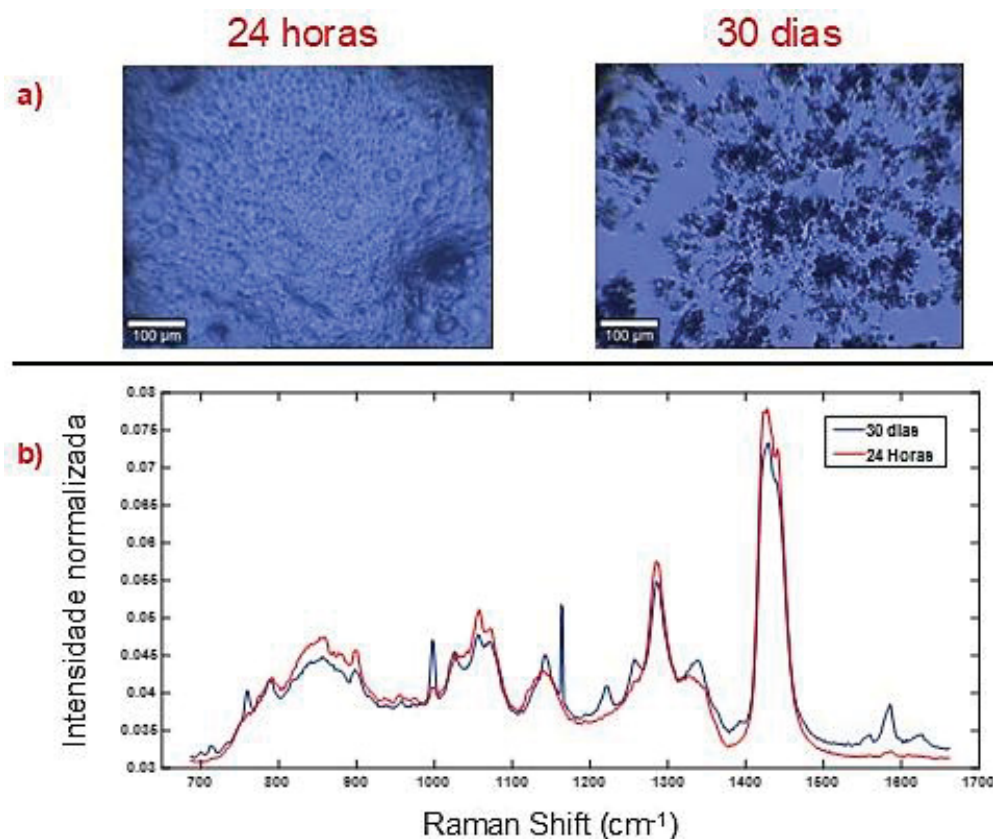


FONTE: O Autor

De maneira análoga ao ensaio 2, o ensaio 8 não apresentou nenhuma mudança química em sua estrutura nos estudos de 15 e 30 dias, uma vez que os espectros recuperados pelo MCR-ALS tanto para o creme quanto para o princípio ativo foram semelhantes aos espectros previamente caracterizados. No entanto, vale mencionar que em face da evaporação da fase contínua (água) a estrutura física da emulsão após 15 dias já está completamente comprometida e a reologia não é mais possível ser realizada a partir deste tempo de estudo.

A FIGURA 36 ilustra a comparação para o ensaio 8 entre os espectros recuperados pelo MCR-ALS para o creme no período de 24 horas e 30 dias, no qual pode-se observar que apesar da estrutura física estar completamente comprometida e de uma possível oxidação do surfactante (polisorbato), a estrutura química do creme apresentou pequenas alterações.

FIGURA 36 – COMPARAÇÃO DO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO ENTRE OS TEMPOS 24 HORAS E 30 DIAS DE ESTUDO PARA A) ESTRUTURA FÍSICA OBSERVADA PELO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS DO CREME HIDRATANTE

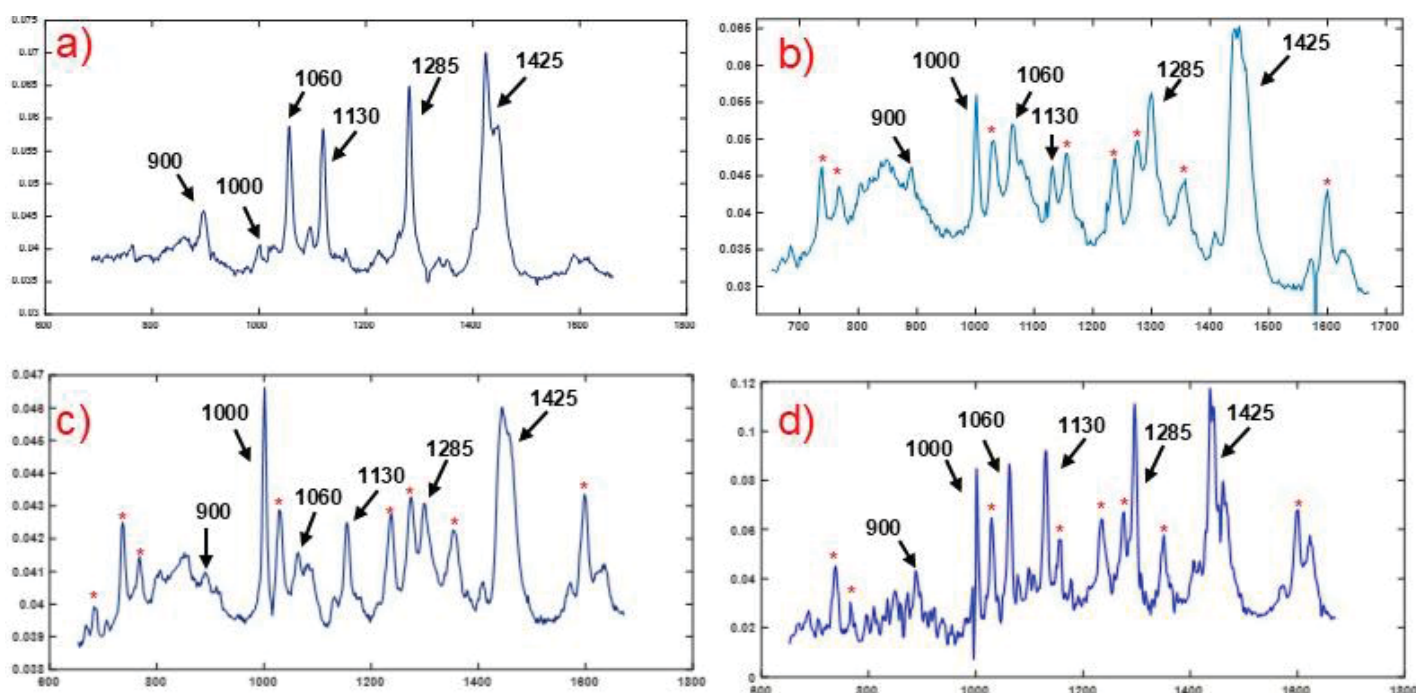


FONTE: O Autor

Com relação a formação dos subprodutos da oxidação do polisorbato, nenhum outro subproduto foi formado nos tempos de 15 e 30 dias, sendo que as mesmas bandas dos subprodutos já citados anteriormente (peróxidos, alcanos ramificados e cetona) foram novamente identificados e nenhuma outra banda proveniente de uma possível oxidação foi observado como no ensaio 2. Esta “estabilidade” da oxidação pode nos dar um indício que mesmo em uma condição mais extrema como no ensaio 8, a oxidação do polissorbato não foi completa, conforme observado no ensaio 2 no qual houve mais subprodutos sendo formados (Socrates, 2004; Dahotre *et al.*, 2018).

O perfil de oxidação pode ser observado de maneira mais clara na FIGURA 37 que ilustra um compilado dos espectros para o ensaio 8 em todos os tempos estudados indicando a formação dos subprodutos (peróxidos (900), alcanos ramificados (1062) e cetona (1130)) da oxidação do polissorbato.

FIGURA 37 – COMPILADO DOS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS POSSIVELMENTE OXIDADOS NO ENSAIO 8 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA A) 24 HORAS, B) 7 DIAS, C) 15 DIAS E D) 30 DIAS

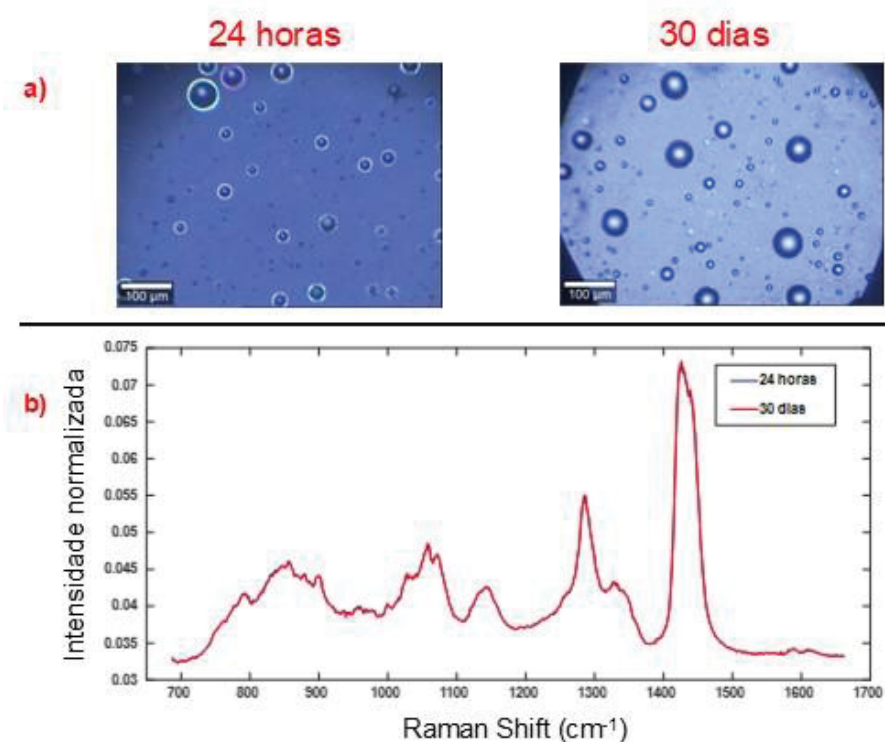


As bandas com (*) são características do PA e foram caracterizados na seção 4.1

FONTE: O Autor

Por fim, no ensaio 10, que reflete condições similares às do produto comercialmente vendido, observa-se um comportamento mais estável da emulsão em comparação aos pontos com condições extremas de análise (ensaio 2 e 8). Posto que, nenhuma mudança espectral foi observada nos estudos de 15 e 30 dias, uma vez que os espectros recuperados pelo MCR-ALS tanto para o creme quanto para o princípio ativo foram semelhantes aos espectros previamente caracterizados e conforme ilustrado na FIGURA 38 é possível observar que a estrutura da emulsão permaneceu inalterada, tendo as fases dispersa (óleo) e contínua (água) muito evidentes. Outro ponto a destacar é que nenhuma possível oxidação do polissorbato foi observado até o tempo 15 dias, onde um primeiro indício de uma possível oxidação foi observado com o aparecimento da banda em 1062 cm^{-1} proveniente do subproduto alceno ramificado. No entanto em 30 dias, observou-se uma completa oxidação do polissorbato, indicado pelos subprodutos formados (peróxidos (900), ésteres de ácido graxo (1100), alcanos ramificados (1062) e cetona (1130)) (Socrates, 2004; Dahotre *et al.*, 2018).

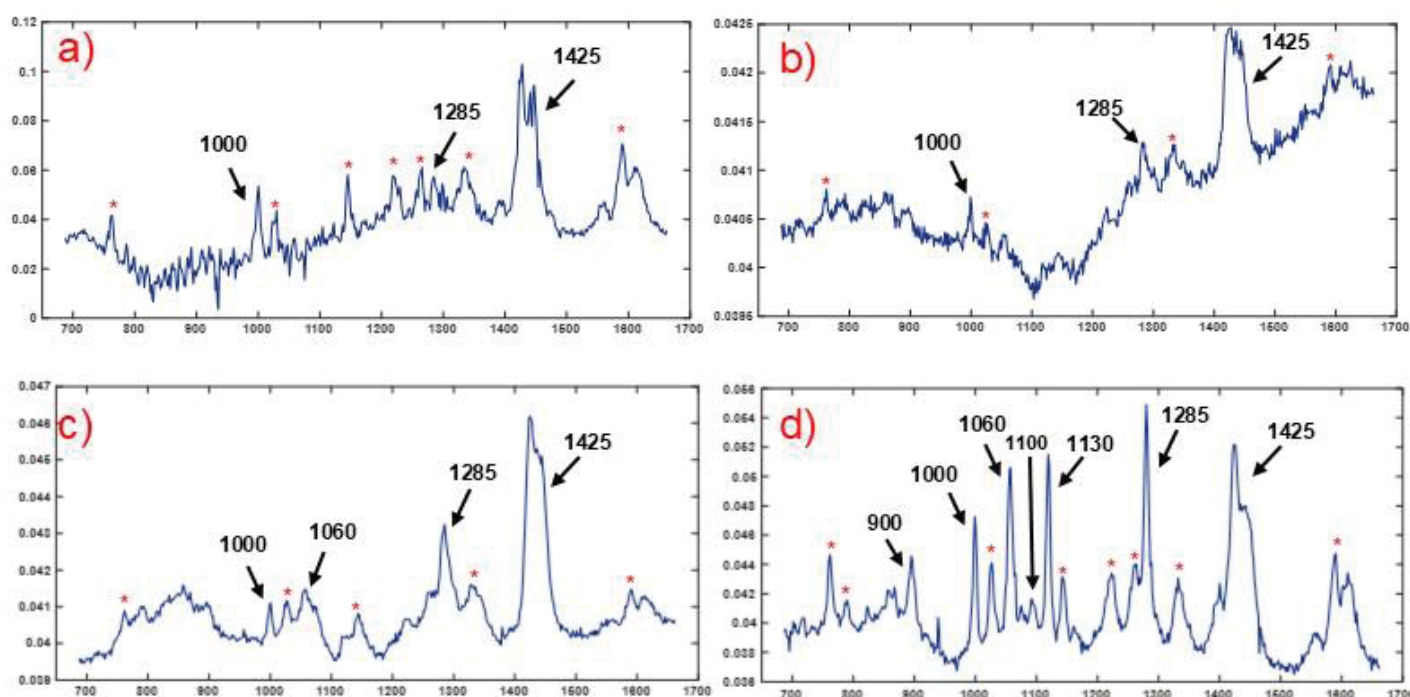
FIGURA 38 – COMPARAÇÃO DO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO ENTRE OS TEMPOS 24 HORAS E 30 DIAS DE ESTUDO PARA A) ESTRUTURA FÍSICA OBSERVADA PELO MICROSCÓPIO ÓPTICO E B) COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS DO CREME HIDRATANTE



FONTE: O Autor

No que diz respeito ao perfil de oxidação do polissorbato e a estabilidade da emulsão, observa-se que as condições similares às do produto comercialmente vendido é mais estável em comparação aos demais ensaios do planejamento de experimentos. No entanto, mesmo em condições mais estáveis o primeiro indício de uma possível oxidação do polissorbato se deu em apenas 15 dias de estudo. Isso pode servir de alerta uma vez que os produtos normalmente comercializados, empregam um prazo de validade entre 12 a 30 meses. Sendo assim, o perfil de oxidação pode ser observado de maneira mais clara na FIGURA 39 que ilustra um compilado dos espectros para o ensaio 10 em todos os tempos estudados indicando a formação dos subprodutos (peróxidos (900), ésteres de ácido graxo (1100), alcanos ramificados (1062) e cetona (1130)) da oxidação do polissorbato.

FIGURA 39 – COMPILADO DOS ESPECTROS RECUPERADOS PELO MCR-ALS POSSIVELMENTE OXIDADOS NO ENSAIO 10 DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA A) 24 HORAS, B) 7 DIAS, C) 15 DIAS E D) 30 DIAS



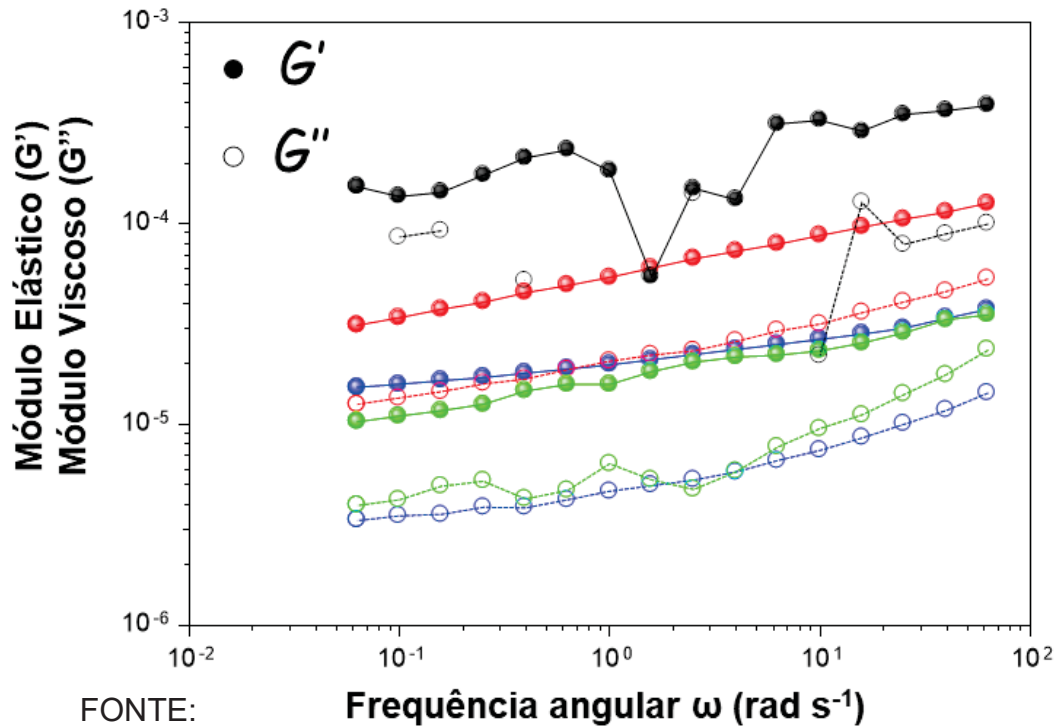
FORNE: O Autor

Apesar de o experimento 10 indicar ser a condição mais estável quimicamente, a análise reológica revela que, em até 15 dias de estudo (período no qual não havia ainda oxidação completa do polissorbato), a emulsão preserva sua característica elástica e estável, similar a géis do tipo sólido. Essa estabilidade é confirmada pelo módulo

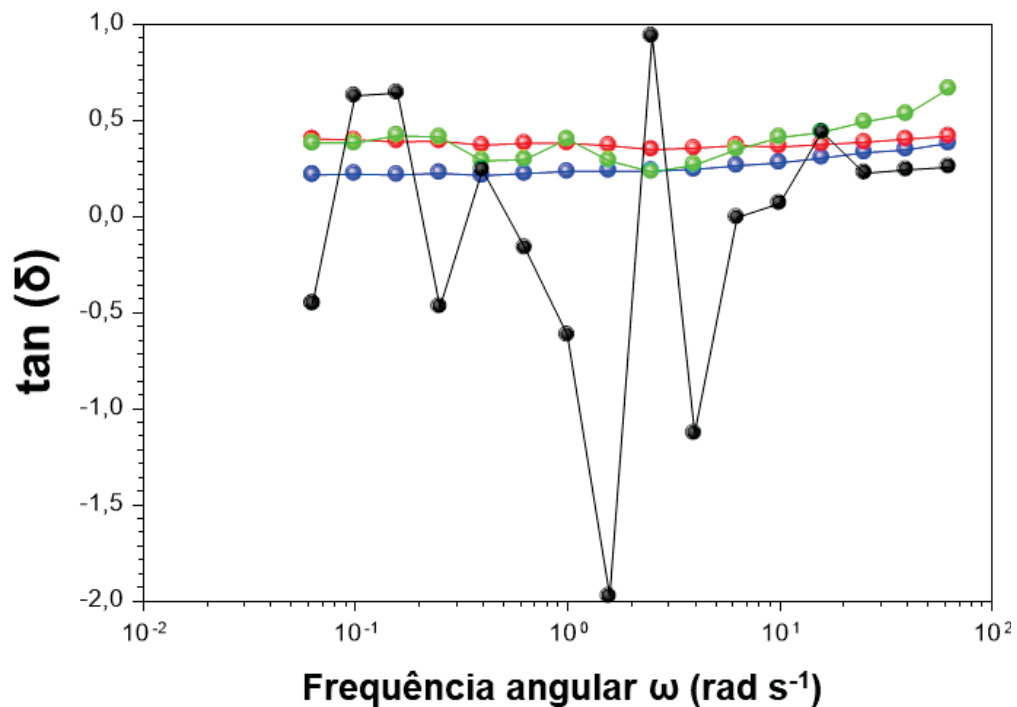
de armazenamento (G') ser consistentemente maior que o módulo de perda (G''), e pelos valores de $\tan \delta$ serem sistematicamente menores que 1, sem grandes dispersões nas medições (Shevtsova *et al.*, 2025).

Contudo, ao correlacionar o surgimento de bandas de oxidação completa do polissorbato com a reologia no período de 30 dias, nota-se que as medições já demonstram instabilidade, com flutuações que se tornam mais extremas no último período. Isso ocorre mesmo em um sistema visivelmente "estável", como observado na FIGURA 40, onde a fase contínua (água) e dispersa (óleo) estão muito evidentes. A dependência apenas do aspecto visível pode levar a uma falsa sensação de estabilidade da emulsão. As análises químicas sugerem uma oxidação do polissorbato (surfactante), e as flutuações na análise reológica indicam que a estrutura interna da amostra não é mais homogênea ou estável, mas sim uma mistura de áreas com diferentes propriedades. Isso é um indício de degradação significativa ou de uma mudança estrutural, como a separação de fases (coalescência e formação de agregados) ou a cristalização de algum componente (Macosko, 1994; Brummer, 2006).

FIGURA 40 – COMPARAÇÃO ENTRE AS VARREDURAS DE FREQUÊNCIA PARA O PONTO 10 EM: 24 HORAS (AZUL), 7 DIAS (VERMELHO), 15 DIAS (VERDE) E 30 DIAS (PRETO)



FONTE:



Fonte: O Autor

4.5 CONCLUSÃO

Este capítulo propõe um novo método analítico para avaliar a estabilidade de emulsão de forma multivariada considerando o aspecto químico, associando o imageamento hiperespectral com a espectroscopia Raman e quimiometria (MCR-ALS). Já o aspecto físico foi avaliado através de método reológico com dados de varredura de amplitude.

Após 30 dias de estudo, conclui-se que todos os pontos avaliados, em termos de estabilidade física, apresentaram flutuações nas medições, indicando uma desestabilização generalizada da emulsão. No entanto, vale salientar que as oxidações observadas foram nas condições experimentais preconizadas pelo autor e que não foi adicionado nenhum tipo de conservante na formulação.

Em termos da estabilidade química, obteve-se um cenário no qual todas as emulsões conservaram o aspecto do creme e do princípio ativo, quando se compara o espectro recuperado pelo MCR-ALS. Estes espectros apresentaram um sinal bastante próximo dos espectros previamente caracterizados (creme hidratante e princípio ativo). Em contrapartida, todas as emulsões, em diferentes tempos de estudo, apresentaram algum tipo de oxidação do polissorbato, seja parcial ou total.

Observou-se que, quando a amostra é submetida a condições extremas, como mudanças bruscas de temperatura ou acondicionada em um meio metálico (por exemplo, um container metálico para exportação), pode ocorrer uma desestabilização tanto química quanto física da emulsão, já nas primeiras 24 horas de armazenamento. Salientando que apesar de um sistema complexo, é um sistema bastante sensível as flutuações de temperatura e condições de armazenamento. Em contrapartida, quando a amostra foi submetida condições de armazenamento comumente encontradas no ambiente comercial: temperatura ambiente de 25°C, luz branca e embalagem de material plástico, a emulsão tende a ficar mais tempo estabilizada, sendo que apenas após 15 dias de exposição notou-se a oxidação parcial do surfactante (polissorbato) na formulação do creme hidratante.

Portanto, esses resultados podem servir como guia para a indústria, auxiliando no planejamento adequado de conservação do produto no mercado local e na exportação, onde o transporte pode levar meses até o destino final.

5. SEÇÃO III - UMA COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MODELOS DE SEGUNDA ORDEM PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SEIS CONSERVANTES COM SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL SEVERA UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (HPLC-DAD)

5.1 INTRODUÇÃO

O uso de conservantes é considerado imprescindível nos processos industriais, visto que grande parte dos produtos industrializados os inclui em sua formulação para garantir a integridade e a segurança do produto. Neste contexto, a indústria cosmética merece destaque, pois produtos como cremes, soluções, emulsões e suspensões são particularmente suscetíveis à contaminação por conterem uma alta atividade água (Aa) e outros compostos. Por essa razão, a adição de conservantes é obrigatória, pois sua ausência pode comprometer a integridade do produto e levar à perda de suas propriedades essenciais (Poddębniak, 2024; Rathee *et al.*, 2023).

Posto isto, diversas classes de conservantes são amplamente empregadas em produtos cosméticos, como parabenos, liberadores de formaldeído, isotiazolinonas, fenoxietanol, triclosan e ácidos orgânicos. Dentre as classes de bactericidas e antifúngicos, o triclosan e os parabenos — incluindo metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno — são os mais comuns, devido às suas eficazes propriedades antifúngicas e ao baixo custo. Além disso, para os parabenos sua atividade antimicrobiana é potencializada com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, mas a solubilidade em água também diminui, o que pode representar um inconveniente para a incorporação desses compostos em formulações cosméticas (Alvarez-Rivera *et al.*, 2018). Por esse motivo, o metilparabeno (MPB) é um dos parabenos mais utilizados em cosméticos, isoladamente ou em combinação com outros conservantes.

Embora a classe de parabenos seja amplamente empregada em formulações cosméticas, diversos estudos relacionaram estes compostos a efeitos adversos, como câncer de mama, indução de estresse oxidativo em espermatozoides humanos e comprometimento da função tireoidiana (Darbre, *et al.*, 2004; Charles & Darbre, 2013; Samarasinghe *et al.*, 2018; Matwiejczuk *et al.*, 2020; Aker *et al.*, 2016). Portanto, desde 2014 o Regulamento da UE n.º 358/2014 (UE, 2014) proíbe o uso de algumas classes de parabenos em formulações cosméticas, entre eles o isopropil, isobutil, pentil e

benzilparabenos. Para os demais parabenos, a concentração máxima estabelecida é de 0,4% m m⁻¹ caso um único parabeno componha a formulação, e de 0,8% m m⁻¹ para composições com mais de um tipo de parabeno.

Já para o Triclosan a concentração máxima permitida em cosméticos é de 0,3% m m⁻¹ no Brasil e na União Europeia (ANVISA, 2012; UE, 2014). No entanto, devido a sua alta toxicidade e efeitos adversos, como potencial desregulador endócrino, resistência bacteriana, alergia e irritação em peles sensíveis (Dann & Hontela, 2011; Yazdankhah *et al.*, 2006; Calafat *et al.*, 2008), a sua aplicação na indústria caiu drasticamente tendo inclusive seu uso proibido por agências como a FDA (FDA, 2016).

Diante dos efeitos adversos dos conservantes tradicionais, a indústria cosmética tem buscado ativamente por alternativas seguras e eficazes para garantir a saúde e bem-estar do consumidor. Neste contexto, o Fenoxietanol tem se destacado como um conservante alternativo devido à sua toxicidade relativamente baixa (Darbre *et al.*, 2004; Charles & Darbre, 2013). Contudo, estudos sugerem que altas concentrações desse composto podem causar irritação cutânea (Scognamiglio *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2007), o que levou o Regulamento da UE n.º 1223/2009 a limitar sua concentração máxima a 1,0% m m⁻¹ em produtos finais.

Sendo assim, para garantir o cumprimento das regulamentações e garantir a saúde dos consumidores, metodologias analíticas adequadas para identificar e quantificar conservantes em cosméticos são fundamentais, fato que pode ser dificultado pela alta complexidade e variabilidade das formulações cosméticas comerciais (Alvarez-Rivera *et al.*, 2018).

Na literatura existem diversas metodologias analíticas para a determinação de conservantes em amostras cosméticas. Geralmente por se tratar de matrizes complexas, e por consequência ter um grande número de interferentes, as técnicas analíticas baseadas em separação de compostos são comumente empregadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC), acopladas a diferentes analisadores, como analisadores de Ultravioleta-Visível (UV), Arranjo de diodos (DAD), Fluorescência (FLU) e espectrometria de massas (MS) (Xue *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Mirales *et al.*, 2016; Aoyama *et al.*, 2014; Alvarez-Rivera *et al.*, 2014; Abad-Gil *et al.*, 2021).

No entanto, devida à complexidade da matriz, etapas laboriosas de preparo de amostras são necessárias para uma análise quantitativa bem-sucedida de analitos-

alvo antes da análise cromatográfica. Esses procedimentos dependem fortemente dos tipos de matrizes (emulsão, creme, pó, gel, máscara facial, etc.), o que limita consideravelmente a aplicabilidade do método analítico a diversas matrizes. Dentre os métodos de preparo de amostras comumente aplicados a cosméticos, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE) (Cabaleiro *et al.*, 2014), a extração em fase sólida (SPE) (Martins *et al.*, 2011) e a extração com fluido supercrítico (SFE) (Piao *et al.*, 2014).

Contudo, os métodos tradicionais de preparo de amostras supracitados são notavelmente demorados e trabalhosos, com uso intensivo de solventes orgânicos (não alinhado a química verde), e que pode acarretar também na perda de parte dos analitos. Esses procedimentos, muitas vezes combinados com a complexidade das fases móveis e os longos tempos de eluição necessários para a separação cromatográfica, dificultam a análise e aumentam os custos e tempo do método analítico. Em particular, a análise por HPLC enfrenta desafios significativos, pois a separação completa de analitos é muitas vezes inatingível e a coeluição com outros aditivos é muito comum. Dessa forma, torna-se essencial desenvolver um método rápido e ecologicamente correto para a determinação simultânea de conservantes em cosméticos. (Goicoechea *et al.*, 2011).

Devido a esta problemática, o desenvolvimento de métodos alternativos baseados em calibração multivariada de segunda ordem para o tratamento de dados multimodos (“*Multi-way*”) de cromatografia hifenizada vem ganhando destaque (Long *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2018; Mortera *et al.*, 2018; Anzardi *et al.*, 2021; Monzón *et al.*, 2018), pois esta estratégia possibilita separar matematicamente os componentes químicos na matriz, mesmo na presença de interferentes desconhecidos, denominado “vantagem de segunda ordem”.

Para o tratamento de dados cromatográficos de ordem superior, diversos algoritmos de calibração, que proporcionam as vantagens de segunda ordem, podem ser empregados. Os algoritmos comumente utilizados são a análise fatorial paralela (PARAFAC) (Bro, 1997), a resolução de curvas multivariada por mínimos quadrados alternados (MCR-ALS) (Jaumot, 2015), decomposição trilinear alternada (ATLD) (Wu *et al.*, 1998) e mínimos quadrados parciais desdobrados e bilinearização residual (U-PLS/RBL) (Olivieri, 2005). Vale ressaltar que cada algoritmo de calibração de segunda ordem possui suas próprias características. Por exemplo, os algoritmos PARAFAC e

ATLD são baseados na decomposição trilinear dos dados (TLD), os quais são frequentemente utilizados para processar dados trilineares. Já o MCR-ALS é uma decomposição bilinear, muito conhecida por ser considerada “*Soft-Modelling*”. E por fim o U-PLS/RBL diferentemente dos algoritmos supracitados, não é baseada em recuperação de sinal analítico, mas é capaz de lidar com informações de calibração quando apenas certas concentrações do analito ou propriedades de referência são conhecidas, como é habitual em modelos PLS (Brown *et al.*, 2020).

No presente estudo, três grupos de algoritmos quimiométricos com vantagem de segunda ordem foram aplicados para analisar dados cromatográficos de ordem superior (HPLC-DAD). Os algoritmos empregados foram os trilineares (PARAFAC), os bilineares (MCR-ALS) e os de regressão de variável latente (U-PLS/RBL). O objetivo principal foi desenvolver uma metodologia analítica rápida, confiável e simultânea para a determinação de seis conservantes amplamente empregados em produtos cosméticos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno, fenoxietanol e triclosan). Além disso, o procedimento geral de modelagem e as características de cada um desses modelos foram discutidos e comparados.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para a determinação de seis conservantes em diferentes matrizes cosméticas comerciais utilizando a cromatografia em fase líquida com arranjo de diodos (HPLC-DAD) e métodos quimiométricos de ordem superior (MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL).

5.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e comparar a performance de modelos quimiométricos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL para a quantificação de conservantes em diferentes matrizes complexas de cosméticos.
- Comparar os resultados obtidos pelo método proposto, aos resultados obtidos pelo método de referência, ou seja, a cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

- Comparar a performance dos modelos quimiométricos desenvolvidos em prever novas concentrações dos seis conservantes em amostras cosméticas diferentes daquelas utilizadas durante a etapa de calibração e construção dos modelos quimiométricos.

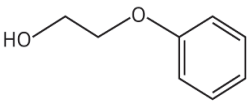
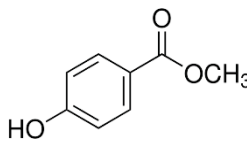
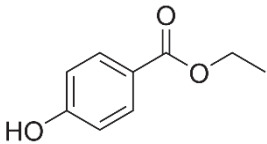
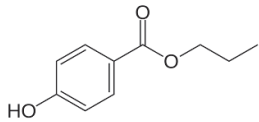
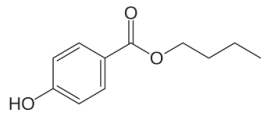
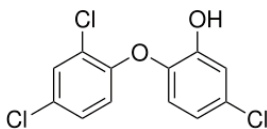
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Padrões de fenoxietanol (POE), metilparabeno (MPB), etilparabeno (EPB), propilparabeno (PPB), butilparabeno (BPB) e triclosan (TCS) < 99,9%, foram adquiridos via Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) e suas características físico-químicas podem ser observadas na TABELA 9. O metanol e a acetonitrila de grau HPLC, foram fornecidos pela Sigma-Aldrich®. Todos os demais reagentes utilizados apresentaram grau analítico. As soluções padrão foram preparadas diluindo as soluções estoque com água ultrapura (18,2 MΩ cm; 25 °C) obtida por meio de um sistema de purificação UV Millipore Simplicity®.

Soluções estoque individuais de cada analito foram preparadas em acetonitrila na concentração de 100 µg mL⁻¹ e armazenadas a 4 °C em refrigerador.

TABELA 9 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS DESTE ESTUDO

Abreviação	Fórmula estrutural	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em H ₂ O a 25°C (mg L ⁻¹)	Log K _{O/W}	pKa
POE		138,16	2700	1,16	9,80
MPB		152,15	2500	1,96	8,40
EPB		166,18	885	2,47	8,34
PPB		180,20	500	3,04	8,50
BPB		194,23	207	3,57	8,47
TCS		289,54	10	4,76	7,90

MPB: Metilparabeno; EPB: Etilparabeno; PPB: Propilparabeno; BPB: Butilparabeno; POE: Fenoxietanol; TCS: Triclosan
(Cárdenas *et al.*, 2015); (Samsøe-Petersen *et al.*, 2003); (Hafeez *et al.*, 2013)

5.3.2 AMOSTRAGEM E PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Foram adquiridas 16 amostras de cosméticos comerciais de diferentes classes (incluindo emulsões, cremes, pós, géis, enxaguantes bucais, esfoliantes corporais e sabonetes líquidos) em um comércio local especializado (Curitiba, Brasil).

Para a extração dos conservantes em amostras sólidas e emulsões, pesaram-se 0,3 g de amostra em tubos de centrífuga de 15 mL, aos quais foram adicionados 5 mL de solução extratora (MeOH:H₂O 60:40 v v⁻¹). A mistura foi submetida a banho de ultrassom por 30 minutos e, posteriormente, centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado através de membranas de acetato de celulose de

0,22 μm (Gao & Legido-Quigley, 2011). Para as amostras líquidas, procedeu-se com a diluição direta em solução aquosa, seguida da etapa de filtração nas mesmas condições.

5.3.3 AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO EXTERNA

Para estabelecer um modelo de calibração baseado no método de segunda ordem, um conjunto de calibração contendo 16 amostras foi preparado a partir da mistura de alíquotas das soluções estoque dos conservantes estudados e diluídas em água ultrapura. As amostras do conjunto corresponderam às concentrações fornecidas por um delineamento composto central, obtido pela combinação de dois delineamentos compostos centrais de 3 conservantes cada. Além disso, foram incluídas 6 amostras de solução padrão de cada analito individualmente, totalizando 16 amostras em uma faixa de concentração de 0,5 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada conservante utilizado neste trabalho, como pode ser observado na TABELA 10 (Monzón *et al.*, 2018).

TABELA 10 - AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO PARA CONSTRUÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS DE SEGUNDA ORDEM

Exp	MPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	POE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	BPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TCS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	2	0	0	0	0	0
2	0	2	0	0	0	0
3	0	0	2	0	0	0
4	0	0	0	2	0	0
5	0	0	0	0	2	0
6	0	0	0	0	0	2
7	1.4	0.5	1.4	0.5	0.5	0.5
8	0.5	1.4	0.5	1.4	0.5	0.5
9	0.5	0.5	0.5	0.5	1.4	1.4
10	1.4	1.1	1.4	1.1	1.4	1.1
11	1.7	0.8	1.7	0.8	0.8	0.8
12	0.8	1.7	0.8	1.7	0.8	0.8
13	0.8	0.8	0.8	0.8	1.7	1.7
14	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
15	1.1	1.4	1.1	1.4	1.1	1.4
16	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7

Fonte: O autor

Um conjunto de validação externa de 11 amostras contendo os 6 conservantes estudados foi preparado a partir das misturas de alíquotas das soluções estoque e diluídos em água ultrapura. As amostras deste último conjunto corresponderam às concentrações fornecidas por um delineamento composto central em uma faixa de concentração de 0,6 a 1,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada conservante utilizado neste trabalho e pode ser observado na TABELA 11.

TABELA 11 - AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CONSTRUÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS DE SEGUNDA ORDEM

Exp	MPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	POE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	BPB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TCS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	1.5	0.9	1.3	1.85	0.6	1.5
2	1.3	1.5	0.6	0.9	1.85	0.6
3	1.85	0.6	0.9	1.5	1.3	1.3
4	0.9	1.5	1.85	1.3	0.6	0.9
5	0.6	1.85	1.3	1.5	0.9	1.85
6	1.3	1.3	1.5	0.6	1.85	0.9
7	1.85	0.6	0.9	1.3	1.5	0.6
8	0.9	1.5	0.6	1.85	1.3	1.5
9	1.3	0.9	1.85	0.6	1.5	0.9
10	0.6	1.3	1.5	0.9	1.3	1.85
11	1.5	0.9	1.3	1.3	0.9	1.3

Fonte: O autor

5.3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Todos os experimentos foram realizados utilizando um cromatógrafo em fase líquida Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) utilizando uma coluna de fase-reversa Hypersil Gold (150 × 4.6 mm, 5 μm). As condições experimentais foram as seguintes: Informações de múltiplos comprimentos de onda foram registradas a cada 1 nm entre 200 e 600 nm, a vazão da fase móvel foi de 1,00 mL min^{-1} ; temperatura da coluna mantida em 30 °C; volume de injeção de 40 μL . A fase móvel foi constituída de água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O programa de gradiente foi configurado para um gradiente linear de 0 – 2.5 min de 40:60% v v⁻¹ (A:B), seguido por um gradiente linear de 2.5 – 2.7 min de 100% v v⁻¹ (B), mantendo em 100% v v⁻¹ de (B) de 2.8 – 5.5 min, retorno para 60% B em 5.5 min, mantendo-a por 1 min para estabilização da coluna.

5.3.5 ANÁLISE DOS DADOS E SOFTWARE

Uma matriz de dados de dois modos ("*Two-way data set*") de tamanho 1051 x 411 (tempo de retenção x comprimento de onda) foi obtida para cada amostra após a determinação instrumental.

Todos os modelos quimiométricos foram implementados no MATLAB R2024b (MathWorks, Inc., MA, EUA). A modelagem de dados de segunda ordem (PARAFAC (Bro, 1997), U-PLS/RBL (Olivieri, 2005) e MCR-ALS (Jaumot *et al.*, 2015)) foi realizada utilizando o GUI ("*Graphical user interface*") MVC2 disponível online gratuitamente (Chiappini *et al.*, 2023) para ambiente MATLAB.

5.3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para avaliar a aplicabilidade e a exatidão do método proposto, os valores de referência para os seis conservantes nas dezesseis amostras comerciais utilizadas neste estudo, foram obtidos por LC-MS/MS seguindo o método descrito por Vitku *et al.*, (2023) e Kim *et al.*, (2015) com pequenas modificações. As determinações de conservantes foram realizadas utilizando um cromatógrafo em fase líquida acoplado a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo LCMS-8045 Shimadzu (Kyoto, Japão). Os compostos foram separados em uma coluna Poroshell C18 EC-C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 μm). O método cromatográfico empregou uma fase móvel consistindo de 2 mmol L⁻¹ NH₄F em MeOH:H₂O (90:10 v v⁻¹) (solvente A) e H₂O 10% MeOH (solvente B). O programa de gradiente foi configurado para um gradiente linear de 0–3.5 min de 70:30% v v⁻¹ (A:B), seguido por um gradiente linear de 100:0% v v⁻¹ (A:B) de 3.5 a 5 min. O volume de injeção foi ajustado em 5 μL com uma taxa de fluxo constante de 0,3 mL min⁻¹ mantida durante toda a execução da amostra e a temperatura da coluna foi mantida em 40 °C.

A interface de ionização por *electrospray* (ESI) foi usada em um modo de comutação rápida de polaridade positiva-negativa usando tubo capilar resistivo para a determinação simultânea dos seis conservantes utilizados neste estudo. A análise espectrométrica de massa foi realizada no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e os parâmetros da ionização por eletrospray operando no modo íon positivo-negativo bem como a transição de massa dos íons precursor/produto estão sumarizadas na TABELA 12.

TABELA 12 – PARÂMETROS DE OPERAÇÃO DA FONTE DE *ELECTROSPRAY* E CONDIÇÕES DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA ANÁLISES NO MODO DE IONIZAÇÃO POSITIVO E NEGATIVO E VARREDURA EM MONITORAMENTO DE REAÇÕES MÚLTIPLAS (MRM)

Condições MS	Fluxo de gás do nebulizador:	3 L/min			
	Fluxo de gás de aquecimento:	10 L/min			
	Temperatura da interface:	300°C			
	Temperatura de dessolvatação:	526°C			
	Temperatura da câmara de dessorção:	250°C			
	Temperatura do bloco de aquecimento:	400°C			
	Fluxo de gás de secagem:	10 L/min			
Composto	Tempo de retenção (min)	Modo de ionização	Precursor (m/z)	Íon do produto (m/z)	CE (V)
Metil parabeno	1.223	Negativo	151	92	20
				136	13
Etil parabeno	1.495	Negativo	165	92	22
				136	13
Propil parabeno	1.904	Negativo	193	92	22
				136	16
Butil parabeno	2.427	Negativo	179	92	23
				136	15
Triclosan	4.113	Negativo	287	35	5
			289	35	5
Fenoxietanol	1.122	Positivo	139	92	20
				77	13

*Íons em negrito corresponde ao íon quantificador e o segundo íon corresponde ao íon qualificador

Fonte: O Autor

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 ANÁLISE DE DADOS BRUTOS E PREOCUPAÇÕES GERAIS COM DADOS

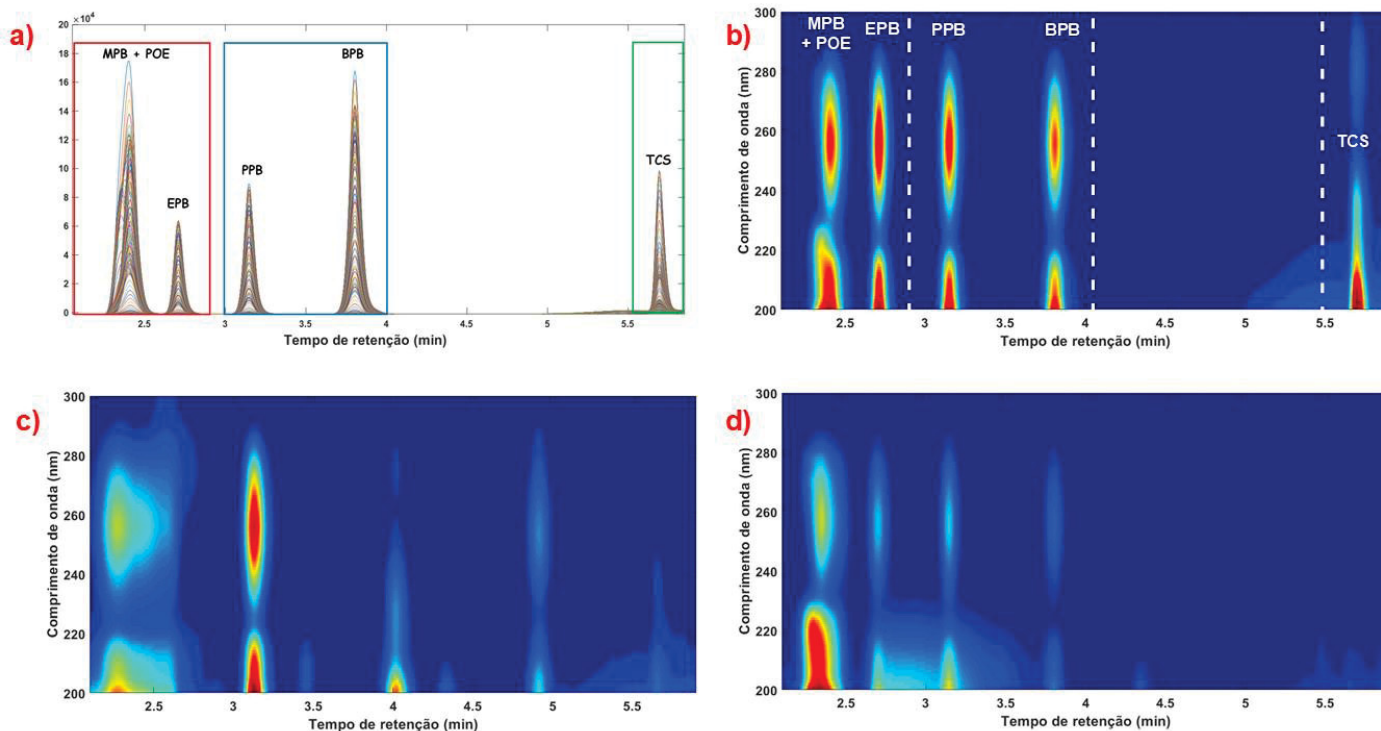
HPLC-DAD

Antes do processamento quimiométrico (MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL), foram selecionadas três sub-regiões diferentes (R-I a R-III) na corrida cromatográfica, de forma a simplificar a modelagem matemática na etapa quimiométrica. Conforme observado na FIGURA 41(a), POE, MPB e EPB estão na primeira região (R-I), PBP e BPB estão localizados na segunda região (R-II) e TCS está localizada na terceira região (R-III). Essa abordagem é necessária para evitar que a inclusão de áreas com apenas ruído e/ou nenhuma informação química sejam introduzidas nos modelos quimiométricos e comprometa significativamente os resultados e leve a conclusões equivocadas (Monzón *et al.*, 2018).

Para ilustrar, as FIGURAS 41(a) e 41(b) mostram o gráfico da corrida cromatográfica de uma amostra de calibração que contém os analitos de mesma concentração ($1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) (C16) subdividida nas três regiões e seu perfil bidimensional. Conforme observado na FIGURA 41(a), os seis conservantes são eluídos rapidamente, em apenas 6 minutos, um tempo consideravelmente reduzido em comparação com metodologias reportadas na literatura (Baker *et al.*, 2025; Abad-Gil *et al.*, 2021; Alvarez-Rivera *et al.*, 2014; Aoyama *et al.*, 2014). Os analitos POE e MPB apresentam coeluição severa, com sobreposição significativa de picos.

Esta coeluição e sobreposição de picos, são ainda mais acentuadas em amostras comerciais (FIGURAS 41(c) e 41(d)), pois elas geralmente consistem em matrizes de amostra significativamente mais complexas e com uma diversidade química. Esses sérios problemas de coeluição tornam-se obstáculos à quantificação de conservantes em cosméticos por métodos de calibração univariada, em uma corrida cromatográfica tão rápida, como a proposta neste trabalho.

FIGURA 41 - (A) CROMATOGRAMA MULTICANAL DA SOLUÇÃO PADRÃO MISTA (C16); (B) PERFIL DE CONTOURO 2-D DO C16;(C) E (D) PERFIL DE CONTOURO 2-D DE DUAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE PRODUTOS COSMÉTICOS



Fonte: O autor

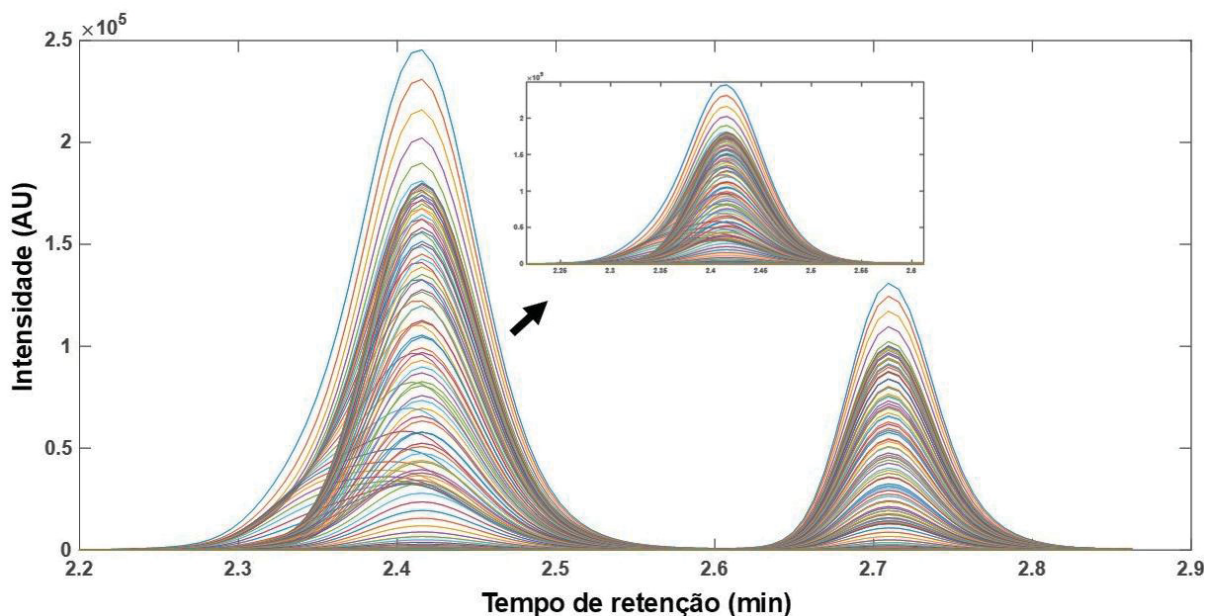
Em resposta a essa situação, as estratégias tradicionais geralmente exigem grande esforço no tratamento de amostras, otimização da eluição cromatográfica e longos tempos de análise. No entanto, todos esses esforços frequentemente consomem grandes volumes de solventes orgânicos e demandam muita mão de obra, o que não está em conformidade com os princípios da química analítica branca (Escandar & Olivieri, 2025).

Portanto, a exploração das "vantagens de segunda ordem" oferecidas pelos métodos de calibração multivariada se torna uma alternativa para a solução de problemas analíticos complexos. Para tanto, é fundamental que as características dos dados de HPLC-DAD sejam consideradas. A análise cromatográfica frequentemente resulta em um "*three-way data set*", uma matriz tridimensional (amostras x tempo de retenção x DAD), obtida pelo empilhamento de matrizes de um grupo de amostras (Anzardi *et al.*, 2021).

É comum, no entanto, que nesses dados ocorram mudanças de tempo de retenção dos analitos eluídos, ou ainda, desvios de linha de base entre uma corrida e outra. Esse fenômeno faz com que os dados percam sua propriedade de trilinearidade, um obstáculo para algoritmos que a exigem, como é o caso do PARAFAC (Escandar *et al.*, 2014). Nesses casos, uma etapa de correção adequada ou o uso de algoritmos mais flexíveis ("*soft-modelling*"), como MCR-ALS e PARAFAC2, é a escolha mais apropriada.

Neste estudo, como pode ser observado na FIGURA 42, o cromatograma de HPLC-DAD para amostras do conjunto de calibração, em uma das regiões previamente selecionadas, não apresentou mudanças significativas no tempo de retenção ou desvios de linha de base mesmo com uma coeluição dos perfis cromatográficos. Isso preservou a trilinearidade bem definida dos dados, garantindo que os três grupos de algoritmos pudessem ser aplicados com sucesso, PARAFAC, MCR-ALS e UPLS/RBL. Dessa forma, tanto modelos mais rígidos ("*hard-modelling*") como o PARAFAC, quanto modelos mais flexíveis ("*soft-modelling*") como o MCR-ALS, e modelos baseados em variáveis latentes como o U-PLS/RBL, podem ser adequadamente aplicados ao conjunto de dados deste estudo (Monzón *et al.*, 2018; Mortera *et al.*, 2018). Essa versatilidade amplia as possibilidades para modelar esses dados de HPLC-DAD e quantificar os seis conservantes selecionados em diferentes tipos de amostras cosméticas.

FIGURA 42 - PERFIS DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA DE AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO. A FIGURA INSERIDA MOSTRA AMPLIAÇÃO LOCAL DOS PERFIS DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA PARA MPB + POE EM DIFERENTES AMOSTRAS



Fonte: O autor

5.4.2 CONFIGURAÇÃO DE PARÂMETROS PARA CALIBRAÇÃO DOS MODELOS

Como mencionado anteriormente, o cromatograma de cada amostra foi dividido em três sub-regiões (R-I a R-III) com base nos tempos de eluição dos analitos antes da modelagem. Para os três algoritmos utilizados neste estudo, o número de componentes foi selecionado de acordo com parâmetros específicos de cada modelagem. Para o PARAFAC, o número de fatores foi determinado usando o critério de *Core Consistency* (Bro *et al.*, 2003), estimando a composição ideal no ponto em que o valor do *core consistency* diminui acentuadamente à medida que o número de componentes aumenta. Já para o MCR-ALS, o número de componentes foi estimado verificando a estimativa dada pela decomposição de valor singular (SVD). Após, para iniciar o processo de interação por meio da ALS (Mínimos quadrados alternados) o valor inicial foi obtido a partir de uma matriz espectral pura com 10% de ruído, fornecida pelo algoritmo SIMPLISMA, de acordo com as opções na caixa de ferramentas MVC2 (Chiappini *et al.*, 2023). Por fim, para o U-PLS/RBL, o número de variáveis latentes foi selecionado usando o conhecido procedimento de validação

cruzada do tipo "*leave-one-out*", também referido como "critério de Haaland" (Haaland et al., 1988).

Detalhes das três sub-regiões, incluindo as faixas de tempo de retenção cromatográficas e espectrais, tamanhos de matriz, bem como o número estimado de componentes relacionados, são mostrados na TABELA 13.

TABELA 13 – INTERVALOS DE TEMPO DE RETENÇÃO CROMATOGRÁFICOS E ESPECTRAIS SELECIONADOS, JUNTAMENTE COM NÚMEROS DE COMPONENTES EM CADA REGIÃO PARA MODELOS PARAFAC, MCR-ALS E U-PLS/RBL

Região	Analito	T_R (min)	Comprimento de onda (nm)	Dimensões da matriz ($J \times K$)	MCR-ALS componentes	PARAFAC fatores	U-PLS/RBL VL's
I	MPB/POE/EPB	2.06-2.86	200-309	120 x 110	5	5	4
II	PPB/BPB	2.99-4.06	200-309	161 x 110	3	4	3
III	TCS	5.61-5.81	200-309	31 x 110	2	2	2

T_R : Tempo de retenção; VL's: Variáveis latentes. J: número de linhas da matriz correspondente aos tempos de retenção; K: número de colunas da matriz correspondente aos comprimentos de onda.

Para garantir que os melhores resultados na decomposição da matriz fossem obtidos, foram aplicadas restrições apropriadas na construção dos modelos. Neste trabalho, para o MCR-ALS, restrições de unimodalidade e não-negatividade foram impostas aos perfis de tempo de retenção ($\mathbf{C}_{aug}$), e uma restrição de não-negatividade nos perfis espectrais, além da restrição de trilinearidade aplicada ao modelo (Monzón et al., 2018). Já para o modelo baseado em PARAFAC, foi aplicado restrições de unimodalidade e não-negatividade aos perfis de tempo de retenção, e uma restrição de não-negatividade nos perfis espectrais (Arce et al., 2021). Por fim, o U-PLS/RBL nenhuma restrição é necessária (Wang et al., 2021).

Após a determinação do número de componentes, estimativas iniciais e restrições, a matriz de dados de três vias ("*Three-way data set*") $\overline{\mathbf{X}}_1$ de cada sub-região é decomposta utilizando os algoritmos PARAFAC, U-PLS/RBL e MCR-ALS, respectivamente.

5.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CONSERVANTES EM COSMÉTICOS

5.4.3.1 RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO, VALIDAÇÃO EXTERNA E PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

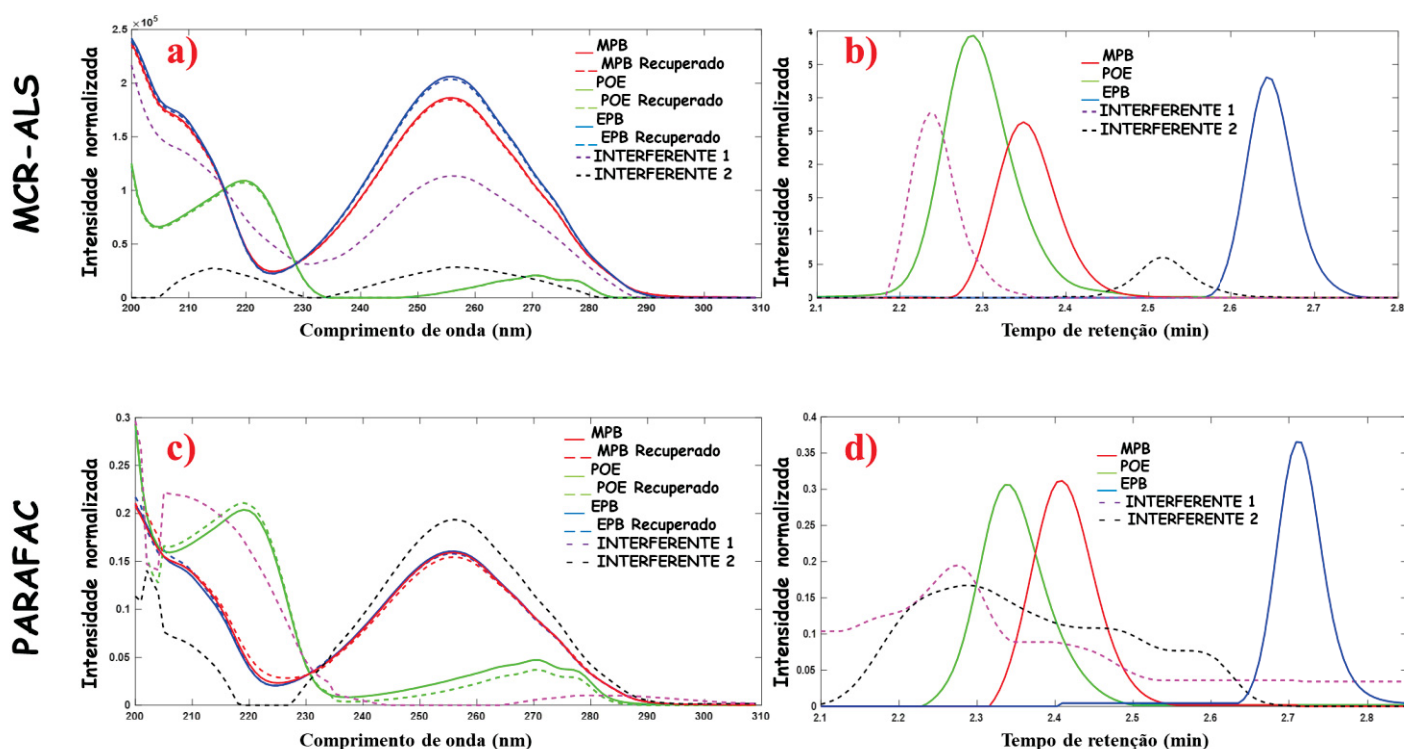
Sob as condições otimizadas para cada modelo quimiométrico, os conjuntos de calibração, predição e de amostras comerciais foram concatenados em uma matriz de dados de duas vias ao longo do modo amostral (D_{aug}). Essa matriz foi então carregada no *toolbox* MVC2, onde cada sub-região foi decomposta pelos três algoritmos quimiométricos distintos, respectivamente. Vale ressaltar que os resultados espectrais serão apresentados para o MCR-ALS e PARAFAC, uma vez que o U-PLS/RBL não se baseia em recuperação de sinal analítico, mas faz a previsão de concentrações em novas amostras baseadas em variáveis latentes que podem ser combinações lineares de perfis reais; portanto, os perfis qualitativos claros não são fornecidos (Wang *et al.*, 2021).

Para a primeira região (R-I), que inclui os analitos POE, MPB e EPB, a FIGURA 43 ilustra os perfis cromatográficos e espectrais recuperados pelos algoritmos MCR-ALS (FIG. 43(a) e 43(b)) e PARAFAC (FIG. 43(c) e 43(d)). Na figura, os espectros e os perfis cromatográficos recuperados apresentam-se como linhas tracejadas, enquanto os espectros puros e cromatogramas dos analitos estão representados em linha contínua. Foram recuperados três componentes referentes aos analitos de interesse, e dois interferentes.

Como é possível observar (FIG. 43(b) e 43(d)), os métodos de segunda ordem conseguiram recuperar e distinguir os tempos de retenção dos analitos-alvo (POE, MPB e EPB) dos interferentes de fundo desconhecidos, que são propensos à coeluição e causam diferentes graus de sobreposição.

Da mesma forma, a análise dos perfis espectrais (FIG. 43(a) e 43(b)) revela que as linhas tracejadas e sólidas coincidem quase completamente para os algoritmos PARAFAC e MCR-ALS. Isso demonstra a capacidade dos algoritmos trilineares e bilineares em extrair com sucesso informações qualitativas válidas dos analitos a partir de dados brutos de HPLC-DAD. Essa capacidade é mantida mesmo na presença de condições desafiadoras, como sobreposição severa de picos, coeluição com componentes desconhecidos, leves desvios da linha de base, e perfis espectrais muito semelhantes, como é o caso dos parabenos (Parastar *et al.*, 2014).

FIGURA 43 - PERFIS RESOLVIDOS DA PRIMEIRA REGIÃO (R-I) DECOMPOSTOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC. PERFIS ESPECTRAIS (FIG. 43(A) E 43(C)), E PERFIS CROMATOGRÁFICOS (FIG. 43(B) E 43(D)), RESOLVIDOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC, RESPECTIVAMENTE



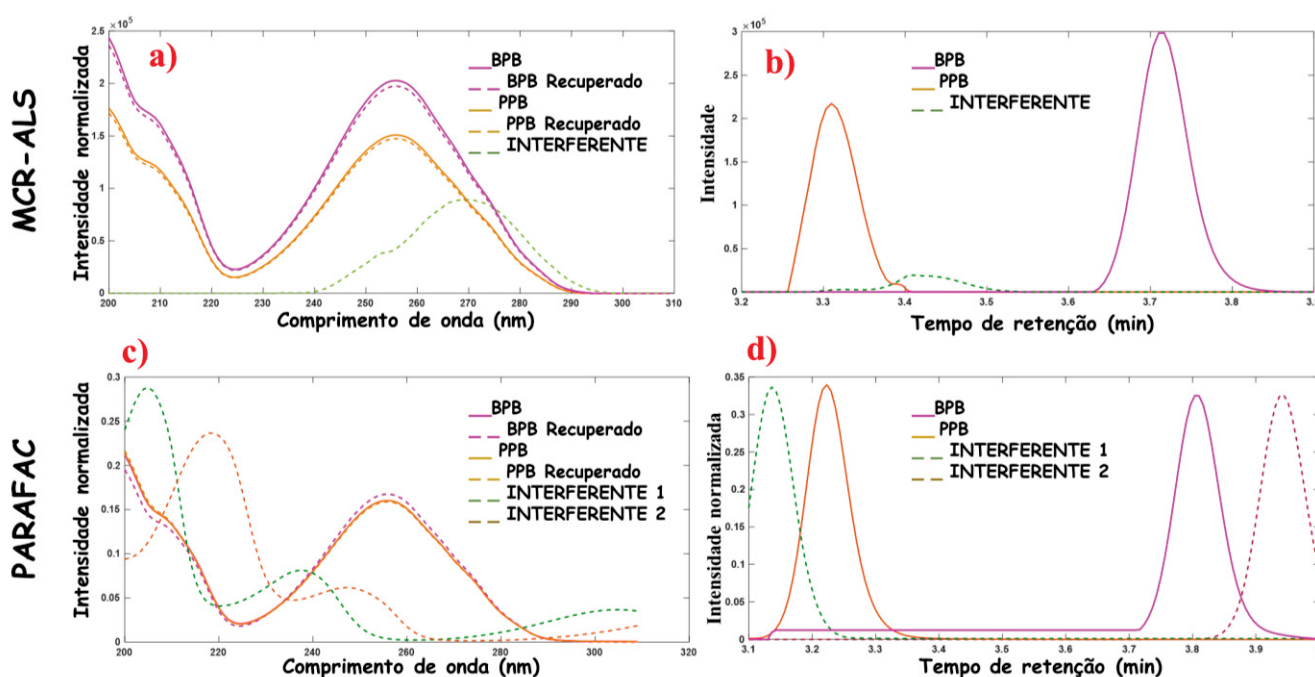
Fonte: O Autor

Analogamente à primeira região (R-I), a segunda região (R-II), que contém os analitos PPB e BPB, foi decomposta pelos algoritmos PARAFAC e MCR-ALS. Apesar de em R-II, apenas os analitos PPB e BPB serem detectados nas amostras de calibração e de validação, dois interferentes foram detectados nas amostras comerciais, conforme ilustrado na FIGURA 44.

Com os perfis recuperados em ambos os métodos, foi possível recuperar e distinguir os tempos de retenção de cada analito, separando-os das interferências desconhecidas e das coeluições (FIGURAS 44(b) e 44(d)). As FIGURAS 44(a) e 44(c) também mostram os espectros dos analitos recuperados pelos modelos e de possíveis interferentes (ambos em linha tracejada), os quais foram comparados com os espectros puros dos analitos (em linha sólida). Vale a pena ressaltar, que os perfis espectrais dos parabenos são muito similares, com o máximo de absorção na mesma região (254 nm). Essa similaridade, combinada com a coeluição de picos

cromatográficos e sobreposição espectral, torna-se inviável uma estratégia univariada e reforça a grande importância do uso de métodos quimiométricos para a resolução de picos.

FIGURA 44 - PERFIS RESOLVIDOS DA SEGUNDA REGIÃO (R-II) DECOMPOSTOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC. PERFIS ESPECTRAIS DOS ANALITOS E DAS INTERFERÊNCIAS (FIG. 4(A) E 44(C)), E PERFIS CROMATOGRAFÍCOS (FIG. 44(B) E 44(D)), RESOLVIDOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC, RESPECTIVAMENTE



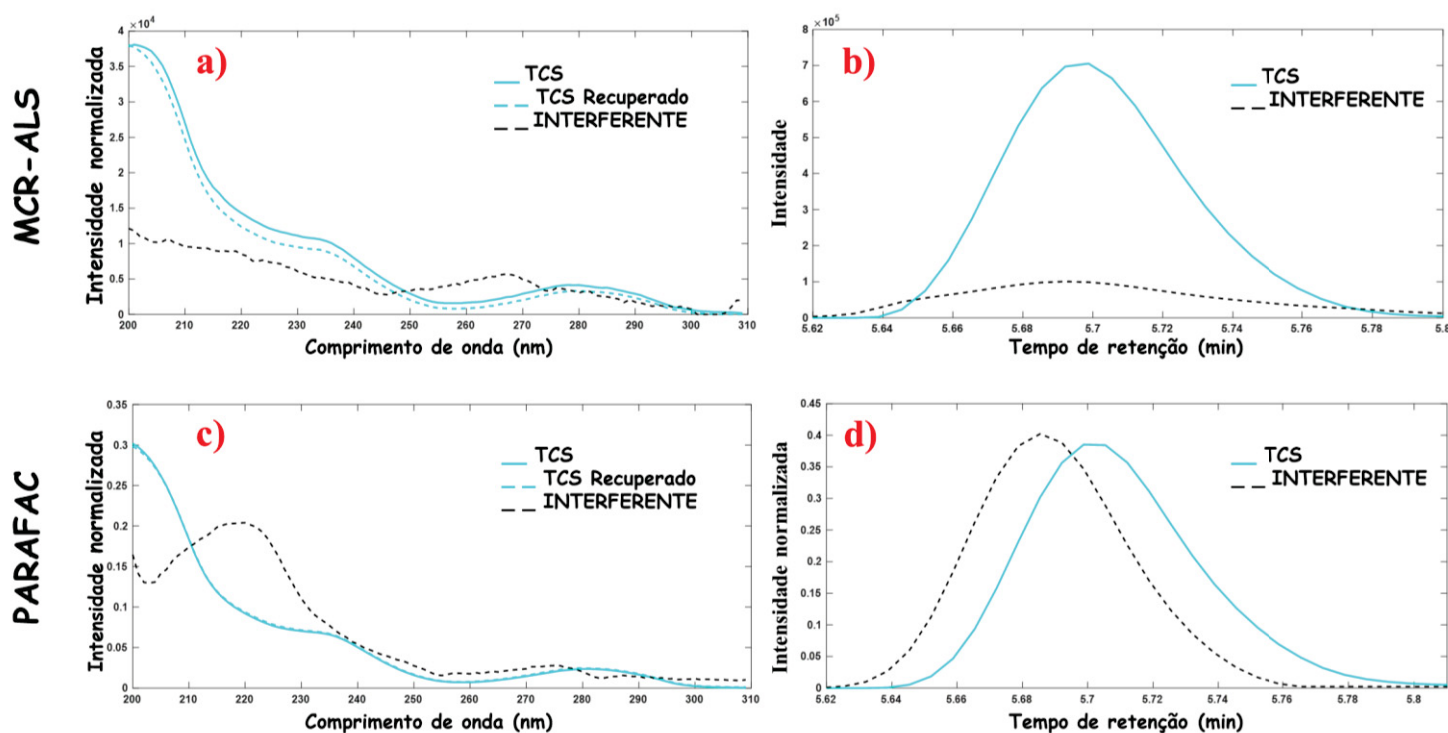
Fonte: O Autor

Por fim, a terceira região (R-III) contém apenas o analito TCS, que é o mais apolar dos conservantes estudados. Inicialmente, poder-se-ia supor que uma abordagem univariada seria suficiente, sem a necessidade de um pré-tratamento matemático complexo. Contudo, essa afirmação não se sustenta, pois as amostras cosméticas exibem uma complexidade acentuada, com muitos excipientes em sua formulação. A análise dos perfis espectrais e de eluição do TCS revela a presença de interferência espectral e coeluição provocadas por interferentes desconhecidos, o que torna a separação matemática necessária.

Os resultados demonstram que os algoritmos MCR-ALS (FIGURAS 45(a) e 45(b)) e PARAFAC (FIGURAS 45(c) e 45(b)) se beneficiam da "vantagem de segunda

ordem". Tanto o perfil espectral quanto o perfil de eluição puros do TCS são muito similares aos recuperados pelos algoritmos, que conseguiram distinguir o analito das interferências desconhecidas mesmo sem a presença do interferente no conjunto de calibração.

FIGURA 45 - PERFIS RESOLVIDOS DA TERCEIRA REGIÃO (R-III) DECOMPOSTOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC. PERFIS ESPECTRAIS DO TCS E DA INTERFERÊNCIA (FIG. 45(A) E 45(C)), E PERFIL CROMATOGRÁFICO (FIG. 45(B) E 45(D)), RESOLVIDOS PELOS ALGORITMOS MCR-ALS E PARAFAC, RESPECTIVAMENTE



Fonte: O Autor

Após a recuperação dos espectros correspondentes aos analitos, foi construída uma regressão por mínimos quadrados para os modelos PARAFAC e MCR-ALS (Yin *et al.*, 2018). Essa regressão utilizou as matrizes de concentração relativa (área dos cromatogramas recuperados para o MCR-ALS e *scores* do modo referente a concentração para o PARAFAC) e as concentrações reais das amostras, resultando em uma curva pseudo-univariada para cada analito. Já para o modelo U-PLS/RBL, a curva de calibração foi construída diretamente a partir da matriz de calibração (X) e

suas respectivas concentrações (Y), utilizando variáveis latentes, de forma análoga ao modelo PLS tradicional (Olivieri, 2005).

Após obter os parâmetros de calibração para os modelos de ordem superior, um conjunto de amostras com concentrações desconhecidas (conforme a seção 5.3.3) foi aplicado aos modelos. O objetivo foi testar sua capacidade de prever novas concentrações dos seis analitos estudados neste trabalho. Sendo assim, com o intuito de comparar o desempenho de diferentes abordagens quimiométricas, como algoritmos trilineares (PARAFAC), bilineares (MCR-ALS) e variável latente (U-PLS/RBL) para dados de HPLC-DAD, a TABELA 14 apresenta os parâmetros de validação obtidos.

TABELA 14 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA A AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE MODELOS PARAFAC, MCR-ALS E U-PLS/RBL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CONSERVANTES EM AMOSTRAS COSMÉTICAS

	Rcal	RMSEP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	REP (%)	SEN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SEL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
MCR-ALS							
Metilparabeno	0.99	0.0510	5.10	3.97×10^{10}	0.9723	0.16	0.46
Fenoxietanol	0.99	0.0550	5.50	8.85×10^8	0.9051	0.17	0.47
Etilparabeno	0.99	0.0851	8.51	4.54×10^{10}	0.9807	0.18	0.48
Propilparabeno	0.99	0.0406	3.84	1.69×10^{12}	0.9986	0.09	0.25
Butilparabeno	0.99	0.0691	6.07	1.38×10^{12}	0.9936	0.14	0.39
Triclosan	0.96	0.148	11.96	1.07×10^{12}	0.8809	0.23	0.84
PARAFAC							
Metilparabeno	0.99	0.0472	4.72	1.71×10^{13}	0.9810	0.16	0.47
Fenoxietanol	0.97	0.1120	11.12	8.12×10^{12}	0.9404	0.33	0.92
Etilparabeno	0.99	0.0510	5.09	1.88×10^{13}	1.0000	0.12	0.34
Propilparabeno	0.99	0.3880	3.68	1.78×10^{13}	1.0000	0.07	0.20
Butilparabeno	0.99	0.0660	5.80	1.5×10^{13}	1.0000	0.15	0.41
Triclosan	0.95	0.1463	11.85	6.59×10^{12}	0.8865	0.30	0.92
U-PLS/BRL							
Metilparabeno	0.99	0.0381	3.94	1.53×10^{13}	N/A	0.06	0.19
Fenoxietanol	0.99	0.0460	4.41	7.39×10^{12}	N/A	0.10	0.31
Etilparabeno	0.99	0.0541	5.59	1.76×10^{13}	N/A	0.12	0.36
Propilparabeno	0.99	0.3220	2.90	1.42×10^{13}	N/A	0.08	0.25
Butilparabeno	0.98	0.0665	5.84	1.45×10^{13}	N/A	0.13	0.40
Triclosan	0.95	0.2009	12.60	2.46×10^{12}	N/A	0.31	0.94

Rcal: Coeficiente de determinação para a matriz de calibração; RMSEP: erro médio quadrático da predição; REP: Erro relativo de predição; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação; SEN: Sensibilidade; SEL: Seletividade; N/A: Não aplicável.

Fonte: O Autor

A comparação dos melhores resultados para as diferentes abordagens quimiométricas em dados trilineares de HPLC-DAD demonstrou um desempenho satisfatório de modo geral. Isso é particularmente evidente nas métricas de erro de predição, como RMSEP e REP, cujos valores ficaram abaixo de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 10%, respectivamente, para a maioria dos analitos, indicando uma excelente capacidade preditiva. A única exceção foi o analito TCS, que apresentou valores ligeiramente superiores, com RMSEP entre 0,14 e $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e REP em torno de 12%. A seletividade (SEL) é uma métrica de crucial importância para algoritmos de recuperação de sinal analítico em sistemas complexos como amostras cosméticas, em que os valores foram superiores a 0,88. Este alto valor destaca a capacidade dos algoritmos de aproveitar a "vantagem de segunda ordem", que é a habilidade de recuperar os espectros puros mesmo na presença de interferentes desconhecidos com sobreposição tanto espectral quanto no perfil de eluição (Alcaráz *et al.*, 2014). Para os demais parâmetros — SEL, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) — não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes abordagens quimiométricas, exceto o LOD e LOQ para os analitos da R-I (MPB, POE e EPB), em o U-PLS/RBL obteve valores mais baixos em comparação com as demais abordagens quimiométricas.

5.4.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR LC-MS/MS

Para avaliar a exatidão analítica dos modelos quimiométricos PARAFAC, MCR-ALS e U-PLS/RBL na predição das concentrações dos conservantes, a metodologia proposta foi comparada com o método de referência de cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Para isso, 16 amostras cosméticas comerciais foram analisadas por ambos os métodos, com os resultados ilustrados na TABELA 15.

TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES DOS CONSERVANTES EM AMOSTRAS COMERCIAIS DETERMINADOS POR LC-MS/MS E ESTIMADOS PELOS MODELOS PARAFAC, MCR-ALS E U-PLS/RBL

Amostra Real	Metilparabeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Fenoxietanol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Etilparabeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	MCR-ALS		PARAFAC		MCR-ALS		PARAFAC		MCR-ALS		PARAFAC	
	NOM	Pred	Pred	U-PLS/RBL	NOM	Pred	Pred	U-PLS/RBL	NOM	Pred	Pred	U-PLS/RBL
M1	635,31	678,00	697,58	614,80								
M2	13,11	13,64	12,52	12,86	5,09	5,26	5,67	4,78				
M3												
M4	5,99	5,87	6,08	5,33	5,64	5,99	6,08	5,33				
M5	4,07	4,02	3,81	3,63	4,15	3,84	4,69	4,21				
M6	14,02	13,28	13,14	15,92								
M7	6,80	7,31	5,59	6,54	70,30	62,65	72,20	68,80	5,40	5,51	5,77	4,97
M8	587,59	538,10	555,20	590,56	520,44	497,12	510,62	515,94	501,19	483,56	484,26	505,84
M9	621,96	644,78	640,00	658,18	564,18	604,97	543,86	570,46	527,27	550,52	547,04	493,88
M10					2200,23	2084,35	2348,98	1953,00				
M11					2310,99	2569,14	2306,31	2090,73	1,06	1,16	1,17	1,10
M12					2100,00	2136,87	2008,74	2182,91				
M13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
M14					2310,20	2488,01	2297,64	2224,72	0,58	0,64	0,60	0,55
M15	21,76	20,59	22,31	22,98	10,50	9,98	11,86	10,99	4,62	4,17	4,24	4,84
M16					18,43	20,30	20,14	17,99				

NOM: Concentração fornecida pelo método de referência; LC-MS/MS; Pred: Concentrações fornecidas pelos métodos alternativos; ND: Não detectado.

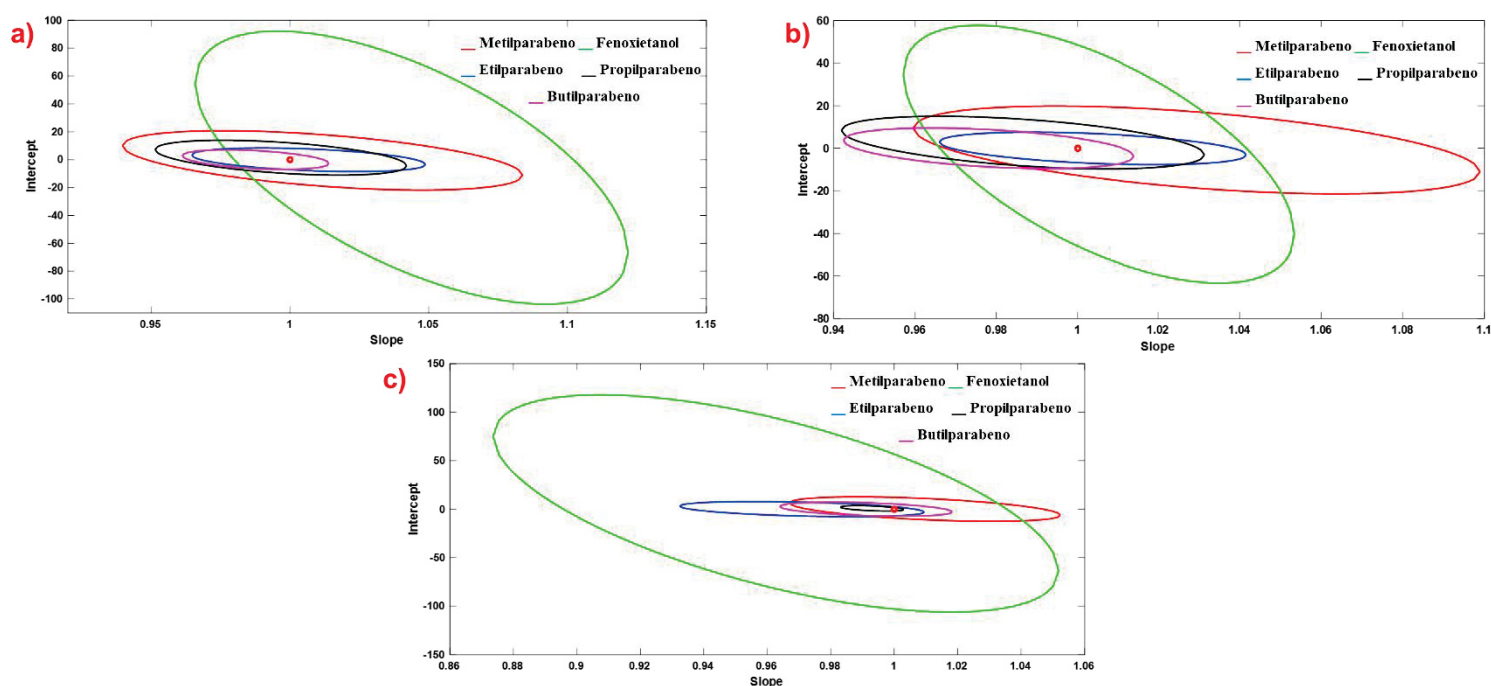
Amostra Real	Propilparabeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Butilparabeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Triclosan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	MCR-ALS		PARAFAC		MCR-ALS		PARAFAC		MCR-ALS		PARAFAC	
	NOM	Pred	Pred	U-PLS/RBL	NOM	Pred	Pred	U-PLS/RBL	NOM	Pred	Pred	U-PLS/RBL
M1	245,71	266,50	283,05	253,15								
M2	14,18	13,30	12,53	14,13								
M3												
M4	13,19	14,20	16,80	14,10								
M5	10,46	9,90	9,32	12,74								
M6	12,21	12,10	12,37	11,98								
M7	4,38	4,73	4,63	4,60	2,18	2,34	2,17	2,13				
M8	669,18	690,04	660,00	663,46	677,24	652,00	639,60	688,60				
M9	694,95	666,17	677,88	689,92	678,50	686,91	686,58	655,16				
M10												
M11												
M12												
M13	ND	ND	ND	ND								
M14					0,31	ND	ND	ND				
M15	0,69	0,70	0,75	0,61	1,02	1,12	1,06	1,11				
M16									0,45	ND	ND	ND

NOM: Concentração fornecida pelo método de referência; LC-MS/MS; Pred: Concentrações fornecidas pelos métodos alternativos; ND: Não detectado.

Para avaliar se os valores dos modelos estudados diferem significativamente do método de referência, foi aplicado o teste da região de confiança conjunta elíptica (EJCR). Este teste baseia-se em um ajuste de mínimos quadrados ordinários (OLS), comparando o intercepto (a) e a inclinação (b) estimados com seus valores ideais de 0 e 1, respectivamente. O ponto ideal (0,1) deve estar dentro da elipse de confiança (Goicoechea & Olivieri, 2002; Lemes *et al.*, 2024). Para todos os analitos, os métodos MCR-ALS (FIG. 46(a)), PARAFAC (FIG. 46(b)) e U-PLS/RBL (FIG. 46(c)) demonstraram exatidão, com o ponto ideal contido na elipse. Essa concordância reforça a capacidade analítica dos métodos quimiométricos propostos, comprovando que seus resultados não apresentam diferença significativa (95% de confiança) em relação à análise de referência LC-MS/MS.

No entanto, a elipse de confiança para o analito Fenoxietanol (POE) é notavelmente maior em comparação com a dos demais conservantes. Uma elipse de maior área implica menor precisão da metodologia analítica. Essa maior área pode ser atribuída à alta concentração de Fenoxietanol ($2\% \text{ m m}^{-1}$) nas amostras comerciais, o que faz com que pequenas variações tenham um peso maior no resultado.

FIGURA 46 – ELIPSE DE CONFIANÇA PARA OS CONSERVANTES QUANTIFICADOS EM AMOSTRAS COMERCIAIS POR LC-MS/MS E PARA OS MÉTODOS MCR-ALS (A) E PARAFAC (B) E U-PLS/RBL (C)



Fonte: O Autor

Independentemente da abordagem quimiométrica, seja ela baseada em dados trilineares (PARAFAC), em modelos mais flexíveis (*soft-modelling*, como MCR-ALS), ou em variáveis latentes (U-PLS/RBL), todas as metodologias demonstraram a vantagem de segunda ordem ao processar múltiplas amostras de calibração simultaneamente. Isso reflete a capacidade do método analítico em quantificar com exatidão diversas classes de conservantes em diferentes tipos de amostras cosméticas (Anzardi *et al.*, 2021). No entanto, o modelo U-PLS/RBL obteve, de modo geral, melhores parâmetros de validação e apresentou a melhor precisão do modelo ao comparar as elipses de confiança das três abordagens quimiométricas, sendo neste caso em específico a melhor abordagem para se processar os dados de HPLC-DAD.

5.5 CONCLUSÃO

Este capítulo propôs uma nova metodologia analítica com o objetivo de comparar diferentes abordagens quimiométricas para a determinação simultânea de conservantes (Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Fenoxietanol e Triclosan) em diversos tipos de amostras cosméticas (emulsão, creme, pó, gel, enxaguante bucal, esfoliante corporal e sabonete líquido), utilizando cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

O HPLC-DAD, já amplamente utilizado com técnicas quimiométricas de ordem superior, mostrou-se extremamente versátil. Diferentes abordagens quimiométricas, com características distintas, foram aplicadas, e os resultados demonstraram a eficiência e confiabilidade na quantificação dos conservantes. Os baixos erros de predição, com RMSEP abaixo de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e REP inferior a 12%, demonstram a viabilidade em empregar essa metodologia analítica como uma ferramenta alternativa, de um alto custo-benefício e alta exatidão analítica, para o controle de qualidade dessas amostras comerciais.

A vantagem de segunda ordem, proporcionada pelas diferentes abordagens quimiométricas, foi crucial. Mesmo com problemas graves de coeluição e interferências não calibradas nos cosméticos, os algoritmos obtiveram resultados de quantificação satisfatórios. Isso é evidenciado pela comparação com o método de referência, LC-MS/MS, na qual os métodos propostos demonstram níveis de exatidão semelhantes, com um nível de confiança de 95%, além de apresentar um custo mais

baixo por análise e não requerer etapas demoradas de preparo de amostras e separação cromatográfica completa.

REFERÊNCIAS

- Abad-Gil, L., Lucas-Sánchez, S., Gismera, M. J., Sevilla, M. T., Procopio, J. R. (2021). Determination of paraben-, isothiazolinone- and alcohol-type preservatives in personal care products by HPLC with dual (diode-array and fluorescence) detection. **Microchemical Journal**, 160, 105613.
- Aker, A. M., Watkins, D. J., Johns, L. E., Ferguson, K. K., Soldin, O. P., Anzalota Del Toro, L. V., Alshawabkeh, A. N., Cordero, J. F., Meeker, J. D. (2016). Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women. **Environmental Research**, 151, 30-37.
- Alcaráz, M. R., Siano, G. G., Culzoni, M. J., De la Peña, A. M., Goicoechea, H. C. (2014). Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples. **Analytica Chimica Acta**, 809, 37-46.
- Alvarenga, B.R., Xavier, F.A.N., Soares, F.L.F., Carneiro, R.L. (2018). Thermal Stability Assessment of Vegetable Oils by Raman Spectroscopy and Chemometrics. **Food Analytical Methods**, 11, 1969–1976.
- Alvarez-Rivera, G., Llompart, M., Lores, M., Garcia-Jares, C. (2018). Preservatives in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods, in: A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products (Second Edition)*, Elsevier, Amsterdã, pp. 175–224.
- Alvarez-Rivera, G., Vila, M., Lores, M., Garcia-Jares, C., Llompart, M. (2014). Development of a multi-preservative method based on solid-phase microextraction–gas chromatography–tandem mass spectrometry for cosmetic analysis. **Journal of Chromatography A**, 1339, 13-25.
- Antonio, M., Alcaraz, M. R., Falcone, R. D., Culzoni, M. J. (2024). A micellar-enhanced fluorescence photoinduced four-way calibration method for the determination of multiclass pesticides in lemon juice. **Analytica Chimica Acta**, 1279, 341778.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Revista – Brasília: Anvisa, p. 19, 2008.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 19 2013. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_19_2013_.pdf/3b230914-a359-48c2-af0b-5ed7f2655446. Acessado em 15 de janeiro de 2024.
- Anzardi, M. B., Arancibia, J. A., Olivieri, A. C. (2021). Processing multi-way chromatographic data for analytical calibration, classification and discrimination: A successful marriage between separation science and chemometrics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 134, 116128.

Aoyama, A., Doi, T., Tagami, T., Kajimura, K. (2014). Simultaneous Determination of 11 Preservatives in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, 52(9), 1010-1015.

Araya, J. A., Carneiro, R. L., Arévalo, C., Freer, J., Castillo, R. D. P. (2017). Single pixel quantification strategies using middle infrared hyperspectral imaging of lignocellulosic fibers and MCR-ALS analysis. **Microchemical Journal**, 134, 164-172.

Arce, M., Ortiz, M., Sanllorente, S. (2021). HPLC-DAD and PARAFAC for the determination of bisphenol-A and another four bisphenols migrating from BPA-free polycarbonate glasses. **Microchemical Journal**, 168, 106413.

Assi, A., Michael-Jubeli, R., Baillet-Guffroy, A., Tfayli, A. (2022). Characterization of free fatty acids photo-oxidation under UV radiations: A stepwise Raman study. **Journal of Raman Spectroscopy**, 54, 24-36.

Azzouz, T., Tauler, R. (2008). Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples. **Talanta**, 74, 1201–1210.

Bahram, M., Bro, R., Stedmon, C., Afkhami, A. (2006). Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. **Journal of Chemometrics**, 20, 99–105.

Baker, M. M., Abdel-Khalek, M. M., Belal, T. S., El-Kafrawy, D. S. (2025). Inclusive stability study and validated HPLC-DAD concurrent estimation of terconazole and five co-formulated preservatives and antioxidants in different combined pharmaceutical formulations. **Microchemical Journal**, 216, 114551.

Barel, André O., Marc Paye, and Howard I. Maibach. (2014). Handbook of cosmetic science and technology. CRC press, 725, Boca Raton.

Bayat, M., Marín-García, M., Ghasemi, J. B., Tauler, R. (2020). Application of the area correlation constraint in the MCR-ALS quantitative analysis of complex mixture samples. **Analytica Chimica Acta**, 113, 52-55.

Binks, B. P. (2002). Particles as surfactants—Similarities and differences. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 7, 21-41.

Boiret, M., Rutledge, D. N., Gorretta, N., Ginot, Y., Roger, J. (2014). Application of independent component analysis on Raman images of a pharmaceutical drug product: Pure spectra determination and spatial distribution of constituents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 90, 78-84.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1 ed. 52p. Brasília:ANVISA, 2004. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf> Acesso em: 13 de Agosto de 2024.

Brasil(a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil registra queda de quase 70% nos casos de dengue nos 2 primeiros meses de 2025. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2025/marco/brasil-registra-queda-de-quase-70-nos-casos-de-dengue-nos-2-primeiros-meses-de-2025> Acesso em: 18 de setembro de 2025.

Brasil(b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletins Epidemiológicos. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos> Acesso em: 18 de setembro de 2025.

Brasil. Ministério da Saúde. Estratégia de vacinação contra a dengue. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/janeiro/ministerio-da-saude-anuncia-estrategia-de-vacinacao-contra-a-dengue> Acesso em: 06 de Dezembro de 2024.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1 ed. 52p. Brasília:ANVISA, 2004. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf> Acesso em: 03 de Setembro de 2024.

BRASIL. 2012. Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira. 2. ed. Brasília: [s.n.]. P. 224. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-nacional/arquivos/8065json-file-1> Acesso em: 09 de Dezembro de 2024.

Bro, R., Kiers, H. A. L. (2003). A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. **Journal of Chemometrics**, 17, 274–286.

Bro, R. (1997). PARAFAC Tutorial applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 38, 149–171.

Bro, R., Sidiropoulos, N. D., Smilde, A. K. (2002). Maximum likelihood fitting using ordinary least squares algorithms. **Journal of Chemometrics**, 16, 387–400.

Brown, S. D., Tauler, R., Walczak, B. (2020). Comprehensive chemometrics: Chemical and biochemical data analysis. Elsevier. Amsterdã. 2944.

Brummer, Rüdiger. Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions. 1. ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 180.

Cabaleiro, N., De la Calle, I., Bendicho, C., Lavilla, I. (2014). An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 57, 34-46.

Cárdenas, Z. J., Jiménez, D. M., Martínez, F. (2015). Thermodynamic study of the partitioning of methyl and propyl parabens in some organic solvent/buffer systems. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, 86, 180-187.

Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. (2008). Urinary concentrations of triclosan in the U.S. population: 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, 116, 303-7.

Calvo, F., Gómez, J. M., Alvarez, O., Ricardez-Sandoval, L. (2022). Effect of emulsification parameters on the rheology, texture, and physical stability of cosmetic emulsions: A multiscale approach. **Chemical Engineering Research and Design**, 186, 407-415.

Calvo, F., Gómez, J. M., Alvarez, O., Ricardez-Sandoval, L. (2022). Trends and perspectives on emulsified product design. **Current Opinion in Chemical Engineering**, 35, 100745.

Câmara, A. B., Da Silva, W. J., Neves, A. C. O., Moura, H. O., De Lima, K. M., De Carvalho, L. S. (2024). Excitation-emission fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and MCR-ALS with area correlation for investigation of jet fuel contamination. **Talanta**, 266, 125126.

Cardoso, V. G. K., Poppi, R. J. (2021). Cleaner and faster method to detect adulteration in cassava starch using Raman spectroscopy and one-class support vector machine. **Food Control**, 125, 107917.

Catena, S., Sanllorente, S., Sarabia, L. A., Boggia, R., Turrini, F., Ortiz, M. C. (2019). Unequivocal identification and quantification of PAHs content in ternary synthetic mixtures and in smoked tuna by means of excitation-emission fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC. **Microchemical Journal**, 154, 104561.

Chang, Y., Wu, H., Wang, T., Fang, H., Tong, G., Chen, Y., Wang, Z., Chen, W., Yu, R. (2021). Three efficient chemometrics assisted fluorimetric detection methods for interference-free, rapid, and simultaneous determination of ibrutinib and pralatrexate in various complicated biological fluids, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 252, 119419.

Charles, A. K., Darbre, P. D. (2013). Combinations of parabens at concentrations measured in human breast tissue can increase proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. **Journal of Applied Toxicology**, 33, 390-398.

Chen, Z.-F., Ying, G.-G., Lai, H.-J., Chen, F., Su, H.-C., Liu, Y.-S., Peng, F. -Q., Zhao, J.-L. (2012). Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 404, 3175–3188.

Chiappini, F. A., Muñoz de la Peña, A., Goicoechea, H. C., Olivieri, A. C. (2023). An upgrade of MVC2, a MATLAB graphical user interface for second-order multivariate calibration: Beyond trilinear models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 237, 104814.

Choi, E., Maeng, S. J., Yun, S., Yu, H., Shin, J., Yun, J. (2021). The degeneration of skin cosmetics and the structural changes of the chemical components as an

indicator of product shelf life. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 100, 317-323.

Commission Regulation (EU) No 358/2014 of 9 April 2014 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/358/oj>. Acesso em 1 de setembro de 2025.

Commission Regulation (EU) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, OJ. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj> Acesso em 2 de setembro de 2025.

Costa, R., Moggridge, G. D., Saraiva, P. M. (2006). Chemical product engineering: an emerging paradigm within chemical engineering. **AIChE Journal**, 52, 1976-1986.

Dahotre, S., Tomlinson, A., Lin, B., Yadav, S. (2018). Novel markers to track oxidative polysorbate degradation in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 157, 201-207.

Dann AB, Hontela A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. **Journal of Applied Toxicology**, 31, 285-311.

Darbre, P. D., Aljarrah, A., Miller, W. R., Coldham, N. G., Sauer, M. J., Pope, G. S. (2004). Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology**, 24, 5-13.

Das, R. S., Agrawal, Y. (2011). Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, 57, 163-176.

Dawson, W. R., Windsor, M. W. (1968). Fluorescence yields of aromatic compounds. **The Journal of Physical Chemistry**, 72, 3251-3260.

Derakhshandeh, M., Pilapil, B., Workman, B., Trifkovic, M., Bryant, S. (2018). Analysis of Network Formation and Long-Term Stability in Silica Nanoparticle Stabilized Emulsions. **Soft Matter**, 14, 4268-4277.

De Almeida, M. M., Bou-Chacra, N. A., de Castro Lima, C. R. R., do Rosário Matos, J., Filho, E. M., Mercuri, L. P., Velasco, M. V. R. (2014). Characterization and evaluation of free and nanostructured ursolic acid incorporated in cosmetic formulation using thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 115, 2401-2406.

De Almeida, M.M., Lima, C.R.R.C., Quenca-Guillen, J.S., Moscardini Filho, E., Mercuri, L.P., Santoro, M.I.R.M., Kedor-Hackmann, E.R.M. (2010). Stability evaluation of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in isolation and incorporated in cosmetic formulations using thermal analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 46, 129–134.

De Araújo Gomes, A., Azcarate, S. M., Diniz, P. H. G. D., de Sousa Fernandes, D. D., Veras, G. (2022). Variable selection in the chemometric treatment of food data: A tutorial review. **Food Chemistry**, 370, 131072.

De Faria, D., Santos, L., Goncalves, N., (1997). "A demonstration on inelastic light scattering: The Raman experiment revisited". **Quimica Nova**, 20, 319.

De Juan, A. (2019). Multivariate curve resolution for hyperspectral image analysis. *Data Handling in Science and Technology*, 32, 115-150.

De Juan, A., Rutan, S. C., Tauler, R., Massart, D. L. (1998). Comparison between the direct trilinear decomposition and the multivariate curve resolution-alternating least squares methods for the resolution of three-way data sets. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 40, 19–32.

De Sousa, A. A. (2022) O desenvolvimento econômico no Brasil: uma revisão bibliográfica preliminar. *Revista Geografia em Atos (Online)*, 1-18.

Dinç, E., Ertekin, Z.C., Büker, E. (2023). Two-way and three-way resolutions of fluorescence excitation-emission dataset for the co-estimation of two pharmaceuticals in a binary mixture. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 29, 104873.

Dwivedi, M., Blech, M., Presser, I., Garidel, P. (2018). Polysorbate degradation in biotherapeutic formulations: Identification and discussion of current root causes. **International Journal of Pharmaceutics**, 552, 422-436.

EPA - Reregistration Eligibility Decision (RED) DEET 2019. Disponível em: <https://www.epa.gov/insect-repellents/deet> Acessado 27 de setembro de 2023.

Farmacopeia Europeia, 10.5. (2022). Disponível em: <https://pheur.edqm.eu/home> Acessado em 20 de dezembro de 2024.

Escandar, G. M., Goicoechea, H. C., Muñoz de la Peña, A., Olivieri, A. C. (2014). Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, 806, 8-26.

Escandar, G.M., Olivieri, A.C. (2025). Contribution of multiway calibration to White Analytical Chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 417, 1219–1228.

Fania, L., Sampogna, F., Ricci, F., Hyeraci, M., Paradisi, A., Palese, E., Di Lella, G., Pallotta, S., Panebianco, A., Candi, E., Dellambra, E., Abeni, D. (2021). Systemic Photoprotection in Skin Cancer Prevention: Knowledge among Dermatologists. **Biomolecules**, 11, 332.

Ferraro, J. *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, Cambridge, MA, 2002.

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz. Repelentes contra insetos serão testados pela Fiocruz (2016). Disponível em: <https://rededengue.fiocruz.br/noticias/322-repelentes-contra-insetos-serao-testados-pela-fiocruz> Acessado 27 de setembro de 2023.

Fradin, M. S., Day, J. F. (2002). Comparative Efficacy of Insect Repellents against Mosquito Bites. **New England Journal of Medicine**, 347, 13–18.

Friedman, M., Wolf, R. (1996). Chemistry of soaps and detergents: Various types of commercial products and their ingredients. **Clinics in Dermatology**, 14, 7-13.

Gambino, I., Malitesta, C., Bagordo, F., Grassi, T., Panico, A., Fraissinet, S., De Benedetto, G. E. (2023). Characterization of microplastics in water bottled in different packaging by Raman spectroscopy. **Environmental Science: Water Research & Technology**, 9, 3391-3397.

Gao, W., Legido-Quigley, C. (2011). Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. **Journal of Chromatography A**, 1218, 4307-4311.

Giacomel, C. B., Dartora, G., Diefethaeler, H. S., Haas, S. E. (2013). Investigation on the use of expired make-up and microbiological contamination of mascaras. **International Journal of Cosmetic Science**, 35, 375-380.

Goicoechea, H. C., Olivieri, A. C. (2002). Chemometric assisted simultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples. **Analytica Chimica Acta**, 453, 289–300.

Goicoechea, H., Culzoni, M., García, M. G., Galera, M. M. (2011). Chemometric strategies for enhancing the chromatographic methodologies with second-order data analysis of compounds when peaks are overlapped. **Talanta**, 83, 1098-1107.

Gonçalves, T. R., Teixeira, G. G., Santos, P. M., Matsushita, M., Valderrama, P. (2023). Excitation-emission matrices and PARAFAC in the investigation of the bioactive compound effects from the flavoring process in olive oils. **Microchemical Journal**, 187, 108360.

Gowen, A., O'Donnell, C., Cullen, P., Downey, G., Frias, J. (2007). Hyperspectral imaging – an emerging process analytical tool for food quality and safety control. **Trends in Food Science & Technology**, 18, 590-598.

Guleken, Z., Jakubczyk, P., Paja, W., Pancerz, K., Wosiak, A., Yaylım, İ., İnal Gültekin, G., Tarhan, N., Hakan, M. T., Sönmez, D., Sarıbal, D., Arıkan, S., Depciuch, J. (2023). An application of raman spectroscopy in combination with machine learning to determine gastric cancer spectroscopy marker. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, 234, 107523.

Haaland, D.M., Thomas, E.V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, 60, 1193–1202.

Hafeez, F., Maibach, H. (2013). Do partition coefficients (lipophilicity/hydrophilicity) predict effects of occlusion on percutaneous penetration in vitro: a retrospective review. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, 32, 299-303.

Halberg, H. F. F., Bevilacqua, M., & Rinnan, Å. (2023). Is core consistency a too conservative diagnostic?. **Journal of Chemometrics**, 37(5), e3483.

Hai-Long W., Wang, T., Yu, R.-Q. (2020). Recent advances in chemical multi-way calibration with second-order or higher-order advantages: Multilinear models, algorithms, related issues and applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 130, 115954.

Hans, R. K., Agrawal, N., Verma, K., Misra, R. B., Ray, R. S., Farooq, M. (2008). Assessment of the phototoxic potential of cosmetic products. **Food and Chemical Toxicology**, 46, 1653-1658.

Huang, K., Wu, H., Wang, T., Dong, M., Yan, X., Yu, R. (2024). Chemometrics-assisted excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy for real-time migration monitoring of multiple polycyclic aromatic hydrocarbons from plastic products to food simulants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 304, 123360.

IFSCC. International Federation of Societies of Cosmetic Chemists. No. 2 1992. Disponível em: <https://ifsc.org/monographs/monograph-no-2-the-fundamentals-of-stability-testing/> Acesso em: 03 de Setembro de 2025.

Jabłoński, A. (1935). Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. **Zeitschrift für Physik**, 94(1-2), 38–46.

Jairoun, A. A., Al-Hemyari, S. S., Shahwan, M., Jamshed, S., Bisgwa, J. ((2022). Development and validation of a novel cosmetics safety assessment scale (CSAS): Factual understanding of cosmetic safety and fostering international awareness. **PLOS ONE**, 17(11), 0276938.

Jameson, D. M. (2014). Introduction to fluorescence. Taylor & Francis. Boca Raton.

Jaumot, J., de Juan, A., Tauler, R. (2015). MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 140, 1–12.

Jaumot, J., Tauler, R. (2010). MCR-BANDS: A user friendly MATLAB program for the evaluation of rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 103, 96-107.

Jaumot, J., Gargallo, R., De Juan, A., Tauler, R. (2005). A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: A new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 76, 101-110.

Jorio, A., Saito, R. (2021). Raman spectroscopy for carbon nanotube applications. **Journal of Applied Physics**, 129, 021102.

Jung, N., Namjoshi, S., Mohammed, Y. (2022). Application of Confocal Raman Microscopy for the Characterization of Topical Semisolid Formulations and their Penetration into Human Skin Ex Vivo. **Pharmaceutical Research**, 39, 935–948.

Kaushik, M., Farooq, U., Ali, M. S., Ansari, M. J., Iqbal, Z., Mirza, M. A. (2023). Safety Concern and Regulatory Status of Chemicals Used in Cosmetics and Personal Care Products. **Dermato**, 3, 131-157.

Kassim, H., Dimitrakopoulos, D. G. (2007). The European Commission and the future of Europe. *Journal of European Public Policy*, 14, 1249–1270.

Katz, T. M., Miller, J. H., Hebert, A. A. (2008). Insect repellents: Historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58, 865-871.

Kiers, L. H. A., Bro, R. (1999). PARAFAC2—Part I. A direct fitting algorithm for the PARAFAC2 model. **Journal of Chemometrics**, 13, 275-294.

Kim, T. H., Kim, M. G., Kim, M. G., Shin, B. S., Kim, K., Lee, J. B., Paik, S. H., Yoo, S. D. (2015). Simultaneous determination of phenoxyethanol and its major metabolite, phenoxyacetic acid, in rat biological matrices by LC–MS/MS with polarity switching: Application to ADME studies. **Talanta**, 144, 29-38.

Kishore, R. S. K., Kiese, S., Fischer, S., Pappenberger, A., Grauschopf, U., Mahler, H.-C. (2011a). The Degradation of Polysorbates 20 and 80 and its Potential Impact on the Stability of Biotherapeutics. **Pharmaceutical Research**, 28, 1194–1210.

Kishore, R. S. K., Pappenberger, A., Dauphin, I. B., Ross, A., Buergi, B., Staempfli, A., Mahler, H.-C. (2011b). Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 100, 721–731.

Kerwin, B. A. (2008). Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 97, 2924–2935.

Knowlton, J.L. (2000). Emulsion theory. In: Butler, H. Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps. Springer, Dordrecht.

Kramers, H.A., Heisenberg, W., "Über die streuung von strahlung durch atome". **Zeitschrift für Physik**. 31, 681, 1925.

Kumar, K., Mishra, A. K. (2012). Application of “multivariate curve resolution alternating least square (MCR–ALS)” analysis to extract pure component synchronous fluorescence spectra at various wavelength offsets from total synchronous fluorescence spectroscopy (TSFS) data set of dilute aqueous solutions of fluorophores. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 116, 78–86.

Kumar, K., Tarai, M., Mishra, A.K. (2017) Unconventional steady-state fluorescence spectroscopy as an analytical technique for analyses of complex-multifluorophoric mixtures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 97, 216–243.

Kumar, K., Mishra, A. K. (2013). Analysis of dilute aqueous multifluorophoric mixtures using excitation–emission matrix fluorescence (EEMF) and total synchronous fluorescence (TSF) spectroscopy: A comparative evaluation. **Talanta**, 117, 209–220.

Kumar, K., Mishra, A. K. (2015). Multivariate curve resolution alternating least square (MCR-ALS) analysis on total synchronous fluorescence spectroscopy (TSFS) data sets: Comparing certain ways of arranging TSFS-based three-way array. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 147, 66–74.

Kuo, P., Chang, C., Tseng, Y., Yau, H. (2024). Efficient, automatic, and optimized portable Raman-spectrum-based pesticide detection system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 308, 123787.

Labrenz, S. R. (2014). Ester Hydrolysis of Polysorbate 80 in mAb Drug Product: Evidence in Support of the Hypothesized Risk After the Observation of Visible Particulate in mAb Formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 103, 2268–2277.

Lakhal, L., Acha, V., Aussenac, T. (2012). PARAFAC analysis of front-face fluorescence data: Absorption and scattering effects assessed by means of Monte Carlo simulations. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 116, 112–122.

Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum Press, New York, 3rd ed.

Lal, N., Mishra, R. (2025). Revolution of Cosmetics: Cosmeceuticals. Cambridge Scholars Publishing.

Larkin, P. (2017). Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. Elsevier. Amsterdã.

Latif, A. (2021). Herbal Cosmets – Dermatology. Sankalp Publication.

Lee, E., An, S., Choi, D., Moon, S., Chang, I. (2007). Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives. **Contact Dermatitis**, 56, 131-136.

Lei, S., Guan, L., Liu, F., Yu, Q., Xu, K., Ren, H., Geng, J. (2024). Degradation of pharmaceuticals in UV/H₂O₂ process: EEM-based kinetic model, transformation products and corresponding toxicity evaluation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 12, 111736.

Lemes, L. F. R., Soares, F. L. F., Nagata, N. (2024). Determination of DEET, Icaridin, and IR3535 in insect repellents using excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy and multiway calibration. **Microchemical Journal**, 206, 111601.

Lile, D. J. (2023). FDA overview. *Translational Surgery*, 501-507.

Li, S., Li, T., Cai, Y., Yao, Z., He, M. (2024). Rapid quantitative analysis of Rongalite adulteration in rice flour using autoencoder and residual-based model associated with portable Raman spectroscopy. ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, 304, 123382.

Li, Y., Wu, H.-L., Yu, Y.-J., Zhang, S.-R., Chen, Y., Tu, D.-Z., Nie, C. -C., Xu, H., Yu, R.-Q. (2012). A novel method to handle Rayleigh scattering in three-way excitation-emission fluorescence data. ***Analytical Methods***, 4, 3987.

Li, Y., Qi, X., Rong, L., Li, J., Shen, M., Xie, J. (2024). Effect of gellan gum on the rheology, gelling, and structural properties of thermally induced pea protein isolate gel. ***Food Hydrocolloids***, 147, 109379.

Li, F., Zhang, W. (2015). Stability and rheology of W/Si/W multiple emulsions with polydimethylsiloxane. ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, 470, 290-296.

Lin, Y., Li, X.K., Yan, J.Y. (2022). EEFM combined with N-PLS method for the quantitative determination of psoralen in cosmetics. ***Chemical Papers***, 76, 5819–5825.

Lupi, E., Hatz, C., Schlagenhauf, P. (2013). The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. – A literature review. ***Travel Medicine and Infectious Disease***, 11, 374–411.

Long, W., Wu, H., Wang, T., Dong, M., Yu, R. (2021). Interference-free analysis of multi-class preservatives in cosmetic products using alternating trilinear decomposition modeling of liquid chromatography diode array detection data. ***Microchemical Journal***, 162, 105847.

Macosko, C. W. (1994). *Rheology: Principles, measurements, and applications*. John Wiley & Sons, Nova York.

Março, P. H., Valderrama, P., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., Tauler, R. (2014). Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares: Description, Operation and Applications. ***Química Nova***, 37, 1525-1532.

Martins, I., Carreira, F. C., Canaes, L. S., De Souza Campos Junior, F. A., Da Silva Cruz, L. M., Rath, S. (2011). Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode. ***Talanta***, 85, 1-7.

Martins, A. M., Marto, J. M. (2023). A sustainable life cycle for cosmetics: From design and development to post-use phase. ***Sustainable Chemistry and Pharmacy***, 35, 101178.

- Martos, A., Koch, W., Jiskoot, W., Wuchner, K., Winter, G., Friess, W., Hawe, A. (2017). Trends on Analytical Characterization of Polysorbates and Their Degradation Products in Biopharmaceutical Formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 106, 1722-1735.
- Mazivila, S. J., Soares, J. X., Santos, J. L. (2022). A tutorial on multi-way data processing of excitation-emission fluorescence matrices acquired from semiconductor quantum dots sensing platforms. **Analytica Chimica Acta**, 1211, 339216.
- Matwiejczuk, N., Galicka, A., Brzóska, M. M. (2020). Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. **Journal of Applied Toxicology**, 40, 176-210.
- McMullen, R. L. (2023). History of Natural Ingredients in Cosmetics. **Cosmetics**, 10, 71.
- McCreery, R.L, Raman spectroscopy for chemical analysis, Wiley-interscience publication, 157, 2000.
- Menter, J.M. (2006). Temperature dependence of collagen fluorescence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 5, 403–410.
- Mezger, Thomas G. The Rheology Handbook. Ed. by Thomas G Mezger. 4. ed. Hanover: Vincentz Network, 2014. P. 432.
- Miralles, P., Vrouvaki, I., Chisvert, A., Salvador, A. (2016). Determination of alternative preservatives in cosmetic products by chromophoric derivatization followed by vortex-assisted liquid–liquid semimicroextraction and liquid chromatography. **Talanta**, 154, 1-6.
- Molins-Delgado, D., García-Sillero, D., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2018). On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for insect repellent residue analysis in surface waters using atmospheric pressure photoionization. **Journal of Chromatography A**, 1544, 33–40.
- Monzón, C. M., Teglia, C. M., Delfino, M. R., Goicoechea, H. C. (2018). Multiway calibration strategy with chromatographic data exploiting the second-order advantage for quantitation of three antidiabetic and three antihypertensive drugs in serum samples. **Microchemical Journal**, 136, 185-192.
- Moretti, M. L., Cândido Recco, A. A., Becker, D. (2024). Sputtering: An eco-friendly technique to obtain polymer-metal hybrids. **Journal of Applied Polymer Science**, 141, 54888.
- Mortera, P., Zuljan, F. A., Magni, C., Bortolato, S. A., Alarcón, S. H. (2018). Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. **Talanta**, 178, 15-23.

- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., Bro, R. (2013). Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques PARAFAC. **Analytical Methods**, 5, 6557.
- Neto, Benício Barros, Ieda, Spacino Scarminio, Roy, Edward Bruns. (2010). Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Bookman Editora.
- Nie, J., Wu, H., Zhu, S., Han, Q., Fu, H., Li, S., Yu, R. (2008). Simultaneous determination of 6-methylcoumarin and 7-methoxycoumarin in cosmetics using three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration methods. **Talanta**, 75, 1260-1269.
- Olivieri, A. C. (2014). Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. **Chemical Reviews**, 114, 5358–5378.
- Olivieri, A.C. (2005), On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties. **Journal of Chemometrics**, 19, 253-265.
- Olivieri, A. C., Escandar, G. M., Goicoechea, H. C., de la Peña, A. M. (2015). Fundamentals and analytical applications of multiway calibration (Vol. 29). Elsevier. Amsterdã.
- Pal, R. (2008). A new linear viscoelastic model for emulsions and suspensions. *Polymer Engineering & Science*, 48, 1250–1253.
- Parastar, H., Akvan, N. (2014). Multivariate curve resolution based chromatographic peak alignment combined with parallel factor analysis to exploit second-order advantage in complex chromatographic measurements. **Analytica Chimica Acta**, 816, 18-27.
- Park, Y.W., Hong, P. (2024). Timeless Elegance: Tracing the Dynamic Evolution of Cosmetics Through History. In: *Cosmetics Marketing Strategy in the Era of the Digital Ecosystem*. Springer, Singapore.
- Passeron, T., Lim, H. W., Goh, L., Kang, H. Y., Ly, F., Morita, A., Candiani, J. O., Puig, S., Schalka, S., Wei, L., Dréno, B., Krutmann, J. (2021). Photoprotection according to skin phototype and dermatoses: Practical recommendations from an expert panel. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 35, 1460-1469.
- Pellacani, S., Citti, C., Strani, L., Benedetti, B., Becchi, P., Pizzamiglio, V., Michelini, S., Cannazza, G., De Juan, A., Cocchi, M., Durante, C. (2024). Comparative analysis of features extraction protocols for LC-HRMS untargeted metabolomics in mountain cheese ‘identification’. **Microchemical Journal**, 207, 111863.
- Peter, P. O., Ifon, B. E., Nkinahamira, F., Lasisi, K. H., Li, J., Hu, A., Yu, C. (2024). Harnessing the composition of dissolved organic matter in lagoon sediment in association with rare earth elements using fluorescence and UV–visible absorption spectroscopy. **Science of The Total Environment**, 908, 168139.

Patil, A., Sægrov, B., Panjwani, B. (2022). Advanced deep learning for dynamic emulsion stability measurement. **Computers & Chemical Engineering**, 157, 107614.

Piao, C., Chen, L., Wang, Y. (2014). A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens. **Journal of Chromatography B**, 969, 139-148.

Poddębniak, P. (2024). A Survey of Preservatives Used in Cosmetic Products. **Applied Sciences**, 14(4), 1581.

Qin, Y., Qiu, J., Tang, N., He, Y., Fan, L. (2024). Deep learning analysis for rapid detection and classification of household plastics based on Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 309, 123854.

Raman, C.V., Krishnan, K.S. (1928). "A new type of secondary radiation". **Nature**, 121, 501.

Rathee, P., Sehrawat, R., Rathee, P., Khatkar, A., Akkol, E. K., Khatkar, S., Redhu, N., Türkcanoglu, G. (2023). Polyphenols: Natural Preservatives with Promising Applications in Food, Cosmetics and Pharma Industries; Problems and Toxicity Associated with Synthetic Preservatives; Impact of Misleading Advertisements; Recent Trends in Preservation and Legislation. **Materials**, 16(13), 4793.

Riesmeier, M., Keute, J., Veall, M., Borschneck, D., Stevenson, A., Garnett, A., Williams, A. Ragan, M., Devière, T. (2022). Recipes of Ancient Egyptian kohls more diverse than previously thought. **Scientific Reports**, 12, 1-11.

Rente, D., Cvjetko Bubalo, M., Panić, M., Paiva, A., Caprin, B., Radojčić Redovniković, I., Duarte, A. R. C. (2022). Review of deep eutectic systems from laboratory to industry, taking the application in the cosmetics industry as an example. **Journal of Cleaner Production**, 380, 135-147.

Rinnan, Å., Booksh, K. S., Bro, R. (2005). First order Rayleigh scatter as a separate component in the decomposition of fluorescence landscapes. **Analytica Chimica Acta**, 537, 349–358.

Robertson J.L, Dervisis N, Rossmeisl J, Nightengale M, Fields D, Dedrick C, Ngo L, Issa AS, Guruli G, Orlando G., Senger R.S (2024) Cancer detection in dogs using rapid Raman molecular urinalysis. *Frontiers in Veterinary Science*. 11,1328058.
Romani, A., Clementi, C., Miliani, C., Favaro, G. (2010). Fluorescence Spectroscopy: A Powerful Technique for the Noninvasive Characterization of Artwork. **Accounts of Chemical Research**, 43, 837–846.

Ross-Murphy, S. B. (1992). Structure and rheology of gelatin gels: Recent progress. **Polymer**, 33, 2622-2627.

- Sabin, G. P., de Souza, A. M., Breitzkreitz, M. C., Poppi, R. J. (2012). Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e correção de spikes em espectroscopia raman de imagem. **Química Nova**, 35, 612–615.
- Samsøe-Petersen, L., Winther-Nielsen, M., Madsen, T. (2003). Fate and effects of triclosan. **Danish Environmental Protection Agency**, 861, 47.
- Schramm, Gebhard. Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos. 1a. ed. São Paulo: Artliber, 2006.
- Scognamiglio, J., Jones, L., Letizia, C., Api, A. (2012). Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. **Food and Chemical Toxicology**, 50, S244-S255.
- Sena, M. M., Trevisan, M. G., Poppi, R. J. (2005). PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química Nova**, 28, 910–920.
- Shariati-Rad, M., Hasani, M. (2009). Application of multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) for secondary structure resolving of proteins. **Biochimie**, 91, 850–856.
- Shevtsova, T., Maalihan, R. D., Demchuk, Z., Byrd, C. J., Caldona, E. B., Voronov, A. (2025). Rheological study of biobased structured emulsions for pharmaceutical and cosmetic applications. **Polymer**, 339, 129107.
- Shrestha, B., Lee, Y. (2020). Cellular and molecular mechanisms of DEET toxicity and disease-carrying insect vectors: a review. **Genes & Genomics**. 42, 1134-1144.
- Shukat, R., Bourgaux, C., Relkin, P. (2012). Crystallisation behaviour of palm oil nanoemulsions carrying vitamin E: DSC and synchrotron X-ray scattering studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 108, 153-161.
- Sil, S., Umapathy, S. (2014). Raman spectroscopy explores molecular structural signatures of hidden materials in depth: Universal Multiple Angle Raman Spectroscopy. **Scientific Reports**, 4, 1-7.
- Silva, D. I. O., Vilar, W. T. S., Pontes, M. J. C. (2020). Chemometric-assisted UV spectrophotometric method for determination of N, N- diethyl-3-methylbenzamide in insect repellents. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 241, 118660.
- Skoog, D.A., Holler, J.F, West, D.M. Fundamentos de Química Analítica. Vol. 2. 9ªEd. Cengage Learning. 2015.
- Skoog D.A., Holler, J.F, Crouch, S.R. Principios del análisis instrumental. 6 Ed. Cengage Learning. 2009.
- Smekal, A., "Zur quantentheorie der dispersion". *Naturwissenschaften*. 11, 873, 1923.

Smith, E., Dent, G., Modern Raman spectroscopy: a practical approach. 2013: John Wiley & Sons. Nova York.

Soares, F. L. F., Carneiro, R. L. (2013). Green Synthesis of Ibuprofen–Nicotinamide Cocrystals and In-Line Evaluation by Raman Spectroscopy, **Crystal Growth & Design**, 13, 1510-1517.

Socrates, G., Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. 2004: John Wiley & Sons. Nova York.

Sutton, J.A., Fisher, B.T. Fleming, J.W. (2008). A laser-induced fluorescence measurement for aqueous fluid flows with improved temperature sensitivity. **Experiments in Fluids**, 45, 869–881.

Tauler, R. (1995). Multivariate curve resolution applied to second order data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 30, 133–146.

Tauler, R., Maeder, M., de Juan, A. (2020). Multiset Data Analysis: Extended Multivariate Curve Resolution. **Comprehensive Chemometrics**, 305–336.

Tan, L., Du, W., Zhang, Y., Tang, L.-J., Jiang, J.-H., Yu, R.-Q. (2020). Rayleigh scattering correction for fluorescence spectroscopy analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 203, 104028.

Tanikawa, C. Cosmetologia e Estética. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A, 2015. 240.

Tao, X., Chen, C., Li, Y., Qin, X., Zhang, H., Hu, Y., Liu, Z., Guo, X., Liu, G. (2023). Improving the physicochemical stability of Pickering emulsion stabilized by glycosylated whey protein isolate/cyanidin-3-glucoside to deliver curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 229, 1-10.

Tavares, M., da Silva, M. R. M., de Oliveira de Siqueira, L. B., Rodrigues, R. A. S., Bodjolle-d’Almeida, L., dos Santos, E. P., Ricci-Júnior, E. (2018). Trends in insect repellent formulations: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, 539, 190–209.

Tippavajhala, V.K., Magrini, T.D., Matsuo, D.C. (2018). In Vivo Determination of Moisturizers Efficacy on Human Skin Hydration by Confocal Raman Spectroscopy. **AAPS PharmSciTech**, 19, 3177–3186.

Toledo, L. F., Turchetti, D. A., Glisler, A. P., Nowacki, B., Basílio, F. C., Marletta, A., Kowalski, E. L., Akcelrud, L. (2022). Correlation of electronic and vibrational properties with the chiro-optical activity of polyfluorene copolymers. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 276, 121180.

Tsai, J., Chien, A.L. (2022). Photoprotection for Skin of Color. **American Journal of Clinical Dermatology**, 23, 195–205.

Tu, S., Li, Q., Nie, L., Gao, H., Yu, H. (2024). Applying fluorescence spectroscopy with absolute principal component coefficient to explore dynamic migration of DOM fractions from an urbanized river during torrential rainfall. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 314, 124206.

U.S. Food and Drug Administration, Parabens in Cosmetics. Disponível em: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/parabens-cosmetics> Acesso em 1 de Setembro de 2025.

Valderrama, P., Braga, J. W. B., Poppi, R. J. (2009). Estado da arte de Figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, 32(5), 1278–1287.

Valuer, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, New York.

Vali Zade, S., Forooghi, E., Jannat, B., Hashempour-baltork, F., Abdollahi, H. (2023). A combined classification modeling strategy for detection and identification of extra virgin olive oil adulteration using Raman spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 240, 104903.

Van Duuren, B. L. (1963). Effects of the Environment on the Fluorescence of Aromatic Compounds in Solution. **Chemical Reviews**, 63, 325-354.

Venkataramani, D., Tsulaia, A., Amin, S. (2020). Fundamentals and applications of particle stabilized emulsions in cosmetic formulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, 283, 102234.

Vilar, W. T. S., Sousa, E. S., Pinto, L., Ugulino de Araújo, M. C., Coelho Pontes, M. J. (2018). Development and validation of a HPLC method to quantify DEET and IR3535 in insect repellents. **Analytical Methods**, 10, 1911–1917.

Vilar, W. T. S., Barbosa, M. F., Pinto, L., de Araújo, M. C. U., Pontes, M. J. C. (2019). Determination of N, N-diethyl-3-methylbenzamide and ethyl-butyl-acetylaminopropionate in Insect repellent using near infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Microchemical Journal**, 152, 104285.

Vitku, J., Horackova, L., Kolatorova, L., Duskova, M., Skodova, T., Simkova, M. (2023). Derivatized versus non-derivatized LC-MS/MS techniques for the analysis of estrogens and estrogen-like endocrine disruptors in human plasma. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 260, 115083.

Wang, T., Liu, Q., Long, W., Chen, A., Wu, H., Yu, R. (2021). A chemometric comparison of different models in fluorescence analysis of dabigatran etexilate and dabigatran. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 246, 118988.

Wang, F., Chen, Y., Liang, Y., Yang, M., Kang, C. (2023). Interference-free quantitation of aromatic amino acids in two complex systems by three-way calibration with ultraviolet–visible spectrophotometer: Exploration of trilinear decomposition of

spectrum-pH data. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 290, 122293.

Wang, W., Nie, M., Yan, C., Yuan, Y., Xu, A., Ding, M., Wang, P., Ju, M. (2024). Effect of pyrolysis temperature and molecular weight on characterization of biochar derived dissolved organic matter from invasive plant and binding behavior with the selected pharmaceuticals. **Environmental Pollution**, 348, 123867.

Wang, P., Ding, X., Li, Y., Ang, U. (2012). Simultaneous Determination of Eleven Preservatives in Cosmetics by Micellar Electrokinetic Chromatography. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, 95, 1069-1073.

Wang, J., Wu, H., Chen, Y., Zhai, M., Qing, X., Yu, R. (2013). Quantitative determination of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in cosmetics using three-dimensional fluorescence coupled with second-order calibration. **Talanta**, 116, 347-353.

Wang, S., Cheng, Q., Yuan, Y., Wang, C., Ma, S. (2019). Determination of adulterated gasoline using fluorescence emission-excitation matrices and multivariate calibration. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 210, 260–265.

Wang, Q., Zhang, H., Han, Y., Cui, Y., Han, X. (2023). Study on the relationships between the oil HLB value and emulsion stabilization. **RSC Advances**, 13, 24692-24698.

Weber, J., Buske, J., Mäder, K., Garidel, P., Diederichs, T. (2023). Oxidation of polysorbates – An underestimated degradation pathway?. **International Journal of Pharmaceutics**: X, 6, 100202.

WHO – World Health Organization. World Mosquito Program. Disponível em: <https://www.worldmosquitoprogram.org/en/news-stories/stories/world-neglected-tropical-disease-day-fight-end-disease#:~:text=Dengue%20is%20one%20of%20,marginalised%20communities%20across%20the%20globe>. Acessado 18 de Dezembro de 2024

WHO – World Health Organization. Vector-Borne diseases. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> Acessado 27 de setembro de 2023.

WHO – World Health Organization. Dengue and severe dengue. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Acessado 27 de setembro de 2023.

WHO – World Health Organization. Zika virus. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acessado em 27 de setembro de 2023.

WHO – World Health Organization. DEET specification WHO. Disponível em: <https://archive.epa.gov/hsrb/web/pdf/whodeetspecificationdecember1999.pdf> Acessado em 28 de setembro de 2023.

WHO - World Health Organization. Icaridin specification WHO. Disponível em: <https://extranet.who.int/prequal/vector-control-product/document/icaridin> Acessado 28 de setembro de 2023.

WHO - World Health Organization. IR3535 specification WHO. Disponível em: <https://archive.epa.gov/osa/hsrb/web/pdf/whoir3535evaluationapril2006.pdf> Acessado 28 de setembro de 2023.

Wu, R, Zhu, X, Xing, Y, Guan, G, Zhang, Y, Hui, R, Cui, Q, Liu, Z, Zhu, L. (2023). Association of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) with hyperuricemia among adult participants. **Chemosphere**, 338, 139320.

Wu, Q., Geng, T., Yan, M., Peng, Z., Chen, Y., Lv, Y., Yin, X., Gu, H. (2024). Geographical origin traceability and authenticity detection of Chinese red wines based on excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and chemometric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, 125, 105763.

Wu, L., Shibukawa, M., Oguma, K. (1998). An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC–DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons. **Journal of Chemometrics**, 12, 1-26.

Xiao Q, Chen G, Zhang Y-H, Chen F-Q, Weng H-F, Xiao A-F. (2021). Agarose Stearate-Carbomer940 as Stabilizer and Rheology Modifier for Surfactant-Free Cosmetic Formulations. **Marine Drugs**, 19(6), 344.

Xie, L., Luo, S., Liu, Y., Ruan, X., Gong, K., Ge, Q., Zhang, L. (2023). Automatic identification of individual nanoplastics by Raman spectroscopy based on machine learning. **Environmental Science & Technology**, 57, 18203-18214.

Xue, Y., Chen, N., Luo, C., Wang, X., Sun, C. (2013). Simultaneous determination of seven preservatives in cosmetics by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance capillary electrophoresis. **Analytical Methods**, 5, 2391-2397.

Yan, C., Wang, X., Nie, M., Mo, X., Ding, M., Chen, J., Yang, Y. (2024). Characteristics of microplastic-derived dissolved organic matter and its binding with pharmaceuticals unveiled by fluorescence spectroscopy and two-dimensional correlation spectroscopy. **Science of The Total Environment**, 908, 168190.

Yazdankhah SP, Scheie AA, Høiby EA, Lunestad BT, Heir E, Fotland TØ, Naterstad K, Kruse H. (2006). Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. **Microbial Drug Resistance**. 12, 83-90.

Yin, X., Gu, H., Jalalvand, A. R., Liu, Y., Chen, Y., Peng, T. (2018). Dealing with overlapped and unaligned chromatographic peaks by second-order multivariate

calibration for complex sample analysis: Fast and green quantification of eight selected preservatives in facial masks. **Journal of Chromatography A**, 1573, 18-27.

Yu, S., Xiao, X., Xu, G. (2016). Eliminating Rayleigh and Raman scattering in threedimensional fluorescence spectroscopy by kriging interpolation. **Journal of Applied Spectroscopy**, 83, 786–791.

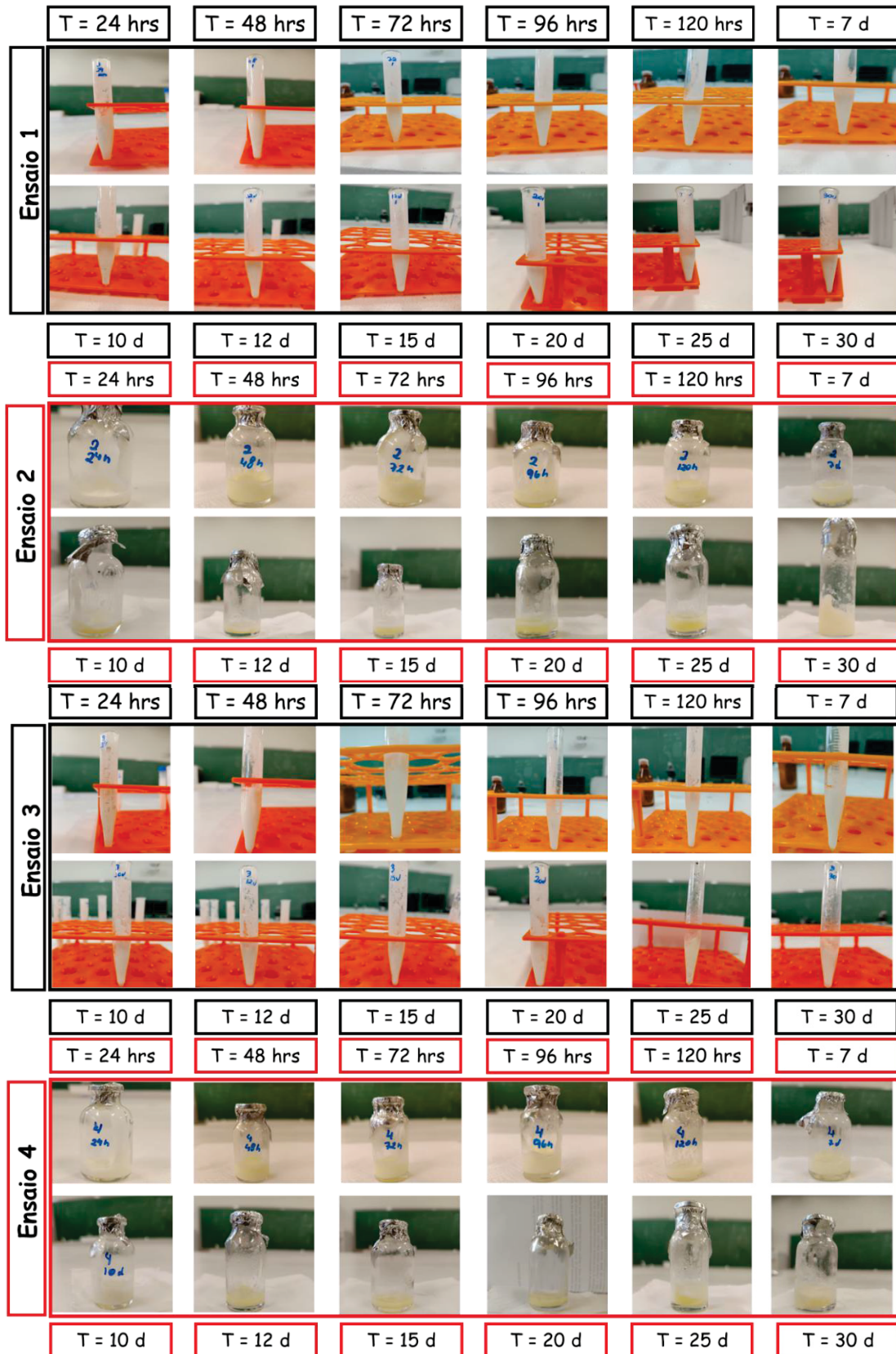
Zhao, X., Li, D., Wang, L., Wang, Y. (2022). Rheological properties and microstructure of a novel starch-based emulsion gel produced by one-step emulsion gelation: Effect of oil content. **Carbohydrate Polymers**, 281, 119061.

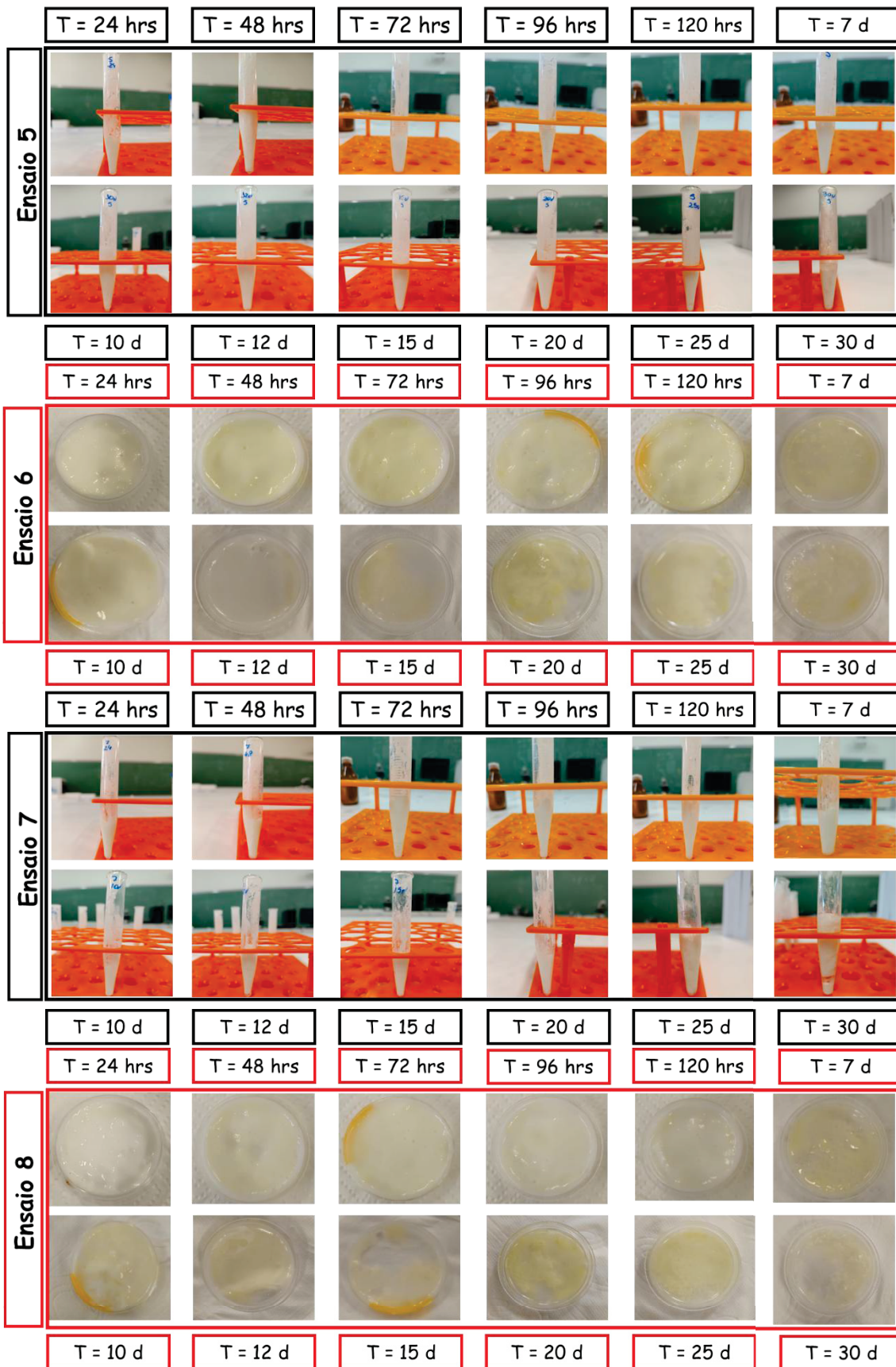
Zhang, L., Shang, Q., Zhao, Y. (2022). Real-time and simultaneous assay of monophenolase and diphenolase activity in tyrosinase catalyzed cascade reactions by combination of three-way calibration and excitation-emission matrix fluorescence. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 414, 2439–2452.

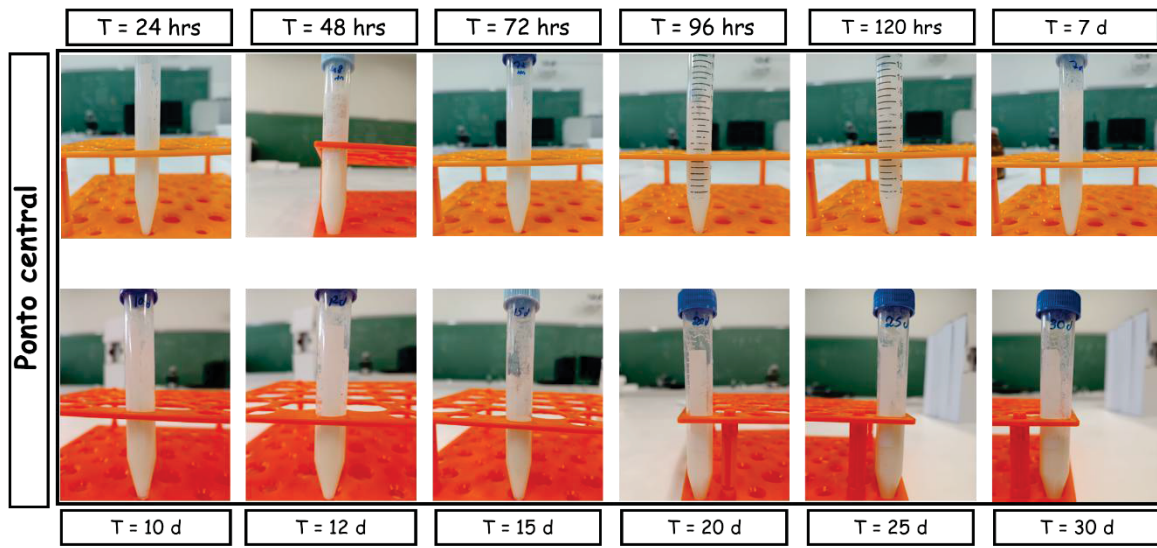
Zhang, Z., Zhang, X., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Xu, C, Wang, H. T. (2019). Crack Propagation and Fracture Toughness of Graphene Probed by Raman Spectroscopy. **ACS Nano**, 13, 10327-10332.

Zhu, W., Zhao, N. J., Yang, R. F., Chen, Y. N., Chen, X. W., Yin, G. F., Liu, J. G., Liu, W. Q. (2020). Simultaneous measurement of phenols by three-way fluorescence spectroscopy: A comparison of N-PLS/RBL, U-PLS/RBL and PARAFAC. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 239, 118511.

APÊNCIDE A – FOTOS DOS EXPERIMENTOS DA SEÇÃO 2







APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO DA TESE



Microchemical Journal

Volume 206, November 2024, 111601



Determination of DEET, Icaridin, and IR3535 in insect repellents using excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy and multiway calibration

Leonardo Francisco Rafael Lemes  , Frederico Luis Felipe Soares, Noemi Nagata

Show more 

 Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111601> ↗

Get rights and content ↗