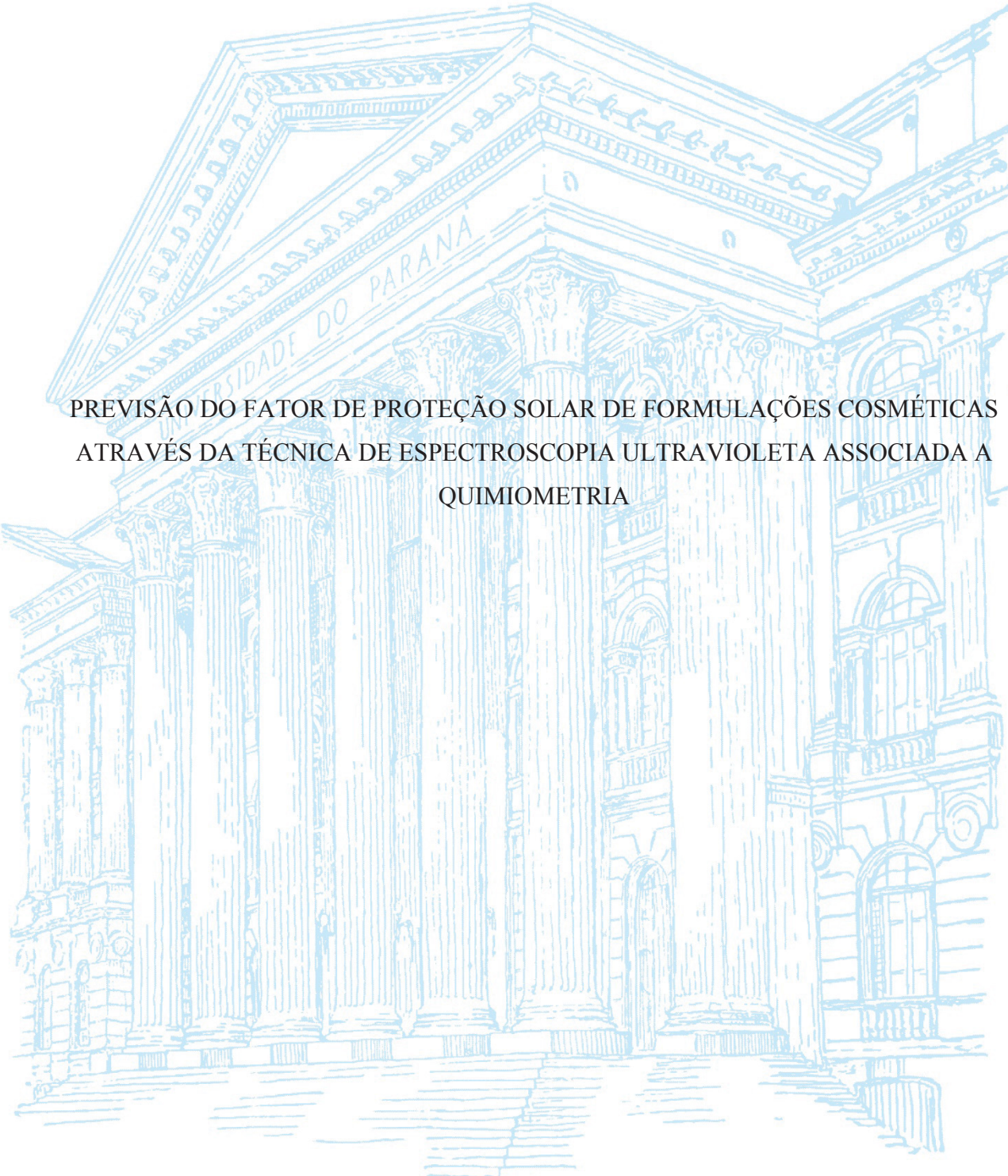


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA FLÁVIA SCHETTINO OLIVEIRA



PREVISÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS  
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA ASSOCIADA A  
QUIMIOMETRIA

CURITIBA

2019

CAMILA FLÁVIA SCHETTINO OLIVEIRA

PREVISÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS  
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA ASSOCIADA A  
QUIMIOMETRIA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Dias Britto do Amaral

Coorientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

---

- O48p Oliveira, Camila Flávia Schettino  
Previsão do fator de proteção solar de formulações cosméticas através da técnica de espectroscopia ultravioleta associada a quimiometria [recurso eletrônico] / Camila Flávia Schettino Oliveira – Curitiba, 2019.
- Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.  
Orientadora: Profa. Dra. Clarice Dias Britto do Amaral  
Coorientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata
1. Espectroscopia de ultravioleta. 2. Proteção solar. 3. Quimiometria.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Amaral, Clarice Dias Britto do. III. Nagata, Noemi. IV. Título.

CDD: 547.3533

---

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILA FLÁVIA SCHETTINO OLIVEIRA** intitulada: **PREVISÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA ASSOCIADA A QUIMIOMETRIA**, sob orientação da Profa. Dra. CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 09 de Setembro de 2019.



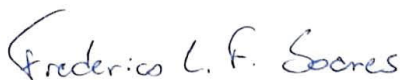
CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MARIA VALÉRIA ROBLES VELASCO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)



FREDERICO LUIS FELIPE SOARES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DEDICO este trabalho à minha família pela força, apoio e amor incondicionais. Especialmente aos meus pais, cujos cuidados e ensinamentos foram base para a construção do meu caráter e minha maior motivação. E ao meu querido padrinho, que me fez enxergar desde muito cedo o real valor do conhecimento, meu exemplo e inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus mais sinceros e profundos agradecimentos, principalmente a minha família... meu pai Carlos, mãe Itália, amor e companheiro Marcos, irmão Beto, e amados sobrinhos Carlos Eduardo e Arthur que foram sem dúvida a maior fonte de força e inspiração durante esta caminhada. Muito obrigada pela compreensão nos momentos de ausência, pelo respeito, carinho, apoio e amor incondicionais, mesmo nas horas mais difíceis.

Ao meu querido padrinho e tio Alcemar, que nos deixou este ano, e foi fonte de inspiração pela decisão de trilhar o caminho na busca do conhecimento. Agora é saudade, do carinho, da amizade, do amor e dos constantes aprendizados em todos os aspectos da vida. Muito obrigada por ter feito e fazer para sempre parte da minha vida.

Outro agradecimento muito especial às minhas orientadoras Dra. Clarice Dias Britto do Amaral e Dra. Noemi Nagata, que tornaram essa realização possível. Foram elas que acreditaram na minha capacidade de desenvolver este projeto, e estiveram ao meu lado ao longo de cada dificuldade, que além de discussões técnicas, críticas construtivas, muita paciência também e foram apoio, dedicação e abraços acolhedores.

Também gostaria de agradecer a todas as pessoas que cruzaram eu caminho ao longo desses dois anos, colegas acadêmicos e colegas de trabalho que colaboraram com palavras de carinho, sugestões, críticas, e trouxeram incentivo e leveza nos momentos de maior desânimo.

Agradeço ao Grupo Boticário, na pessoa de Carla Abdo Brohem e Márcio Lorencini, pelo incentivo e confiança na iniciação desse projeto e por reconhecerem a importância da busca pelo aperfeiçoamento acadêmico como forma de crescimento pessoal e profissional, além do carinho e compreensão ao longo desta caminhada.

E por último o meu muito obrigada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Paraná que me proporcionaram a inestimável oportunidade de fazer parte deste programa, confiaram em meu trabalho e possibilitaram a realização deste projeto em parceria, que impactou tão positivamente na minha formação.

*“O sábio atinge sabedoria sem erudição;  
alcança sua meta sem esforço;  
termina sua jornada sem viajar.”*

**Lao Tsé**



## RESUMO

Apesar dos conhecidos efeitos positivos da radiação solar ao ser humano, há possíveis prejuízos à saúde, como o câncer de pele, e neste sentido, para manutenção da saúde e prevenção deste tipo de doença, é recomendado o uso de protetores solares durante a exposição solar. A medida do fator de proteção solar (FPS), assim como as demais avaliações da eficácia de protetores solares, são de vital importância para a indústria cosmética. Os protetores solares são compostos por substâncias químicas (orgânicas e/ou inorgânicas) que são capazes de absorver, refletir ou dissipar a radiação UV incidente, de modo a prevenir que ela entre em contato com a pele. Existem regras específicas para o seu desenvolvimento, fabricação e comercialização no mercado. A avaliação da eficácia, ou seja, seu FPS e o fator de proteção UVA do produto (FPUVA), envolvem uma resposta biológica, a vermelhidão e pigmentação da pele, respectivamente, portanto, são avaliados através de metodologias *in vivo*, que exigem a exposição de participantes humanos à radiação UV. Atualmente existe um método *in vitro* alternativo ao teste *in vivo* para a determinação do FPUVA, utilizando espectrometria ultravioleta. Devido a necessidade de desenvolvimento de uma metodologia *in vitro* também para a determinação do FPS, o presente trabalho propõe um método de predição, empregando espectroscopia ultravioleta associada a ferramentas quimiométricas. Para isso, trinta amostras de protetores solares comerciais rotulados como FPS 15, 30 e 50, foram submetidas à análise por espectroscopia ultravioleta, seguindo uma adaptação do método ISO 24443:2012. Os espectros foram submetidos ao método de análise por componentes principais (PCA), que trouxe indícios de agrupamentos do FPS nominal pelo perfil espectral dos produtos. A partir destes dados um modelo de classificação PLS-DA foi gerado com o objetivo de prever o FPS do produto, 15, 30 ou 50. O modelo proposto foi considerado satisfatório para o objetivo descrito, apresentando um RMSEC de aproximadamente 0,5 com 3 LV e assertividade na predição das classes, de cerca de 75% dos produtos que compõem os conjuntos de calibração e validação externa. O método proposto mostra-se promissor durante o desenvolvimento de produtos em indústria cosmética e farmacêutica, como uma alternativa ou complementação ao uso de humanos em testes prévios preditivo, além de representar simplicidade de execução, redução de tempo e custo.

Palavras-chave: Espectroscopia ultravioleta, proteção solar, FPS, quimiometria, PLS-DA, PCA.



## ABSTRACT

Despite the positive effects of the solar radiation to humans, there are some health risks, such as skin cancer, and in this regard, to reduce the risk of this type of disease, it is recommended to use sunscreens during the sun exposure. The main benefit of sunscreens is the sun protection factor (SPF), and the evaluation of this type of product is of vital importance to the cosmetic industry. Sunscreens contains chemicals that can absorb, reflect or dissipate UV radiation to prevent contact with the skin, and there are specific rules for their development, manufacture and marketing in the market. One important topic about this kind of products, is the efficacy assessment of the SPF and the FPUVA (factor protection against UVA) and as both involves a biological response: redness and pigmentation of the skin, respectively, to evaluate this two endpoints, it's necessary to submit human participants to UV radiation. However, there is currently an alternative *in vitro* method to *in vivo* testing for the determination of FPUVA, using ultraviolet spectrometry but there isn't a substitute for the SPF protocol. For this reason, the propose of the present work is to propose a prediction method to estimate the SPF *in vivo*, using ultraviolet spectroscopy associated with chemometric tools. For this evaluation, samples with SPF of 15, 30 and 50 were analyzed by ultraviolet spectroscopy, following an adaptation of the ISO 24443: 2012 method and their spectra were subjected to the principal component analysis (PCA) method, which indicated some groupings according with de SPF of the products. Then, the data was submitted to a classification method (PLS-DA), and the PLS-DA model was generated with the following SPF products: 15, 30 or 50. The result of this research was satisfactory until the present, presenting RMSECV of approximately 0.5 with 3 LV and assertiveness of class prediction of 75% of the products. The method seems to be promising during the development of products in the cosmetic and pharmaceutical industry, as an alternative or complement to the use of humans in previous tests, especially because of your simplicity of execution and reduction of time and cost.

Keywords: Ultraviolet spectroscopy, sun protection, SPF, chemometrics, PLS-DA, PCA.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ILUSTRAÇÃO DA FISIOLOGIA DA PELE.....	22
FIGURA 2. IMAGEM ILUSTRATIVA DAS TONALIDADES DE PELE DOS FOTOTIPOS, SEGUNDO A ESCALA <i>FITZPATRICK</i> .....	24
FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO SOBRE A PENETRAÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA ATMOSFERA E NA PELE. ....	25
FIGURA 4. CATEGORIAS DOS ÍNDICES ULTRAVIOLETAS.....	28
FIGURA 5. MECANISMO DE AÇÃO DOS FILTROS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS...29	
FIGURA 6. TRANSIÇÃO ELETRÔNICA DAS RADIAÇÕES UV E CONVERSÃO EM VISÍVEL (VIS) E INFRAVERMELHO (IV) POR FOTOPROTETORES ORGÂNICOS.....	31
FIGURA 7. PRINCIPAIS CLASSES DE MOLÉCULAS ABSORVEDORAS DE UV: PABA, SALICILATO, CINAMATO, BENZILIDENO CÂNFORA. ....	32
FIGURA 8. DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ABSORBÂNCIA DOS FILTROS INORGÂNICOS $TiO_2$ E $ZnO$ NAS REGIÕES UVA E UVB.....	35
FIGURA 9. ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS DO TESTE DE FPS. ....	43
FIGURA 10. ILUSTRAÇÃO SOBRE O COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO DE PROTETORES SOLARES.....	44
FIGURA 11. EXEMPLIFICAÇÃO DO MODO DE ORGANIZAÇÃO DOS DADOS ESPECTRAIS. ....	50
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRUPOS X E Y DE MODELOS PLS DE PLS-DA.....	52
FIGURA 13. ILUSTRAÇÃO DO RESULTADO DA APLICAÇÃO DO PRÉ- PROCESSAMENTO "CENTRAR OS DADOS NA MÉDIA".....	54
FIGURA 14. EXEMPLIFICAÇÃO DE UM ESPECTRO ORIGINAL (A) E ALISADO COM JANELA DE 15 PONTOS.....	54
FIGURA 15. EXEMPLIFICAÇÃO DE GRÁFICO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTE VERSUS RMSECV. ....	56
FIGURA 16. FORMA DE ESPALHAMENTO DOS PRODUTOS NA PLACA DE PMMA .	63
FIGURA 17. ILUSTRAÇÃO DOS PONTOS DE MEDIÇÃO NA PLACA.....	64
FIGURA 18. ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE AQUISIÇÃO DAS MEDIDAS.....	64

FIGURA 19. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS GERAIS ENVOLVIDAS NA ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO.....	66
FIGURA 20. DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS A SEREM ESTUDADAS PARA OBTENÇÃO DE UM MODELO COM BOA CAPACIDADE DE PREVISÃO. ....	66
FIGURA 21. ESPECTROS UV-VIS NA REGIÃO ESPECTRAL ENTRE 290 E 450 NM, PARA AS 30 AMOSTRAS ANALISADAS. ....	67
FIGURA 22. GRÁFICO DE <i>SCORES</i> DE TODAS AS MEDIDAS PARA A 1ª E A 2ª COMPONENTES (PC1 <i>VERSUS</i> PC2) NA ANÁLISE DE PCA.....	69
FIGURA 23. GRÁFICOS DE <i>LOADINGS</i> DA PC1 (A) E PC2 (B) <i>VERSUS</i> COMPRIMENTO DE ONDA (NM).....	70
FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO UV DE ALGUNS DOS PRODUTOS AVALIADOS. (A) PRODUTO 2, PRODUTO 11 E PRODUTO 30 (PRESENTES NO LADO POSITIVO DA PC2); (B) PRODUTO 3; PRODUTO 5 E PRODUTO 9 (PRESENTES NO LADO NEGATIVO DA PC2).....	71
FIGURA 25. PERFIL ESPECTRAL DOS PRODUTOS 1 (FPS 15) E 9 (FPS 15).....	76
FIGURA 26. PERFIL ESPECTRAL DOS PRODUTOS 28 (FPS 50) E 33 (FPS 30).....	77
FIGURA 27. PERFIL ESPECTRAL DO PRODUTO 27 (FPS 50).....	78
FIGURA 28. GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA PC3 <i>VERSUS</i> COMPRIMENTO DE ONDA (NM).....	79
FIGURA 29. GRÁFICO BIDIMENSIONAL DE <i>SCORES</i> – PC1 <i>VERSUS</i> PC3. ....	80
FIGURA 30. GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA PC4 <i>VERSUS</i> COMPRIMENTO DE ONDA (NM).....	81
FIGURA 31. GRÁFICO BIDIMENSIONAL DE <i>SCORES</i> – PC1 <i>VERSUS</i> PC4 .....	81
FIGURA 32. GRÁFICO DE <i>SCORES</i> DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS DA PC1 <i>VERSUS</i> PC2. ....	82
FIGURA 33. GRÁFICO DE <i>SCORES</i> DA PC1 <i>VERSUS</i> PC2 NA ANÁLISE DE PCA DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DO CONJUNTO DE AMOSTRAS INTERNAS E EXTERNAS. ....	83
FIGURA 34. GRÁFICO TRIDIMENSIONAL DE <i>SCORES</i> DA PC1 <i>VERSUS</i> PC2 <i>VERSUS</i> PC3 NA ANÁLISE DE PCA DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DO CONJUNTO DE AMOSTRAS INTERNAS E EXTERNAS UTILIZADO PARA ESCOLHA DOS PRODUTOS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO. ....	84

FIGURA 35. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES E O ERRO DE CLASSIFICAÇÃO DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO PARA O MODELO PLS-DA.....	86
FIGURA 36. GRÁFICO DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO <i>VERSUS</i> COMPRIMENTO DE ONDA PARA DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES ((2LV, 3LV, 4LV, 5LV).....	87
FIGURA 37. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA <i>LEVERAGE VERSUS</i> RESÍDUOS DE <i>STUDENT</i> PARA MODELO ANTES DA RETIRADA DE AMOSTRAS ANÔMALAS, RESULTADOS COM 2VL PARA O MODELO PLS-DA.....	87
FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA <i>LEVERAGE VERSUS</i> RESÍDUOS DE <i>STUDENT</i> APÓS A RETIRADA DAS AMOSTRAS, RESULTADOS COM 2VL PARA O MODELO PLS-DA.....	89
FIGURA 39. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COEFICIENTE DE REGRESSÃO COM 2VL PARA O MODELO PLS-DA.....	89
FIGURA 40. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO VALOR PREVISTO PELO MODELO E O VALOR MEDIDO PARA O MODELO PLS-DA. (----) <i>THRESHOLD</i> OBTIDOS.....	92

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DESCRIÇÃO DA ESCALA <i>FITZPATRICK</i> . .....	23
TABELA 2. DESIGNAÇÃO DE CATEGORIA DE PROTEÇÃO (DCP) RELATIVA À PROTEÇÃO OFERECIDA PELO PRODUTO CONTRA RADIAÇÃO UVB E UVA PARA A ROTULAGEM DOS PROTETORES SOLARES. ....	37
TABELA 3. CATEGORIAS DE COR DE PELE EM FUNÇÃO DO ITA°. .....	40
TABELA 4. LIMITES DE ACEITAÇÃO E FPS DOS PRODUTOS EM TESTE PARA OS PROTETORES DE REFERÊNCIA PRECONIZADOS PELA NORMA. ....	41
TABELA 5. DESCRIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AVALIADOS. ....	62
TABELA 6. CODIFICAÇÃO DAS CLASSES PARA O MODELO PLS-DA. ....	65
TABELA 7. PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA DE CADA COMPONENTE PRINCIPAL PARA PCA CONSIDERANDO TODAS AS MEDIDAS. ....	69
TABELA 8. LISTA DE FILTROS UV PRESENTES NOS PRODUTOS ANALISADOS. ..	74
TABELA 9. DESCRIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS SETE AMOSTRAS EXTERNAS AVALIADAS. ....	83
TABELA 10. PRÉ-PROCESSAMENTOS TESTADOS PARA CONSTRUÇÃO DO MODELO. ....	85
TABELA 11. CLASSES REAIS E CLASSES PREVISTAS PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO DO MODELO PLS-DA. ....	91
TABELA 12. CLASSES REAIS E CLASSES PREVISTAS PARA O CONJUNTO DE VALIDAÇÃO DO MODELO PLS-DA. ....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABIHPEC</b>	Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CBC</b>	Carcinoma basocelulare
<b>CEC</b>	Carcinoma espinocelular
<b>CIE</b>	Comissão Internacional de Iluminação (do francês, <i>Commission Internationale de L'Eclairage</i> )
<b>CLS</b>	Regressão de Mínimos Quadrados Clássico (do inglês, <i>Classic Least Square Regression</i> )
<b>COC</b>	Comprimento de Onda Crítico
<b>COLIPA</b>	Associação da Indústria de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria (do francês, <i>Comité de Liaison de la Parfumerie</i> )
<b>CTFA</b>	Associação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Fragrâncias (do inglês, <i>Cosmetic Toiletry and Fragrance Association</i> )
<b>CV</b>	Validação Cruzada (do inglês, <i>Cross Validation</i> )
<b>DCP</b>	Designação de Categoria de Proteção
<b>DIN</b>	Instituto Alemão de Normalização (do alemão, <i>Deutsches Institut für Normung</i> )
<b>DME</b>	Dose Mínima Eritematosa (do inglês, <i>Minimal Erythema Dose - MED</i> )
<b>DMP</b>	Dose Mínima Pigmentária
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico (do inglês, <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
<b>E1%</b>	Coefficiente de extinção específica
<b>EMR</b>	Radiação eletromagnética (do inglês, <i>Eletromagnetic radiation</i> )
<b>FDA</b>	Administração de Comidas e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FFFS</b>	Espectroscopia de fluorescência da face dianteira (do inglês, <i>Front-Face Fluorescence Spectroscopy</i> )
<b>FPS</b>	Fator de Proteção Solar
<b>FPUVA</b>	Fator de proteção à radiação UVA
<b>HCA</b>	Métodos Hierárquicos (do inglês, <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> )
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>ILS</b>	Regressão de Mínimos Quadrados Inverso (do inglês, <i>Inverse Least Square Regression</i> )
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>INCI</b>	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (do inglês, <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i> )
<b>IR</b>	Radiação ionizante (do inglês, <i>Ionizing radiation</i> )
<b>ISO</b>	Organização internacional de padronização (do inglês, <i>International Organization for Standardization</i> )
<b>ITA°</b>	Ângulo Tipológico Individual (do inglês, <i>Individual Topological Angle</i> )
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )

<b>IUV</b>	Índice Ultravioleta
<b>IV</b>	Radiação Infravermelha
<b>JCIA</b>	Associação Japonesa de Indústria Cosmética (do inglês, <i>Japan Cosmetic Industry Association</i> )
<b>KC</b>	Queratinócitos (do inglês, <i>Keratinocytes</i> )
<b>k-NN</b>	k-ésimo Vizinho mais próximo (do inglês, <i>k-Nearest Neighbors</i> )
<b>LC</b>	Células de <i>Langerhans</i> (do inglês, <i>Langerhans Cells</i> )
<b>LDA</b>	Análise Discriminante Linear (do inglês, <i>Linear Discriminant Analysis</i> )
<b>LV</b>	Variável Latente (do inglês, <i>Latent Component</i> )
<b>MC</b>	Melanócitos (do inglês, <i>Melanocytes</i> )
<b>MERCOSUL</b>	Mercado Comum do Sul
<b>MIRS</b>	Espectroscopia no Infravermelho Médio (do inglês, <i>Medium Infrared Spectroscopy</i> )
<b>MKC</b>	Células de Merkel (do inglês, <i>Merkel Cells</i> )
<b>MLR</b>	Regressão Linear Múltipla (do inglês, <i>Multiple Linear Regression</i> )
<b>MSC</b>	Correção Multiplicativa de Espalhamento (do inglês, <i>Multiplicative Scatter Correction</i> )
<b>NIR</b>	Radiação não ionizante (do inglês, <i>Non ionizing radiation</i> )
<b>NIRS</b>	Espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês, <i>Near Infrared Spectroscopy</i> )
<b>NMR</b>	Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>OMC</b>	Metoxinamato de oxila (do inglês, <i>Octyl methoxycinnamate</i> )
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OTC</b>	Medicamentos de venda livre (do inglês, <i>Over the counter</i> )
<b>PABA</b>	Ácido para-4-aminobenzóico (do inglês, <i>p-aminobenzoic acid</i> )
<b>PC</b>	Componente Principal (do inglês, <i>Principal Component</i> )
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PCR</b>	Regressão por Componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Regression</i> )
<b>PLS</b>	Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, <i>Partial Least Square Regression</i> )
<b>PLS-DA</b>	Análise Discriminante pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, <i>Partial Least Square Regression Discriminant Analysis</i> )
<b>PMMA</b>	Polimetilmetacrilato
<b>PPD</b>	Pigmentação Persistente da pele (do inglês, <i>Pigment Persistent Darkness</i> )
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>RMSEC</b>	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Calibração (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Calibration</i> )
<b>RMSECV</b>	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Cross Validation</i> )
<b>RMSEP</b>	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão (RMSEP, do inglês <i>Root Mean Squared Error of Prediction</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic acid</i> )



<b>SA</b>	Sul Africana (do inglês, <i>South African</i> )
<b>SBD</b>	Sociedade Brasileira de Dermatologia
<b>SIMCA</b>	Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes (do inglês, <i>Soft Independent Modelling by Class Analogy</i> )
<b>SNV</b>	Varição Normal Padrão (do inglês, <i>Standard Normal Variate</i> )
<b>TOM</b>	Teoria dos Orbitais Moleculares
<b>USA</b>	Estados Unidos da América (do inglês, <i>United States of America</i> )
<b>USAN</b>	Nome adotado pelos Estados Unidos (do inglês, <i>United States Adopted Name</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIS</b>	Radiação Visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 A PELE E A LUZ SOLAR .....	21
2.2 PROTEÇÃO SOLAR.....	28
2.2.1 Protetores solares.....	28
2.2.1.1. Filtros orgânicos .....	30
2.2.1.1. Filtros inorgânicos .....	33
2.2.2 Aspectos Regulatórios .....	35
2.3 METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA.....	37
2.3.1 Metodologias .....	38
2.3.1.1. Determinação do FPS <i>in vivo</i> – ISO 24444.....	39
2.3.1.2. Fator de proteção UVA (FPUVA).....	43
2.3.1.2.1. Determinação do FPUVA <i>in vitro</i> – ISO 24443.....	44
2.4 QUIMIOMETRIA .....	48
2.4.1 Análise de componentes principais (PCA).....	49
2.4.2 Calibração Multivariada .....	51
2.4.3 Análise Discriminante pelos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	52
2.4.4 Etapas na construção de um modelo.....	52
2.4.4.1 Pré-processamentos.....	53
2.4.4.2 Validação cruzada e validação externa do modelo.....	55
2.5 TRABALHOS CORRELATOS .....	57
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	60
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	60
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS .....	61

4.2 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS .....	61
4.3 AMOSTRAS AVALIADAS .....	61
4.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA .....	62
4.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS.....	65
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
5.1 ESPECTROS OBTIDOS.....	67
5.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA .....	68
5.2.1 Análise de componentes principais (PCA).....	68
5.3 MODELO DE CLASSIFICAÇÃO PLS-DA .....	83
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>108</b>
ANEXO 1. DADOS BRUTOS - ESPECTROS MÉDIOS DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO.....	108
ANEXO 2. ESPECTROS MÉDIOS DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO .....	111

## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos da radiação solar na saúde humana dependem de fatores como período do dia, condição climática, localização geográfica e estação do ano, sempre levando em consideração condições individuais da pele e a intensidade de radiação, frequência e tempo de exposição ao sol. O sol é essencial para a vida na Terra, e dentre os efeitos positivos da exposição, destacam-se a síntese de vitamina D, sensação de bem-estar físico e mental, estímulo à produção de melanina que gera o bronzeamento da pele, tratamento de icterícia (excesso de bilirrubina no sangue que provoca o aparecimento de cor amarelada na pele e no branco dos olhos de bebês), dentre outros. No entanto, também pode causar prejuízos ao organismo, caso não se tome os devidos cuidados quanto à dose de radiação recebida (FLOR *et al*, 2007), provocando diversos efeitos a curto prazo, como a queimadura, diminuição da imunidade e a longo prazo o envelhecimento da pele e câncer.

O ato de proteger a pele contra a queimadura solar já é uma prática antiga do ser humano, seja através do uso de roupas e acessórios ou pela simples não exposição ao sol. Os primeiros relatos científicos sobre a tentativa do uso de agentes fotoprotetores surgem no final do século XIX, com substâncias de efeito bastante limitado (ROELANDTS, 2007). Na definição atual, fotoprotetores tópicos, protetores solares, ou ainda filtros solares, são substâncias aplicadas na pele com diferentes apresentações que contenham em sua formulação ingredientes capazes de interferir de alguma forma nas implicações da radiação solar na superfície cutânea, reduzindo seus efeitos deletérios (OSTERWALDER & LIM, 2007).

Os protetores solares são compostos por substâncias, nomeadas de filtros ultravioleta (UV), que são capazes de barrar a quantidade de radiação ultravioleta que atinge a pele humana por absorção e/ou reflexão desta radiação (PERUGINI, *et al*, 2002). Estes, podem ser divididos em filtros inorgânicos ou orgânicos, também denominados físicos e químicos, respectivamente, dependendo de suas características físico-químicas.

O princípio de avaliação do fator de proteção solar (FPS) que é exibido nas embalagens de protetores solares, envolve a avaliação do aparecimento do eritema na pele, decorrente da exposição à radiação UVB e cuja intensidade é proporcional à dose recebida, enquanto que a avaliação do FPUVA envolve o aparecimento da pigmentação na pele (principalmente devido à exposição à radiação UVA). O teste de FPUVA atualmente conta com uma metodologia *in vitro* de avaliação, no entanto, a avaliação de FPS é realizada

apenas através do método *in vivo*, que envolve a exposição de voluntários humanos à radiação ultravioleta (ISO, 2010, 2011, 2012).

As metodologias *in vitro* de determinação do FPS, vêm sendo propostas há anos, variando-se instrumentos, substratos e diferentes técnicas de preparação (COLE, 2001). E apresentam vantagens quanto a economia e velocidade das análises, porém, são deficitárias na exatidão da previsão da proteção (COLE, 2001).

Ao se determinar a absorvância de filmes finos, como o filme formado de um protetor na pele ou em outro substrato, as propriedades ópticas são influenciadas por vários fatores como: a rugosidade da superfície do substrato, a extensão da permeação dos filtros no substrato, a força de cisalhamento utilizada durante a aplicação e ainda o grau de interação dos ingredientes do produto com a superfície e como esta interação influencia na qualidade da uniformidade do filme formado (COLE, 2001). Todas estas variáveis contribuem para uma alta variabilidade nas medidas de absorvância de protetores solares, ainda que no mesmo laboratório, sob as mesmas condições, e por conta disto, ainda não existe uma metodologia *in vitro* universalmente aceita para a quantificação da proteção.

Estudos do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam que para o biênio 2018-2029 a estimativa é que sejam diagnosticados 170 mil novos casos de câncer de pele no Brasil (SANTOS, 2017), no entanto, pesquisas coordenadas pela Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) mostram que o uso do protetor vem diminuindo. Em 2015 cerca de 53% da população não utiliza protetor solar diariamente e este número saltou para 72% em 2017 (ABIHPEC, 2019). Ainda assim, dados da mesma instituição indicam que o país responde por uma fatia de aproximadamente 20% do mercado mundial de protetores solares, sendo o maior consumidor mundial deste produto (ABIHPEC, 2014), o que evidencia a necessidade de garantia de maior segurança e proteção, como também a de ações para conscientização da população.

A quimiometria é uma área da Química que emprega ferramentas matemáticas e estatísticas para avaliar dados químicos de natureza multivariada e que tem como principais métodos a calibração multivariada e o reconhecimento de padrões (FERREIRA, 1999). Métodos de calibração multivariada permitem determinar uma série de propriedades de interesse a partir da correlação entre um dado instrumental e uma informação de interesse, como a concentração de um analito, permitindo previsões estatisticamente confiáveis. Já os métodos de reconhecimento de padrões não-supervisionados permitem a visualização de tendências de formação de agrupamentos de amostras baseados em similaridades e

diferenças presentes nos dados (FERREIRA, 1999). Considerando a demanda e a relevância do tema, e a origem dos dados de avaliações *in vitro*, o presente trabalho propôs a investigação da relação entre os espectros de absorção de protetores solares na região do ultravioleta e o fator de proteção solar através da aplicação de ferramentas de calibração multivariada, como uma alternativa a avaliação *in vivo*.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A PELE E A LUZ SOLAR

A pele é o maior órgão do corpo, representando cerca de 15% do peso corporal total do adulto. Ela executa muitas funções vitais, incluindo proteção contra agressores externos físicos, químicos e biológicos, prevenção da perda excessiva de água do corpo e um papel na termorregulação. A pele é contínua, com as membranas mucosas revestindo a superfície do corpo (KANITAKIS, 2002).

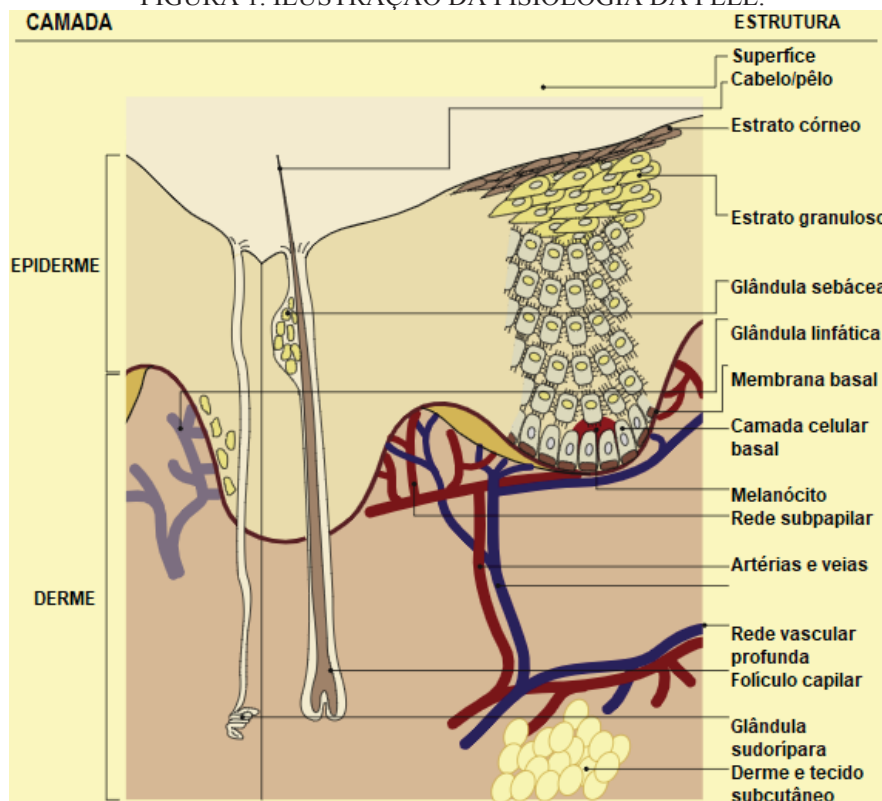
Ela é constituída basicamente de três camadas, a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo ou hipoderme (KANITAKIS, 2002). A camada mais externa é a epiderme, que consiste em um aglomerado de células denominadas queratinócitos, que possuem a função de sintetizar queratina, uma longa proteína que desenvolve um papel de proteção. A camada intermediária é a derme, que é fundamentalmente composta de proteínas fibrosas estruturais denominadas colágeno, e se localiza em cima do tecido subcutâneo, que contém pequenos lóbulos chamados de lipócitos (KOLARSICK *et al*, 2011).

A epiderme é um epitélio malpighiano (estratificado) que se renova continuamente, com uma espessura média de 100 µm, variando consideravelmente com a área do corpo (KANITAKIS, 2002). É constituído por vários tipos de células, sendo que de 90-95% são queratinócitos (KC), os demais constituintes (5-10%) são células epidérmicas não-queratinócitos, dentre elas: células de *Langerhans* (LC), melanócitos (MC) e células de Merkel (MKC). E pode ser distinguida em quatro camadas estratificadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (FIGURA 1).

A derme é a segunda camada da pele, sendo dividida basicamente em papilar (mais superficial) e reticular (mais profunda), ela é espessa e vascularizada, constituída principalmente por tecido conjuntivo, como o colágeno e as fibras elásticas (elastina), estas substâncias presentes na composição da derme tornam a pele resistente e elástica (GRAFF, 2003). Além disso, contém terminais e receptores nervosos sensoriais, vasos sanguíneos, as glândulas sudoríparas (produzem transpiração e a eliminam através de condutos na superfície da pele), folículos pilosos (cavidades profundas onde crescem os pelos) e as glândulas sebáceas (que eliminam um líquido oleoso, denominado sebo, que auxilia na manutenção da maciez e flexibilidade da pele e dos pelos) (McCRACKEN & WALKER, 2001).



FIGURA 1. ILUSTRAÇÃO DA FISIOLOGIA DA PELE.



FONTE: Adaptada de VENUS *et al* (2010).

A hipoderme, camada mais profunda da pele, cuja espessura depende da região do corpo, sexo, dentre outros fatores, desempenha um papel importante na termorregulação, isolamento, fornecimento de energia (armazenamento nutricional), proteção contra lesões mecânicas (KANITAKIS, 2002).

Um processo muito importante na defesa da pele, é a síntese de melanina, ela ocorre tanto nas células basais quanto no folículo piloso, de modo geral, os melanócitos presentes produzem a melanina (polímero pigmentado capaz de absorver radiação UV) a partir da tirosina, intermediada pela enzima tirosinase. A melanina produzida é armazenada nos melanossomos que são organelas especializadas que são fagocitadas por queratinócitos e assim transportados para uma região acima do núcleo desta célula, originando a cor da pele e atuando como agente protetor (D’ORAZIO *et al*, 2013).

A melanina é subdividida em dois tipos: eumelanina (pigmento mais escuro - amarronzado) e feomelanina (pigmento mais claro - avermelhado) (D’ORAZIO *et al*, 2013). A eumelanina é muito mais eficiente no bloqueio dos fótons UV do que a feomelanina, assim, quanto mais eumelanina na pele, menor será a permeação de UV na epiderme, de modo geral pessoas de pele clara que são quase sempre sensíveis aos raios UV e têm alto

risco de câncer de pele têm pouca eumelanina epidérmica e, portanto, recebem muito mais UV do que indivíduos de pele mais escura, dessa forma, quanto mais clara for a pele, mais prejudicial será a exposição aos raios UV (D'ORAZIO *et al*, 2013).

Para traduzir o risco de câncer de pele atrelada a coloração da pele, foi criada a escala de *Fitzpatrick* pelo médico Thomas B. *Fitzpatrick* em 1976, que se caracteriza por ser uma escala semiquantitativa composta por seis classes, denominadas fototipos, que descrevem a cor da pele pela aparência basal, nível de melanina, resposta inflamatória ao UV e risco de câncer (TABELA 1) (SCHERER & KUMAR, 2010), de forma geral, quanto menor o fototipo, mais clara é a pele e maior a sensibilidade a exposição solar (FIGURA 2).

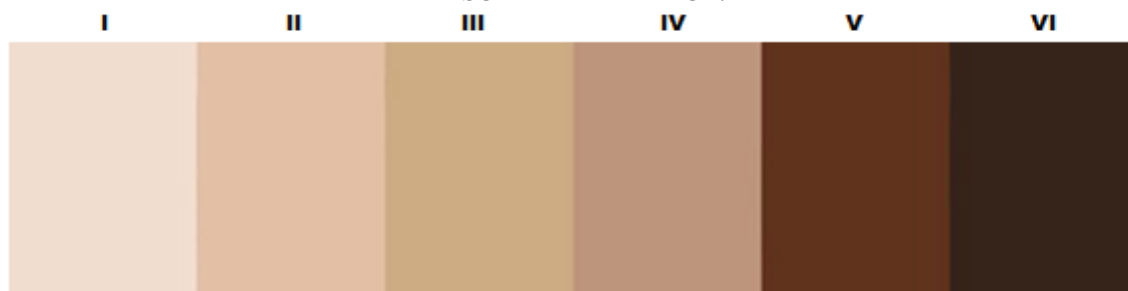
Já a dose mínima eritematosa (MED) é a quantidade de radiação UV, especialmente UVB, necessária para induzir a queimadura solar (eritema/ vermelhidão) na pele, após 24 a 48 horas da exposição. Quanto mais clara for a pele, mais fácil será causar inflamação (queimadura solar) e, portanto, menor é a dose (MED) necessária (LU *et al*, 1996; ANDREASSI *et al*, 1999; KAWADA, 2000).

TABELA 1. DESCRIÇÃO DA ESCALA *FITZPATRICK*.

<b>Fototipo <i>Fitzpatrick</i></b>	<b>Fenótipo e resposta cutânea ao UV</b>	<b>MED (mJ/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Risco de câncer de pele</b>
I	Pele branca Sempre queima, nunca bronzeia Muito sensível ao Sol	15-30	4
II	Pele branca Sempre queima, bronzeia muito pouco Sensível ao Sol	24-40	3 - 4
III	Pele morena clara Queima e bronzeia moderadamente Sensibilidade normal ao Sol	30-50	3
IV	Pele morena moderada Queima pouco e sempre bronzeia Sensibilidade normal ao Sol	40-60	2
V	Pele morena escura Queima raramente, sempre bronzeia Pouco sensível ao Sol	60-90	1
VI	Pele negra Nunca queima, totalmente pigmentada Insensível ao Sol	90-150	0 - 1

FONTE: Adaptada de D'ORAZIO *et al* (2013).

FIGURA 2. IMAGEM ILUSTRATIVA DAS TONALIDADES DE PELE DOS FOTOTIPOS, SEGUNDO A ESCALA FITZPATRICK.



FONTE: A autora (2019).

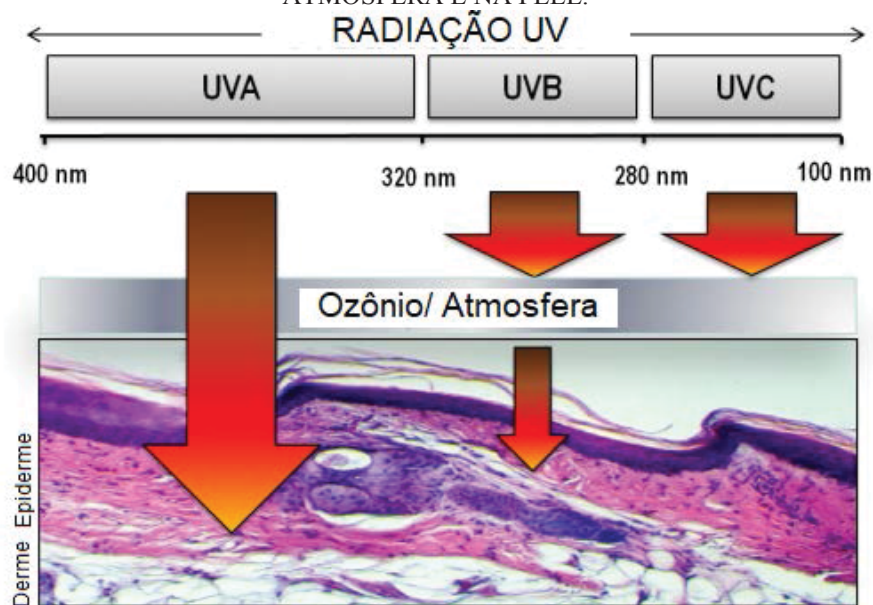
Essa resposta cutânea ao UV, é decorrente da interação da radiação eletromagnética (em uma faixa de comprimento de onda específica) com a pele. A radiação eletromagnética (popularmente denominada como luz) consiste na emissão ou transferência de energia na forma de ondas eletromagnéticas e fótons. O fóton é um quantum de radiação eletromagnética, caracterizado por um comprimento de onda ou frequência. A radiação eletromagnética (EMR) é composta por ondas de rádio, micro-ondas, infravermelho, visível, ultravioleta, raios X e raios gama, é comumente apresentada através de seu espectro eletromagnético, que consiste na representação gráfica das ondas eletromagnéticas organizadas de acordo com o seu comprimento de onda (ZWINKELS, 2015).

A radiação eletromagnética pode ser classificada como ionizante e não ionizante, de acordo com o seu nível energético: quanto mais energética, mais ionizante. A radiação ionizante (IR) cria uma corrente de alta energia (fótons) ou partículas alfa, prótons e nêutrons que, em altas doses podem ser letais para os organismos vivos (SOWA *et al*, 2012), e em geral são radiações com comprimentos de onda inferiores a 100 nm. A radiação não ionizante (NIR) ao invés de produzir carga quando passa através da matéria, tem energia suficiente apenas para a excitação, englobando dois grandes grupos: radiações ópticas (ultravioleta, visível e infravermelho) e campos eletromagnéticos (micro-ondas, ondas de rádio de baixa e alta frequência) (NG, 2003).

Tanto IR quanto NIR, possuem uma série de efeitos biológicos, IR por ser mais energética, pode gerar efeitos deletérios como deficiência dos linfócitos, imunidade celular comprometida, anemia, infertilidade, dermatite aguda, perda de cabelo, opacidade da íris, inflamação intestinal aguda, leucemia a longo prazo, e ainda falência de órgãos ou morte (SOWA *et al*, 2012). A radiação não ionizante geralmente interage com tecidos através da geração de calor, e seus danos dependem da habilidade de penetrar no corpo humano e as características absorptivas de diferentes tecidos, geralmente atuam nos olhos e na pele e recaem principalmente em duas categorias de danos: térmico e fotoquímico (NG, 2003).

O Sol emite diversos tipos de radiações: ionizantes, ultravioleta, visível, infravermelho. Todavia o campo magnético e a atmosfera da Terra filtram as radiações de maior energia, e nenhuma radiação solar de comprimentos de onda abaixo de 290 nm atinge a superfície da Terra. É o caso da radiação ultravioleta, que é comumente separada em três partes: UVC (100-280 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) (EPSTEIN *et al*, 1990) que ainda pode ser subdividida entre UVA II (320-340 nm) e UVA I (340-400 nm) (FAURSCHOU & WULF, 2007), sendo que o UVA II é mais eritemagênico que o UVA I (AHMAD, 2017), logo, apresenta uma resposta biológica mais semelhante ao ultravioleta B. A radiação UVC (mais energética) é absorvida pelo oxigênio molecular e ozônio no alto da atmosfera (DE GRUIJL, 2002), por isso, a radiação UV do ambiente é predominantemente UVA (90% a 95%) e UVB (5% a 10%), e os efeitos bioquímicos da radiação solar sobre a pele são causados, principalmente, por estas radiações (RIBEIRO & OHARA, 2003). Cada componente do UV pode exercer uma variedade de efeitos nas células, tecidos e moléculas (D'ORAZIO *et al*, 2013), de forma que a penetração na pele é dependente do comprimento de onda (FIGURA 3): a região de comprimento de onda mais longo (UVA) penetra profundamente até a derme, enquanto o UVB é quase completamente absorvido pela epiderme (D'ORAZIO *et al*, 2013).

FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO SOBRE A PENETRAÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA ATMOSFERA E NA PELE.



FONTE: Adaptada de D'ORAZIO *et al* (2013).

Dentre os muitos efeitos da radiação solar na fisiologia da pele, um dos efeitos agudos mais óbvios é a indução à inflamação, para isso a radiação UVB induz a uma cascata

de citocinas, mediadores vasoativos e neuroativos na pele, que juntos resultam em uma resposta inflamatória e causam a “queimadura” (SLOMINSKI *et al*, 2000a, 2000b). O aumento da presença das células mortas desencadeia um aumento da vascularização da região para que elas sejam removidas, e dessa forma origina-se a vermelhidão. Além disso, se a dose de UV exceder a dose limite, os queratinócitos ativam as vias apoptóticas e morrem (BAYERL *et al*, 1995).

Comprimentos mais longos do UV (UVA) regulam a produção e o acúmulo do pigmento melanina na epiderme (MCGILL *et al*, 2002; WIDLUND & FISHER, 2003), conhecido por caracterizar o bronzeamento da pele, que ocorrem em duas fases: de forma imediata ou tardia. O bronzeamento imediato tem uma duração menor na pele, de minutos a algumas horas e durante esta reação não existe síntese de melanina nova, mas sim um aumento na transferência de melanosomas nos queratinócitos; enquanto que o escurecimento tardio pode ocorrer de horas a vários dias depois da exposição ao UV e ocorre devido a real síntese de melanina e transferência para os queratinócitos (PARK *et al*, 2002; BEATTIE *et al*, 2005). De maneira geral, a pigmentação da pele é uma resposta fisiológica complexa envolvendo vários tipos de células e uma variedade de rotas (CUI *et al*, 2007). Por ser mais penetrante, e atingir a derme profunda, a radiação UVA também é fortemente associada ao envelhecimento precoce da pele, caracterizado pelo aparecimento de rugas e flacidez, que aumentam, devido a alterações das fibras de colágeno e elastina, responsáveis pela sustentação da pele (BALOGH *et al*, 2011; PALM & O'DONOGHUE, 2007).

Diversas moléculas na pele como a melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos, entre outros, possuem capacidade de absorver a radiação UV, e por isso, são denominadas cromóforos, e ao absorverem a radiação podem sofrer reações fotoquímicas e assim alterações químicas (GONZÁLEZ *et al*, 2008). O DNA é uma das principais moléculas a absorver a radiação UV e, portanto, pode sofrer mutações que, posteriormente, podem resultar em transformações malignas da célula (MAVERAKIS *et al*, 2010), assim, tanto o UVA quanto UVB pode contribuir para a carcinogênese através de diferentes mecanismos (DE GRUIJL, 2000; IKEHATA & ONO, 2011; SAGE *et al*, 2012).

O câncer é uma patologia de etiologia multifatorial, resultante principalmente, de alterações genéticas, fatores ambientais e do estilo de vida (GIGLIO *et al*, 2002; RIBEIRO & MARQUES, 2003). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos e podem metastizar-se. Tais células

se dividem rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, gerando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Existem diferentes tipos de câncer, que correspondem às várias células do corpo, dentre estes, destaca-se o câncer de pele, que pode se apresentar de duas formas: 1) melanoma e 2) não melanoma (DAZARD *et al*, 2000).

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD, 2019), o câncer da pele responde por 33% de todos os diagnósticos desta doença no Brasil, sendo que o Instituto Nacional do Câncer (INCA) registra, a cada ano, cerca de 180 mil novos casos. O tipo mais comum, o câncer da pele não melanoma, tem letalidade baixa, porém, seus números são muito altos. A doença é provocada pelo crescimento anormal e descontrolado das células que compõem a pele. Essas células se dispõem formando camadas e, de acordo com as que forem afetadas, são definidos os diferentes tipos de câncer. Os mais comuns são os carcinomas basocelulares (CBC) e os espinocelulares (CEC). Mais raro e letal que os carcinomas, o melanoma é o tipo mais agressivo de câncer da pele.

Os carcinomas ocorrem principalmente devido à exposição crônica da luz solar UV e o melanoma pode ser devido à intensa exposição solar e histórico de queimadura solar (CHUMMUN & MCLEAN, 2011), sendo que ao todo, 80% dos casos de câncer de pele são de CBC, 16% são de CEC e 4% de melanoma (GREENLEE *et al*, 2000).

Pessoas de pele clara e que se queimam com facilidade ao se expor ao Sol, com fototipos I e II, têm mais risco de desenvolver a doença, no entanto, ainda que mais raros, também há casos de indivíduos com fototipos mais altos, como negros. O melanoma tem origem nos melanócitos, e normalmente, surge nas áreas do corpo mais expostas à radiação solar. Em estágios iniciais, ele se desenvolve apenas na camada mais superficial da pele, o que facilita a remoção cirúrgica e a cura do tumor, mas, em estágios mais avançados, a lesão é mais profunda e espessa, o que aumenta a chance de se espalhar para outros órgãos (metástase) e diminui as possibilidades de cura. Desta forma, o diagnóstico precoce do melanoma é fundamental. A hereditariedade desempenha um papel central no desenvolvimento da doença, por isso, familiares de pacientes devem se submeter a exames preventivos regularmente, principalmente em casos de primeiro grau (SBD, 2019).

Evitar a exposição excessiva ao sol e proteger a pele dos efeitos da radiação UV são as melhores estratégias para prevenir o câncer de pele, a prevenção inclui o uso de camisetas, chapéus, óculos escuros e protetores solares, além de permanecer na sombra entre 10 e 16 horas (horário de verão) reduzindo assim a exposição (SBD, 2019). Devido às preocupações relacionadas à saúde pública e buscando formas fáceis para se alertar a



população sobre os perigos e formas de proteção contra radiação ultravioleta, uma série de discussões foram realizadas no início da década de 1990 pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002), que culminou no estabelecimento de um índice ultravioleta (IUV). Para cálculo do IUV leva-se em consideração o espectro de ação referência para a indução do eritema na pele humana e o nível máximo de UV para o dia e o seu resultado é um índice que é agrupado em categoria de risco, conforme apresentado na FIGURA 4.

FIGURA 4. CATEGORIAS DOS ÍNDICES ULTRAVIOLETA.

Tabela de referência para índice UV

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Baixo	Baixo	Moderado	Moderado	Moderado	Alto	Alto	Muito alto	Muito alto	Muito alto	Extremo	Extremo	Extremo	Extremo
Nenhuma precaução		Precauções requeridas					Extra Proteção!						

FONTE: A AUTORA (2019).

## 2.2 PROTEÇÃO SOLAR

### 2.2.1 Protetores solares

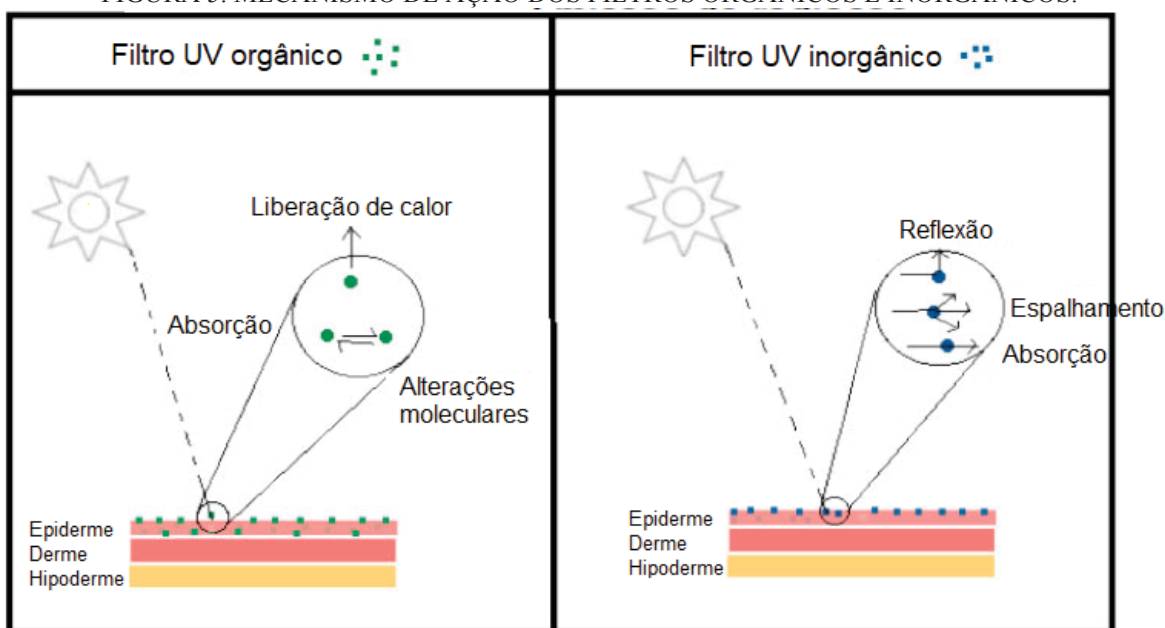
Os protetores solares são produtos de uso tópico, ou seja, devem ser aplicados na pele, e possuem a capacidade de absorver e/ou refletir as radiações ultravioletas que atingem a mesma, reduzindo assim os feitos danosos sobre ela. Eles surgiram quando se observou que algumas substâncias eram capazes de prevenir a queimadura da pele (eritema) pelos raios solares. No início do século era observado que sulfato de quinina acidificado e, mais tarde, o Antilux (2-naftol-6,8- dissulfonato de sódio) evitavam as queimaduras (URBACH, 2011). Ao longo do século XX, muitas substâncias surgiram com eficácia na prevenção de eritema solar e seu uso se tornou mais popular após a Segunda Guerra Mundial, com o ácido p-amino benzóico, conhecido como PABA (LOWE *et al*, 1997).

Para formulação de um protetor solar é necessária a utilização de filtros ultravioleta, também chamados de filtros UV ou filtros solares, substâncias que apresentam a capacidade de interagir com a radiação incidente, através de 3 mecanismos básicos: reflexão, dispersão e absorção (FIGURA 5). Os filtros podem ser classificados como físicos (inorgânicos) ou químicos (orgânicos) segundo sua natureza e propriedades físico-químicas, no entanto, segundo Flor *et al* (2007) a classificação de químicos e físicos deve ser reavaliada pois apesar de apresentar um caráter comercial, ambos são substâncias químicas. Existem substâncias específicas que possuem essa finalidade e cada país regulamenta as que são permitidas em



seu território. No Brasil, a RDC nº 69 de 23 de março de 2016 regulamenta a lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes no Mercosul e, nela são descritos os 38 filtros que podem ser comercializados juntamente com suas respectivas concentrações limite (BRASIL, 2016).

FIGURA 5. MECANISMO DE AÇÃO DOS FILTROS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS.



FONTE: Adaptada de MANAIA *et al* (2013).

Tendo em vista os três mecanismos de interação com a radiação, uma molécula capaz de absorver radiação UV não necessariamente deve ser chamada de filtro químico, isto porque os processos de absorção e reflexão são considerados fenômenos físicos, uma vez que não há reação química, e, portanto, é sensata a classificação como filtros orgânicos e inorgânicos. Em termos de estrutura química, em filtros orgânicos temos a presença de compostos orgânicos e nos inorgânicos, óxidos metálicos. Em geral, compostos orgânicos oferecem proteção devido a absorção da radiação, enquanto os inorgânicos, pela reflexão da radiação. Porém, já se encontram disponíveis no mercado, filtros orgânicos que além de absorver, refletem a radiação incidente (FLOR *et al*, 2007). É importante lembrar, que os fenômenos de reflexão e espalhamento, envolvidos no mecanismo principal de proteção de filtros inorgânicos, são dependentes do tamanho de partículas, entre outros fatores e não apenas do fato de ser orgânico ou inorgânico (FLOR *et al*, 2007).

As substâncias inorgânicas mais empregadas como fotoprotetores são o óxido de zinco (ZnO) e o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Estes óxidos apresentam excelente proteção contra os raios UV, além de possuírem baixo potencial de irritação (NASCIMENTO *et al*, 2014),

por possuírem baixa permeação cutânea e elevada fotoestabilidade, ou seja, são capazes de manter sua capacidade fotoprotetora mesmo após longos períodos de exposição à radiação solar (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

Por outro lado, filtros orgânicos são moléculas que interferem na radiação incidente por meio do mecanismo de absorção, assim, o filtro atua como cromóforo exógeno que ao absorver um fóton de energia evolui para o estado excitado da molécula, e ao retornar ao estado fundamental (estável), ocorre a liberação de energia em um comprimento de onda mais longo, seja na faixa da luz visível (como fluorescência), seja na faixa da radiação infravermelha (como calor), ou seja, menos energética. E devido a existência do anel benzênico, este processo pode repetir-se inúmeras vezes pelo mecanismo denominado ressonância que garante a estabilidade estrutural da molécula. Os filtros ainda podem ser subclassificados como filtros UVA, filtros UVB ou filtros de amplo espectro (UVA e UVB), a depender da sua capacidade de absorção em cada região do espectro UV (FORESTIER, 2008; KLEIN *et al*, 1992).

Para uma mesma substância pode haver diferentes nomenclaturas, como IUPAC, INCI, USAN, além dos muitos nomes comerciais, o que é, no mínimo, um incômodo para os profissionais e cientistas deste segmento (NASCIMENTO *et al*, 2014). Como por exemplo, o caso do filtro orgânico metóxicinamato de 2-etilexila, segundo a IUPAC, mas Metoxicinamato de octila (OMC) pelo INCI; Octinoxato pela USAN e ainda Tinosorb® OMC ou Uvinul® MC 80 são seus nomes comerciais.

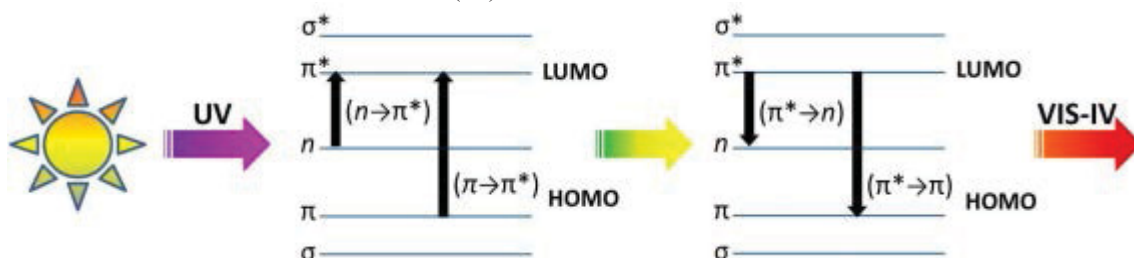
#### 2.2.1.1. Filtros orgânicos

As estruturas moleculares de filtros orgânicos apresentam, de forma geral, anéis benzênicos contendo pelo menos dois grupos substituintes nas posições *orto* ou *para*, sendo um grupo doador de elétrons e o outro um receptor, estes provocam o aumento do comprimento de onda de absorção máxima do composto devido a existência do substituinte, fazendo com que absorvam na região de interesse do UV (FLOR *et al*, 2007; SHAATH *et al*, 2007).

Em geral, é empregado um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila, na posição *orto* ou *para* do anel aromático. Seu mecanismo de funcionamento obedece as leis da Teoria de Orbitais Moleculares (TOM), que significa que ao absorver a radiação UV, os elétrons situados no orbital  $\pi$  HOMO (orbital molecular preenchido de mais

alta energia) são excitados para orbital  $\pi^*$  LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) (FLOR *et al*, 2007). Durante o retorno do elétron do orbital antiligante ao estado fundamental,  $\pi^* \rightarrow n$  ou  $\pi^* \rightarrow \pi$ , ocorre a liberação de menor quantidade de energia sob a forma de ondas eletromagnéticas com comprimentos de onda acima de 400 nm (FIGURA 6) (FLOR *et al*, 2007; SHAATH *et al*, 2007). A radiação UV absorvida tem energia exatamente igual à diferença de energia entre os estados fundamental e excitado. Assim, uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  processa bem mais energia do UV quando comparada à transição  $n \rightarrow \pi^*$  (PAVIA *et al*, 2010).

FIGURA 6. TRANSIÇÃO ELETRÔNICA DAS RADIAÇÕES UV E CONVERSÃO EM VISÍVEL (VIS) E INFRAVERMELHO (IV) POR FOTOPROTETORES ORGÂNICOS.



FONTE: NASCIMENTO *et al* (2013).

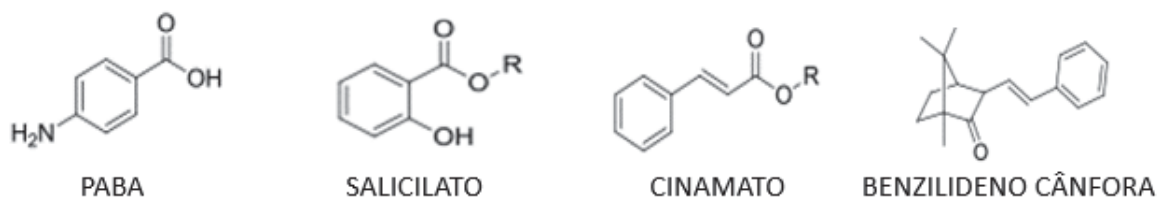
Outra característica importante é a inserção de cadeias alquílicas que contribuem com a lipofilicidade da molécula, o que aumenta a adesão da substância à pele evitando sua retirada pela água (NASCIMENTO *et al*, 2014).

Além dos aspectos estruturais, este tipo de substância deve idealmente (a) oferecer estabilidade a luz, ao calor e a água; (b) não ser tóxico, irritante, mutagênico ou teratogênico, com ou sem a ação da luz; (c) absorver UV em amplo espectro (UVA e/ou UVB); (d) possuir um coeficiente de extinção específica ( $E_{1\%, 1\text{cm}}$ ) acima de 1.000 para se ter o máximo de proteção com o mínimo emprego de filtro UV; (e) apresentar peso molecular superior a 500 Daltons (Da) para se prevenir a permeação cutânea; (f) possuir um log P (coeficiente de partição entre água e octanol) superior a 5, ou seja, deve possuir uma lipofilia específica para uma boa adesão a pele, sem que ocorra a sua retirada pela água e evitando também a permeabilidade cutânea por afinidade ao tecido córneo e (g) não deve interagir quimicamente com outros componentes da formulação, ou mesmo com a embalagem de acondicionamento do produto acabado (SHAATH *et al*, 2007; YAN *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012).

Uma prática muito comum é a derivatização de fotoprotetores mais antigos e conhecidos, a fim de obter moléculas mais ativas (GASPARRO *et al*, 1998). Por isso, quase

todas as substâncias fotoprotetoras comerciais são oriundas de classes mais simples de moléculas absorvedoras de UV (FIGURA 7), como no caso dos derivados do PABA, salicilatos, cinamatos e do benzilideno cânfora (GASPARRO *et al*, 1998).

FIGURA 7. PRINCIPAIS CLASSES DE MOLÉCULAS ABSORVEDORAS DE UV: PABA, SALICILATO, CINAMATO, BENZILIDENO CÂNFORA.



FONTE: A autora (2019).

De modo geral, filtros UVB absorvem aproximadamente 90% da radiação entre 290 a 320 nm, e o PABA foi o primeiro filtro UV utilizado e um dos primeiros aprovados para uso pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*). Porém, devido sua alergenicidade, foi gradualmente sendo substituído por seus ésteres, como o Etilhexil-dimetil PABA (PALM & O'DONOGHUE, 2007; GONZÁLEZ *et al*, 2008).

Os cinamatos substituíram em grande parte os derivados de PABA pois também são absorvedores de UVB potentes (GOGNA *et al*, 2007). Os salicilatos são absorvedores de UVB mais fracos, portanto, são geralmente usados em combinação com outros filtros UV. O octissalato e homossalato são insolúveis em água, característica que leva à sua alta substantividade, ou seja, a capacidade de manter a sua eficácia após a exposição à água e transpiração. O salicilato de trolamina é solúvel em água e tem sido usado em produtos capilares (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

O perfil de absorção do octocrileno varia de 290 a 360 nm com pico de absorção em 307 nm. O composto tem um excelente perfil de segurança com baixa irritação, baixa fototoxicidade e potencial foto alergênico, sendo geralmente utilizado em combinação com outros filtros para chegar a valores de FPS mais altos (NASH, 2006).

O ácido fenilbenzimidazol sulfônico é solúvel em água e é utilizado em produtos mais leves e menos oleosos, como hidratantes cosméticos de uso diário. É um filtro UVB seletivo, permitindo quase toda a transmissão UVA (RAI *et al*, 2012).

De modo geral os filtros UV apresentam regiões de absorção característica que refletem a eficácia fotoprotetora dentro do espectro UV, o Anexo 2 lista a região de proteção de alguns dos componentes mais encontrados em produtos desta natureza.

A eficácia dos protetores solares é dependente da sua capacidade de absorção da energia radiante, que é proporcional à sua concentração, intervalo de absorção e comprimento de onda de máxima absorção. A associação de diferentes filtros em formulações também é um recurso para incremento desta eficácia (DE PAOLA *et al*, 1998).

Quando se utiliza uma combinação de filtros UVA e UVB, permite-se uma proteção de amplo espectro à pele. Além de absorver a radiação ultravioleta incidente, um produto fotoprotetor deve ainda ser estável na pele humana e ao calor, e ser estável sob a luz do sol para permitir proteção durante várias horas, sem sofrer degradação. Paralelamente, os filtros solares ainda não devem ser irritantes, e sensibilizantes. Eles devem recobrir e proteger a superfície da pele, mas não devem penetrá-la, para que não se tenha uma exposição sistêmica a essas substâncias. Os filtros solares não devem ser tóxicos, já que são absorvidos traços destes através da pele ou ingeridos após a aplicação nos lábios, porém existem relatos na literatura que relatam sua toxicidade e permeação. Finalmente, um bom protetor solar deve ser resistente à água, insípido, inodoro e incolor, e deve ser compatível com formulações cosméticas (JOHNSON, 2000; NOHYNEK & SCHAEFER, 2001).

#### 2.2.1.1. Filtros inorgânicos

Nos filtros inorgânicos, os processos de proteção envolvidos são diferentes daqueles das moléculas orgânicas. Vale ressaltar que os filtros inorgânicos são constituídos de partículas, de preferência com tamanhos da ordem da radiação que se quer espalhar e por tratar-se de partículas, os filtros inorgânicos com tamanhos adequados de partículas além de absorção, apresentam espalhamento da luz UV. Eles englobam basicamente o óxido de zinco e dióxido de titânio que são materiais semicondutores (FLOR *et al*, 2007).

Para incorporação de filtros inorgânicos, é necessário que os mesmos fiquem suspensos, sendo que o tamanho de partícula do óxido influenciará diretamente em sua eficácia como também na aparência do produto na pele, isso porque quanto maior o tamanho de partícula destas substâncias, maior será película branca deixada sobre a pele, o que não é apreciado esteticamente (FLOR *et al*, 2007). No início da década de 1990 foram feitos aprimoramentos nestas substâncias, e novas formas de apresentação micronizadas foram disponibilizadas no mercado. Isso fez com que partículas que antes eram comercializadas com tamanho de 100 a 300 nm, tivessem reduções de 50 a 90% do diâmetro original e não

deixassem película perceptível sobre a pele, tornando-se mais atrativas ao consumidor (PALM & O'DONOGHUE, 2007).

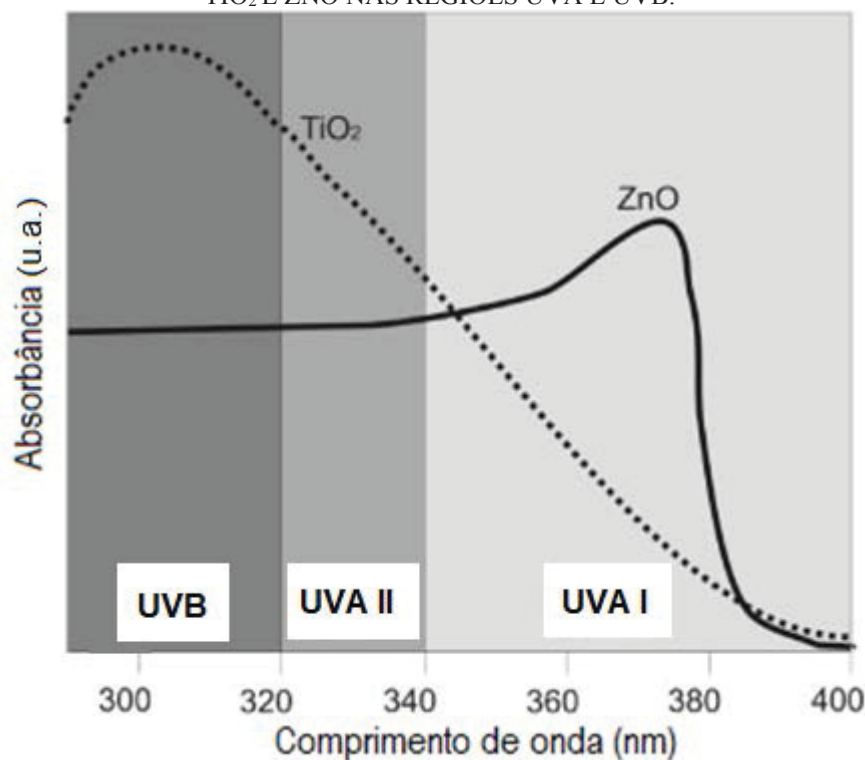
O espalhamento máximo da luz ocorre na presença de partículas com diâmetro aproximadamente igual ao comprimento de onda da luz incidente, por isso para não ocorrer a formação da película branca sobre a pele, o tamanho de partículas deve estar o mais distante possível da ordem de grandeza do comprimento de onda da faixa da radiação visível (400 nm) (FLOR *et al*, 2007). Um dos tipos de espalhamento que pode ocorrer é o *Rayleigh*, que expressa através de cálculos matemáticos a relação entre intensidade do espalhamento e comprimento de onda e é proporcional ao raio da partícula, ou seja, quanto maior a partícula, maior será o resíduo esbranquiçado na pele (FLOR *et al*, 2007).

O dióxido de titânio tem três formas cristalinas, denominadas anatase, rutilo e ruquita (SADRIEH *et al*, 2010), mas apenas anatase e rutilo são úteis para formulações de filtros solares (SERPONE *et al*, 2007). Anatase é a forma polimórfica mais fotoativa do  $\text{TiO}_2$ , com maior atividade fotocatalítica que o rutilo. A estrutura das nanopartículas, especialmente sua superfície, desempenha um papel relevante em sua reatividade química e outras propriedades. Muitos estudos compararam as formas anatase e rutilo por sua citotoxicidade e capacidade de formar espécies reativas, em termos de suas propriedades fotocatalíticas. Um desses estudos, evidenciou que a anatase adsorve moléculas de água dissociadas, enquanto o rutilo adsorve as não dissociadas, fato que possibilita que em sistemas anatase sejam encontradas espécies  $\text{Ti-OH}$  que na presença de radiação UV formam radicais hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ), espécies altamente reativas. Os resultados revelaram que o material catalítico menos ativo, rutilo, apresentou 100 vezes menos citotoxicidade do que as nanopartículas de anatase de tamanho similar, que exibiram alta fotoatividade. Portanto, tem sido sugerido que o dano oxidativo induzido pela radiação UV na foto catálise é intensamente afetado pela forma polimórfica das nanopartículas de titânio e as espécies reativas formadas pelos nano cristais são eficazes em quebrar a funcionalidade celular (SAYES *et al*, 2006).

A faixa espectral de proteção UV fornecida pelo dióxido de titânio é ampla, estendendo-se da região UVA II para a região UVB (SERPONE *et al*, 2007), enquanto a faixa de proteção óxido de zinco tem seu pico no espectro UVA. Assim, o óxido de zinco é utilizado como complemento dos filtros UVB, proporcionando preparações que proporcionam amplo espectro de proteção. Enquanto, o dióxido de titânio pode ser usado

sozinho porque oferece proteção em todo o espectro. A FIGURA 8 ilustra os espectros de absorção de ambos.

FIGURA 8. DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ABSORBÂNCIA DOS FILTROS INORGÂNICOS  $\text{TiO}_2$  E  $\text{ZnO}$  NAS REGIÕES UVA E UVB.



FONTE: Adaptada de MANAIA *et al* (2013).

### 2.2.2 Aspectos Regulatórios

Diversas agências mundiais regulamentam o uso dos filtros solares comerciais, tais como a agência de Administração de Alimentos e Drogas (FDA) nos Estados Unidos, a Associação Europeia de Cosméticos e Perfumaria (COLIPA) na Europa, a Associação Japonesa de Indústria Cosmética (JCIA) no Japão e o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (SHAAT *et al*, 2007). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em consonância com o MERCOSUL regulamenta o uso dos filtros solares comerciais.

Produtos com função de proteção solar recebem diferentes classificações regulatórias em cada país. Nos Estados Unidos, são classificados como medicamentos de venda livre de receita médica (*OTC - Over the counter*) e regulamentados pelo FDA. Na Coreia do Sul e China, são considerados cosméticos com função especial e recebem um



tratamento similar à de produtos OTC. Já na União Européia, no Mercosul e no Oriente Médio, além de alguns mercados asiáticos, os filtros solares são classificados como cosméticos.

No Brasil, o órgão que regulamenta o registro e distribuição de protetores solares é ANVISA e atende a resolução RDC nº 30 (BRASIL, 2012), que aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos, válido nos países Argentina, Paraguai e Uruguai, e estabelece as definições, os requisitos técnicos, os critérios de rotulagem e os métodos de avaliação de eficácia relacionados a produtos que protegem da radiação solar, ou da radiação ultravioleta.

Segundo a RDC 30/2012 os produtos que contenham proteção solar podem ser classificados em dois tipos: protetor solar ou produto multifuncional. O protetor solar é qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação. Eles devem cumprir com os seguintes requisitos básicos: FPS de no mínimo 6, Fator de proteção UVA (FPUVA) de no mínimo 1/3 do valor do FPS declarado em rotulagem e comprimento de onda crítico (COC) de no mínimo 370 nm.

Enquanto que produto multifuncional é qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, cujo benefício de proteção contra a radiação UV não é a finalidade principal, mas um benefício adicional do produto. Para estes, a proteção UV é um atributo secundário, e os resultados de FPS e/ou FPUVA, declarados, devem ser de no mínimo dois (2), além da obrigatoriedade da seguinte frase: “Este produto não é um protetor solar”.

Sobre os requisitos de rotulagem, além da indicação dos valores de FPS, é necessária a Designação de Categoria de Proteção (DCP), conforme TABELA 2.



TABELA 2. DESIGNAÇÃO DE CATEGORIA DE PROTEÇÃO (DCP) RELATIVA À PROTEÇÃO OFERECIDA PELO PRODUTO CONTRA RADIAÇÃO UVB E UVA PARA A ROTULAGEM DOS PROTETORES SOLARES.

Indicações adicionais não obrigatórias na rotulagem	Categoria indicada no rótulo (DCP)	Fator de proteção solar medido (FPS)	Fator de proteção UVA (FPUVA)	Comprimento de onda crítico mínimo
Pele pouco sensível a queimadura solar	BAIXA PROTEÇÃO	6,0 - 14,9		
Pele moderadamente sensível a queimadura solar	MÉDIA PROTEÇÃO	15,0 - 29,9	1/3 do FPS indicado na rotulagem	370 nm
Pele muito sensível a queimadura solar	ALTA PROTEÇÃO	30,0 - 50,0		
Pele extremamente sensível a queimadura solar	PROTEÇÃO MUITO ALTA	Maior que 50,0 e menor do que 100		

FONTE: RDC 30 (2012).

Sobre as metodologias aceitas pelo MERCOSUL, para a determinação do FPS ou da resistência à água deve-se seguir unicamente os métodos *in vivo* descritos e suas atualizações. Para a determinação do nível de proteção UVA existem duas metodologias aceitas (ou suas atualizações), o método *in vivo* ou o método *in vitro*, sendo que desta última também é possível se obter o comprimento de onda crítico do produto.

### 2.3 METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA

A avaliação *in vivo* da eficácia de protetores solares foi relatada, pela primeira vez que se tem conhecimento, por *Friedrich Ellinger*, em 1934, através da determinação do eritema na pele protegida e não protegida do antebraço de voluntários. Nesta proposta, o coeficiente de proteção proposto era inversamente proporcional ao nível de proteção solar apresentado pelo produto em teste (SCHALKA & DOS REIS, 2011).

O grande precursor do que foi posteriormente denominado Fator de Proteção Solar (FPS) foi o cientista alemão *Rudolf Schulze*, que em 1956 propôs testar os protetores solares comercialmente disponíveis atribuindo-lhes valores numéricos indicativos do Fator de Proteção (SCHALKA & DOS REIS, 2011). Diferentemente do que fez *Ellinger*, *Schulze* utilizou fontes UV artificiais cujos espectros eram bem mais próximos do espectro solar

natural, além de propor a utilização de uma série crescente de intensidades UV (progressão de 40%) em áreas protegidas e não protegidas da pele (SCHALKA & DOS REIS, 2011).

Melhorias sobre o método proposto por *Schulze* foram publicadas por *Greiter*, em 1974, que desenvolveu o conceito de Fator de Proteção Solar., e então, em 1978, este método foi adotado e normatizado pela agência regulatória Norte Americana (FDA) tornando-se assim internacionalmente aceito (SCHALKA & DOS REIS, 2011).

E então, a agência americana, FDA, publicou em 1993 uma proposta de monografia final que foi consolidada em 1999. Entretanto, uma nova proposta de metodologia foi feita pelo FDA em 2007, e o parecer final ocorreu em 2011 (SCHALKA & DOS REIS, 2011).

Na Europa, a Colipa publicou sua primeira monografia em 1994, que evoluiu para o método conhecido por *International Sun Protection Factor Test Method* (ISPF) em 2003, que passou por uma revisão em 2006 e agora foi atualizada para a metodologia ISO 24444:2010, apoiada pelas associações Européia (COLIPA), Sul Africana (CTFA-SA), Japonesa (JCIA) e Americana (CTFA-USA).

De modo geral o princípio da avaliação do FPS, comumente aceito no Brasil e no mundo, envolve a avaliação do aparecimento do eritema na pele, decorrente da exposição à radiação UVB e cuja intensidade é proporcional à dose recebida, enquanto que a avaliação do FPUVA envolve o aparecimento da pigmentação na pele (principalmente devido à exposição à radiação UVA).

### 2.3.1 Metodologias

A organização responsável por coordenar o desenvolvimento, a validação e a publicação dos métodos de fotoproteção é a Organização Internacional de Normalização ou Organização Internacional para Padronização, ou ISO (*International Organization for Standardization*). A ISO é uma entidade que reúne a associação de padronização/normalização, como por exemplo Normas Técnicas, Classificações, Normas de Procedimento, dentre outros. E foi a entidade que padronizou os métodos mais comumente aceitos mundialmente, sendo eles: ISO 24444: 2010 de Avaliação do fator de proteção solar (FPS) *in vivo*; ISO 24442:2011 de Avaliação do fator de proteção UVA (FPUVA) *in vivo*; e ISO 24443:2012 de avaliação do fator de proteção UVA (FPUVA) *in vitro*, descritas brevemente nos próximos tópicos.

### 2.3.1.1. Determinação do FPS *in vivo* – ISO 24444

O valor de FPS (EQUAÇÃO 1) consiste na razão entre o tempo de exposição à radiação UVB, necessário para desenvolver eritema na pele protegida pelo fotoprotetor, e o tempo para o mesmo efeito, com a pele desprotegida, sem aplicação de qualquer produto. Para tal determinação, é preconizado no mundo inteiro o emprego de metodologia *in vivo* com voluntários sadios e com Fototipos I, II e III (pele muito sensível, sensível e normal, respectivamente, segundo a classificação de *Fitzpatrick*), sendo que no Brasil e na Europa a metodologia mais empregada atualmente é a ISO 24444:2010.

$$FPS = \frac{DME_{Pele\ protegida}}{DME_{Pele\ desprotegida}} \quad (1)$$

Sendo,

DME = Dose mínima eritematosa (quantidade mínima de radiação capaz de formar o eritema na pele).

O protocolo é realizado através de irradiações na região do dorso dos voluntários, com doses progressivamente crescentes de radiação ultravioleta geradas por um simulador solar, a quantidade de produto aplicado é de 2,00 mg.cm<sup>-2</sup> e as leituras de formação do eritema são realizadas após 20±4 horas da exposição UV. Com isso é possível calcular a razão entre as doses e obter o Fator de Proteção Solar para cada voluntário (FPS<sub>individual</sub>). Para estimativa do FPS do produto considera-se a média de todos os resultados individuais dos voluntários incluídos, sendo que devem ser incluídos no mínimo 10 participantes e no máximo 25, com a exclusão de até 5 resultados.

O conjunto de resultados ainda passam por análises estatística, que toleram uma variação de até ±17% do FPS médio, considerando intervalo de confiança de 95%, nos resultados do produto em teste e no produto de referência, preconizados pela metodologia de acordo com o FPS do produto.

De modo geral o procedimento de avaliação do FPS *in vivo*, consiste na seleção dos voluntários, preparo e aplicação dos produtos, exposição UV, determinação da Dose Mínima Eritematosa (DME) e cálculo do Fator de Proteção Solar (FPS) e critérios estatísticos. A seguir esses procedimentos serão abordados com detalhes.

Seleção dos voluntários:

A seleção de participantes de ambos os sexos de fototipo I, II ou III de acordo com a classificação de *Fitzpatrick*, ou ângulo tipológico individual (ITA°) superior a 28, que representa a categoria de cor da pele (TABELA 3). O ângulo tipológico individual (ITA°) é calculado através de uma relação entre os parâmetros colorimétricos da escala L\*a\*b (CIE, 1976) conforme EQUAÇÃO 2. Em cada estudo devem ser incluídos no mínimo 10 participantes e no máximo 20 resultados válidos, sendo que podem ser excluídos até 5 resultados individuais para o cálculo.

$$ITA^{\circ} = \frac{[\text{ArcTangente} \frac{L^* - 50}{b^*}] \times 180}{\pi} \quad (2)$$

TABELA 3. CATEGORIAS DE COR DE PELE EM FUNÇÃO DO ITA°.

<b>Categoria da cor da pele</b>	<b>ITA°</b>
Muito clara	>55
Clara	41 a 55
Intermediária	28 a 41
Bronzeada	10 a 28
Marrom	-30 a 10
Negra	<-30

Preparo e aplicação dos produtos:

Os ensaios devem ser realizados na região das costas, para isso, deve-se demarcar no mínimo 3 sítios com 30 a 60 cm<sup>2</sup> de área, entre a linha da escápula e a cintura, evitando-se regiões com marcas ou manchas. Cada sítio é destinado a uma avaliação: 1) Produto em teste; 2) Produto padrão – já especificado pela norma (TABELA 4); 3) Área sem produto aplicado.

Os sítios devem receber os produtos aplicados a uma concentração de 2,0 mg.cm<sup>-2</sup> ± 2,5%, de forma uniforme, para isso o produto é depositado em gotículas e em seguida são espalhadas por todo sítio. O procedimento de aplicação deve levar de 20 a 50 segundos, e decorrido a aplicação, aguarda-se 15 a 30 minutos até o início da exposição UV.

TABELA 4. LIMITES DE ACEITAÇÃO E FPS DOS PRODUTOS EM TESTE PARA OS PROTETORES DE REFERÊNCIA PRECONIZADOS PELA NORMA.

Protetor solar de referência	FPS médio	Resultados aceitáveis		FPS dos produtos em teste
		<i>Limite inferior</i>	<i>Limite superior</i>	
P2	16,6	14,2	19,0	Qualquer FPS
P3	16,2	13,8	18,7	Qualquer FPS
P7	5,1	4,4	5,9	<20

FONTE: Adaptado ISO 24444 (2010).

#### Exposição UV:

O equipamento empregado é um simulador solar com lâmpada de arco de xenônio e filtros apropriados devem emitir um espectro contínuo na região do ultravioleta. Sua fonte de luz deve ser estável e uniforme, de modo a atender aos critérios de qualidade espectral especificados pela norma. A área mínima de exposição UV nos sub-sítios deve ser de 0,5 cm<sup>2</sup> (recomenda-se pelo menos 1,0 cm<sup>2</sup>) e a distância mínima entre cada sub-sítio deve ser de 0,8 cm.

Em termos do número de sub-sítios para irradiação UV, a norma determina um número mínimo de 5 sub-sítios ajustados para fornecerem doses UV incrementais segundo uma progressão geométrica com fator igual a 1,25 (se o FPS esperado para o produto em teste for menor que 25) ou igual a 1,12 (quando o FPS esperado para o produto em teste for maior que 25), sendo que é muito comum a utilização de equipamentos com 6 sub-sítios.

Antes do início do estudo é conveniente fazer as verificações das saídas além de se determinar a DME<sub>ni</sub> (dose eritematosa mínima da área não protegida) individual, a fim de se estimar e centralizar a faixa de doses UV que serão utilizadas para a determinação do FPS<sub>individual</sub>.

Após as exposições UV, deve-se remover as amostras da pele dos voluntários com algodão embebido com alguma loção.

#### Determinação da Dose Mínima Eritematosa (DME):

A determinação da DME deve ser realizada quando a resposta eritematosa é ótima, ou seja, entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação UV. É muito importante que a DME das áreas protegidas e não-protegidas sejam determinadas concomitantemente. Esta

determinação é feita de forma visual por um profissional treinado e deve ser realizada em uma sala com iluminação suficiente e uniforme (pelo menos 450lux).

Ela se caracteriza por ser a menor quantidade de energia radiante necessária para produzir a menor vermelhidão perceptível e indubitável.

Algumas circunstâncias levam a rejeição dos resultados e não pode ocorrer em mais de 5 voluntários para que o estudo seja válido, são elas:

- A formação do eritema ocorrer de forma aleatória, sem seguir a relação de dose dos sítios;
- Não haver a formação de eritema em nenhum sub-sítio;
- Haver formação de eritema em todos os sub-sítios.

Cálculo do Fator de Proteção Solar (FPS) e critérios estatísticos:

O FPS de cada produto é a média aritmética dos valores de FPS<sub>individual</sub> (FPS<sub>i</sub>) de todos os voluntários incluídos no estudo (EQUAÇÃO 3), expressa apenas com uma casa decimal. O conjunto de resultados obtidos no estudo deve gerar um valor de FPS médio com uma faixa de variação máxima de 17% dentro dos limites de um intervalo de confiança *t-Student* de 95%. O desvio-padrão da média (s) é calculado a partir da EQUAÇÃO 4, e a variação limite (c), de até 17%, é calculada a partir da EQUAÇÃO 5.

$$FPS = \frac{\sum FPS_i}{n} \quad (3)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (FPS_i)^2 - \frac{(\sum FPS_i)^2}{n}}{n-1}} \quad (4)$$

$$c = t \times s \times \sqrt{\frac{1}{n}} \quad (5)$$

Sendo:

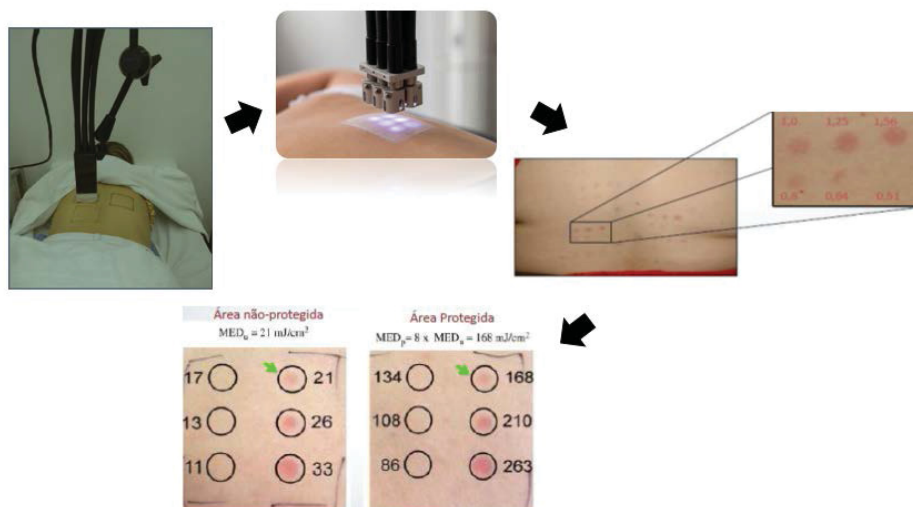
n = número total de voluntários

t = valor t na tabela de classificação bilateral de *t-Student* com probabilidade p=0,05 e grau de liberdade n-1

O intervalo de 95% de confiança da média do resultado é expresso como “[FPS-c; FPS+c]”.

A FIGURA 9 traz uma ilustração das etapas envolvidas na determinação do FPS.

FIGURA 9. ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS DO TESTE DE FPS.



FONTE: A autora (2019).

### 2.3.1.2. Fator de proteção UVA (FPUVA)

A avaliação do FPUVA pode ser determinada de duas maneiras, através de metodologia *in vivo* e/ou *in vitro*. A avaliação do FPUVA *in vivo* (EQUAÇÃO 6) conhecido como método da Pigmentação persistente (PPD - *Persistent Pigment Darkening*) é descrito na norma ISO 24442:2011 (ISO, 2011). O FPUVA consiste na razão entre o tempo de exposição à radiação UVA necessária para gerar pigmentação na pele protegida por fotoprotetor, e o tempo para o mesmo efeito, sem a pele protegida por qualquer tipo de produto. Para esta metodologia, emprega-se voluntários sadios com Fototipo II, III e IV (tipo de pele com predisposição a pigmentação segundo a classificação de *Fitzpatrick*). Ela assemelha-se a metodologia de determinação do FPS *in vivo*, com a diferença básica de que ao invés da determinação do eritema, realiza-se a determinação da pigmentação da pele. E para isso é necessário a inclusão de voluntários que sejam susceptíveis à pigmentação, portanto, voluntários de fototipos II, III e IV segundo a escala de *Fitzpatrick*. Outro aspecto relevante é acerca do simulador empregado, que trabalha majoritariamente com radiação na região do UVA.

$$FPUVA_{in vivo} = \frac{DMP_{Pele protegida}}{DMP_{Pele desprotegida}} \quad (6)$$

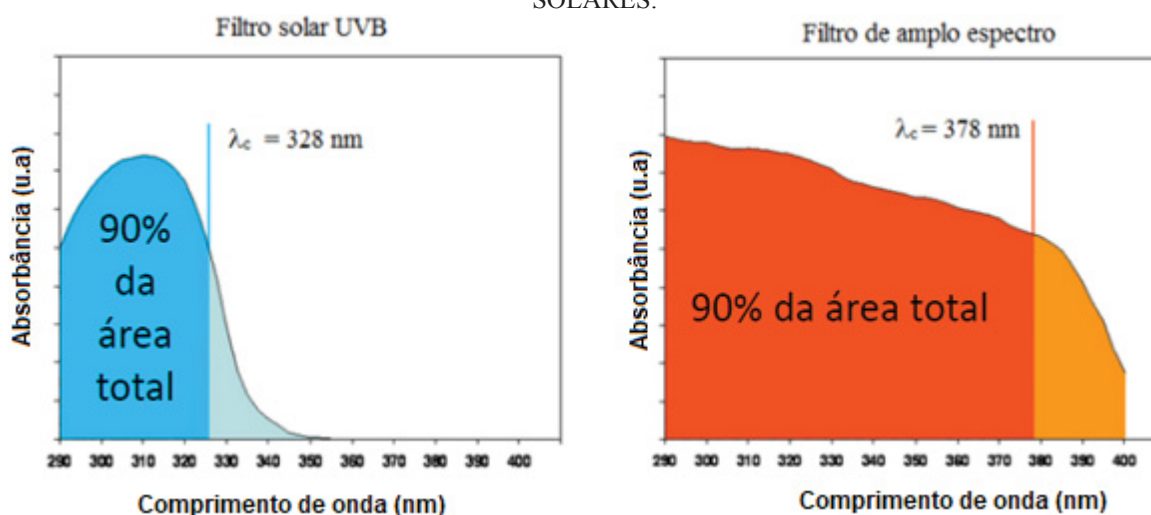
Sendo:

DMP = Dose mínima de radiação capaz de gerar pigmentação da pele

A avaliação do FPUVA *in vitro* foi desenvolvido para simular o máximo possível as condições do teste *in vivo* pela metodologia da pigmentação persistente (PPD), de modo a obter um valor de fator de proteção UVA (FPUVA) consistente com o obtido *in vivo*. O teste é feito em um filme de produto aplicado e espalhado manualmente em um substrato com rugosidade semelhante à da pele, a placa de polimetilmetacrilato (PMMA), e contempla a determinação da absorvância do produto antes e após a irradiação do mesmo com um simulador solar. São obtidos valores de FPS *in vitro* que devem ser igualados ao valor de FPS *in vivo* obtido previamente, e serve como modo de correção para os valores de FPUVA, sendo que atualmente, a metodologia mais praticada no Brasil e no mundo é a ISO 24443:2012 (ISO, 2012).

Durante a determinação do FPUVA *in vitro* é feita também a avaliação do comprimento de onda crítico (COC), que é um método *in vitro* proposto por Diffey *et al* (1994), e que baseia-se na forma do espectro de absorção de um protetor solar obtido usando espectrofotometria. De modo geral, o COC de um produto é a área sob a curva de densidade óptica integrada que começa em 290 nanômetros, e é igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nanômetros (FIGURA 10), quanto maior o comprimento de onda crítico, maior a proteção oferecida pelo produto dentro de todo espectro.

FIGURA 10. ILUSTRAÇÃO SOBRE O COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO DE PROTETORES SOLARES.



FONTE: A autora (2019).

### 2.3.1.2.1. Determinação do FPUVA *in vitro* – ISO 24443



A determinação do FPUVA *in vitro* de produtos cosméticos, é realizada conforme as seguintes etapas a serem detalhadas no decorrer do texto: avaliação do branco, avaliação da amostra, avaliação do material de referência e determinação do comprimento de onda crítico (COC).

1) Avaliação do branco:

Determinação do espectro de absorvância na faixa de 290 nm-400 nm, em intervalos de 1 nm, de 1 placa com 15 mg de glicerina aplicada, obtendo-se cinco espectros em cinco pontos diferentes de cada placa. A área de leitura em cada ponto é de 0,79 cm<sup>2</sup>.

2) Avaliação da amostra:

Sobre quatro placas de PMMA com superfície texturizada, é aplicada a amostra testada, em quantidade de aproximadamente 1,3 mg/cm<sup>2</sup>, espalhando-a manualmente com a ponta do dedo pré-saturado (com excesso de produto para facilitar o espalhamento), sem uso de dedeira, até se obter um filme visualmente uniforme.

A pesagem deve ser realizada diretamente sobre a placa posicionada em uma balança, depositando o produto em pequenas quantidades espalhadas por toda a superfície da placa totalizando 25 cm<sup>2</sup> de área de aplicação.

O espalhamento deve ser realizado em duas etapas: primeiro o produto será rapidamente espalhado com movimentos circulares sem pressão até que toda a placa seja preenchida pelo produto; depois é feita a homogeneização do filme, com movimentos retilíneos e com pressão moderada, até a formação de um filme uniforme.

A placa com amostra é deixada em repouso por no mínimo 30 minutos ao abrigo da luz, no interior de uma gaveta com temperatura controlada (entre 25°C e 35°C), para secagem do produto.

Utilizando a placa com glicerina como referência, determina-se o espectro de absorvância da amostra na faixa de 290 nm-400 nm, em intervalos de 1 nm. Serão obtidos cinco espectros da amostra, em cinco pontos diferentes da placa. Com o espectro médio de absorvância de cada placa, calcula-se seu FPS *in vitro* inicial (FPS *in vitro*), através da EQUAÇÃO 7.

$$FPS_{invitro} = \frac{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E_{\lambda} \times I_{\lambda} \times d_{\lambda}}{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E_{\lambda} \times I_{\lambda} \times 10^{-A_{0\lambda}} \times d_{\lambda}} \quad (7)$$

Sendo:

$E_\lambda$ : Espectro de Ação Eritematosa

$I_\lambda$ : Irradiância espectral simulada na faixa UV

$A_{0\lambda}$ : Absorbância monocromática média do produto, antes da exposição ao UV

$d_\lambda$ : Incremento do comprimento de onda

Em seguida, determina-se o coeficiente de ajuste C, usado para igualar o valor de FPS *in vitro* ao valor obtido no estudo *in vivo* (rotulado). O valor de C é calculado iterativamente para satisfazer à condição descrita na EQUAÇÃO 8:

$$FPS_{invitro,aj} = \frac{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E_\lambda \times I_\lambda \times d_\lambda}{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} E_\lambda \times I_\lambda \times 10^{-A_{0\lambda} \times C} \times d_\lambda} = FPS_{invivo} \quad (8)$$

Sendo:

$E_\lambda$ : Espectro de Ação Eritematosa

$I_\lambda$ : Irradiância espectral simulada na faixa UV

$A_{0\lambda}$ : Absorbância monocromática média do produto, antes da exposição ao UV

C: Coeficiente de ajuste previamente determinado na equação

$d_\lambda$ : Incremento do comprimento de onda

A norma determina que o valor do coeficiente C deve estar dentro da faixa de 0,8 a 1,6. Caso algum dos valores obtidos estiver fora da faixa determinada, novas placas devem ser preparadas para validar os resultados obtidos.

Com estes dados, calcula-se o FPUVA inicial (FPUVA<sub>0</sub>) do produto, através da EQUAÇÃO 9:

$$FP - UVA_0 = \frac{\int_{\lambda=320}^{\lambda=400} P_\lambda \times I_\lambda \times d_\lambda}{\int_{\lambda=320}^{\lambda=400} P_\lambda \times I_\lambda \times 10^{-A_{0\lambda} \times C} \times d_\lambda} \quad (9)$$

Sendo:

$P_\lambda$ : Espectro de Ação de Pigmentação Persistente

$I_\lambda$ : Irradiância espectral simulada na faixa UVA

$A_{0\lambda}$ : Absorbância monocromática média do produto, antes da exposição ao UV

C: Coeficiente de ajuste previamente determinado

$d_\lambda$ : Incremento do comprimento de onda

As quatro placas de PMMA com a amostra são então expostas a uma dose controlada de radiação UV, de modo a submeter a amostra a condições próximas às do uso real. Empregando-se um simulador solar, a amostra receberá radiação nas faixas do UVA, UVB e visível, sendo a dose calculada de modo a fornecer uma quantidade  $D$  ( $J/cm^2$ ) de energia na faixa UVA, calculada através da EQUAÇÃO 10:

$$D = FPUVA_0 \times D_0 \quad (10)$$

Em que  $D_0$  é definida pela ISO 24443 como uma dose de  $1,2 J/cm^2$  de radiação UVA.

Após a exposição à radiação UV, a absorvância de cada uma das quatro placas é novamente determinada, conforme o procedimento descrito anteriormente, para determinação do fator de proteção UVA final (FPUVA), ou seja, após a irradiação, conforme procedimento descrito anteriormente na EQUAÇÃO 9.

### 3) Avaliação do material de referência:

A avaliação do material de referência (S2) deve seguir o mesmo procedimento descrito acima para avaliação da amostra, como forma de verificação das medidas do equipamento, na frequência de uma vez ao mês. Seu valor médio de FPUVA após a irradiação deve estar dentro da faixa de 10,7 e 14,7, e é necessário o preparo de pelo menos uma placa.

### 4) Determinação do Comprimento de onda crítico (COC)

O comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) será determinado para os produtos aplicados em todas as placas, a partir dos espectros de absorvância após a irradiação UV. Trata-se de uma outra medida da capacidade de proteção UVA do produto, definido como o menor comprimento de onda em que a absorção da amostra é igual a 90% da absorção total, de acordo com a EQUAÇÃO 11:

$$\frac{\int_{\lambda=290}^{\lambda=\lambda_c} A_\lambda}{\int_{\lambda=290}^{\lambda=400} A_\lambda} = 0,9 \quad (11)$$

Sendo:

$\lambda_c$ : Comprimento de onda crítico

$A_\lambda$ : Absorbância monocromática média do produto, após a exposição ao UV

Todas as metodologias de fotoproteção da ISO estão sendo discutidas e poderão passar por revisão. Devido a necessidade de se desenvolver uma metodologia alternativa também para a determinação do FPS, que hoje se limita a uma análise qualitativa que observa o aparecimento de eritema na pele dos voluntários. Grupos da ISO já estão debatendo a possibilidade de implementação e validação de metodologia para este tipo de determinação *in vitro*, com a vantagem de avaliar quantitativamente a susceptibilidade óptica dos produtos.

Como o objetivo deste trabalho é relacionar os dados obtidos através de avaliações *in vitro* de protetores solares por espectroscopia ultravioleta, adaptando-se a metodologia descrita acima, com técnicas multivariadas de avaliação, o próximo tópico trará informações acerca deste tema.

## 2.4 QUIMIOMETRIA

Uma das vantagens da moderna instrumentação analítica é o número de variáveis que podem ser medidas em uma única amostra. Um exemplo notável é a intensidade de absorção milhares de comprimentos de onda que é rotineiramente registrada em um único espectro. De posse de tal volume de dados, a necessidade de ferramentas novas e sofisticadas para tratá-los e extrair informações relevantes cresceu muito rapidamente, dando origem à Quimiometria. A Quimiometria é uma área da química especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada (FERREIRA *et al*, 1999).

De maneira geral, podemos classificar as técnicas quimiométricas em três grandes grupos: planejamentos e otimização de experimentos, calibração multivariada e reconhecimento de padrões, sendo que este último pode ser dividido em reconhecimento de padrões supervisionado e não supervisionado (FERREIRA *et al*, 1999).

O planejamento de experimentos permite variar, de forma simultânea e sistemática, todas as variáveis envolvidas no processo de interesse, de tal maneira que a influência de cada uma das variáveis assim como a relação entre as mesmas pode ser avaliada. Tais métodos oferecem um entendimento maior sobre o processo mesmo com uma quantidade reduzida de experimentos (FERREIRA, 2015).

O reconhecimento de padrões engloba um conjunto de técnicas que possibilita encontrar semelhanças e diferenças que permitam o agrupamento de amostras. E são divididas em dois grupos: métodos supervisionados, nos quais as classes das amostras são conhecidas e pré-estabelecidas, e nos métodos não supervisionados que não requerem nenhuma informação prévia, apenas as informações provenientes da análise (BEEBE, 1998).

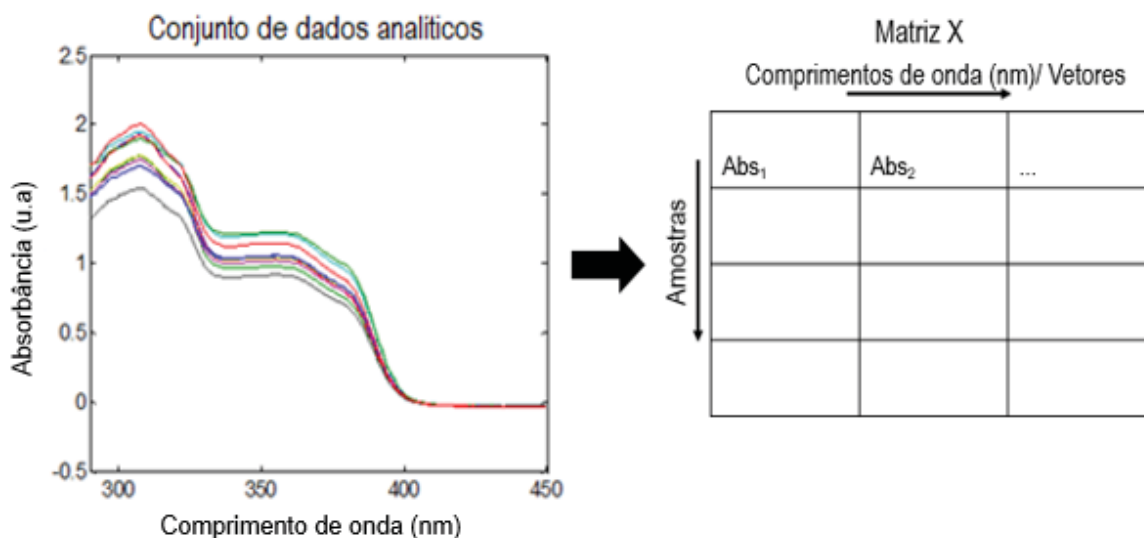
Os métodos não supervisionados mais comumente utilizados são a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos por Métodos Hierárquicos (HCA), no caso dos métodos supervisionados destacam-se a Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes (SIMCA), k-ésimo Vizinho mais próximo (k-NN), Análise Discriminante Linear (LDA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais associado a análise discriminante (PLS-DA) (FERREIRA, 2015).

Enquanto a calibração multivariada engloba um conjunto de técnicas que consiste na construção de modelos matemáticos empíricos que permitam quantificar a correlação existente entre as propriedades de interesse (variável dependente) e o sinal analítico (variável independente). Os métodos mais utilizados são a Regressão pelo Método dos Quadrados Mínimos: Clássico (CLS), Inverso (ILS) e Parciais (PLS); Regressão por Componentes Principais (PCR) e o de Regressão Linear Múltipla (MLR) (FERREIRA, 2015).

#### 2.4.1 Análise de componentes principais (PCA)

Após a obtenção dos dados, eles são organizados em uma matriz  $\mathbf{X}$  de dimensão  $m$  x  $n$ , onde as linhas ( $m$ ) representam as amostras e as colunas ( $n$ ) representam as variáveis correspondentes aos valores dos sinais instrumentais (FIGURA 11). Na PCA, um conjunto de dados com um número elevado de variáveis pode ser observado com clareza a partir de fatores que apresentam os dados em menores dimensões (BEEBE, 1998).

FIGURA 11. EXEMPLIFICAÇÃO DO MODO DE ORGANIZAÇÃO DOS DADOS ESPECTRAIS.



FONTE: A autora (2019).

A PCA consiste na descrição da variância do conjunto de dados através de componentes principais (PCs), ou fatores, resultantes da decomposição da matriz de dados em um novo sistema de coordenadas, formado por eixos ortogonais e independentes entre si, obtidos em ordem decrescente de variância (OTTO, 1999; BEEBE, 1998; MOITA NETO & MOITA, 1998).

À medida que a variância decresce, diminui o percentual de informação contido nas PCs e, conseqüentemente, um menor número de PCs são necessárias para representar os dados, obtendo-se a redução da sua dimensionalidade (BEEBE, 1998).

Do ponto de vista matemático, o procedimento da análise de componentes principais pode ser descrito como a decomposição da matriz  $\mathbf{X}$  em duas matrizes, uma de *scores* e uma matriz ortonormal de pesos (*loadings*) (FERREIRA, 2015). Os *scores* expressam as relações entre as amostras, enquanto os pesos indicam as relações entre as variáveis. Essa decomposição equivale a uma mudança de base do espaço das variáveis originais para o espaço das componentes principais (FERREIRA, 2015).

De modo geral, a PCA é um método de projeção de dados e cada amostra é projetada em um novo conjunto de base e essa informação se encontra na matriz de *scores*, essa redução da dimensionalidade do sistema, para um subespaço menor, ocorre porque as variações sistemáticas presentes nos dados foram concentradas em um número menor de eixos, isso significa que as últimas PCs contêm principalmente variações aleatórias, tais como erros experimentais e podem ser ignoradas. Assim separa-se estrutura inerente do erro aleatório experimental e ruído instrumental (FERREIRA, 2015).

Neste conjunto, apenas as variáveis realmente representativas estão presentes o que funciona como uma espécie de filtro para as informações redundantes ou de caráter ruidoso e os coeficientes da combinação linear, os *loadings*, correspondem a uma medida da contribuição de cada variável original ao sistema (BEEBE, 1998).

Assim, a PCA pode ser utilizada principalmente para: 1) Observar agrupamentos no conjunto de dados; 2) Identificar amostras anômalas (*outliers*); 3) Verificar a contribuição das variáveis originais no novo conjunto de variáveis obtido (MOITA NETO & MOITA, 1998).

#### 2.4.2 Calibração Multivariada

Na calibração multivariada o objetivo é estabelecer um modelo de regressão relacionando os sinais analíticos medidos para uma amostra com uma propriedade específica. Sendo os métodos mais consagrados na literatura: a Regressão Linear Múltipla (MLR), a Regressão por Componentes Principais (PCR) e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) (FERREIRA, 2015).

Os mais utilizados são o PCR e o PLS, devido principalmente à sua ampla gama de aplicações e à sua facilidade de uso, ambos são capazes de lidar com grande presença de colinearidade e ruídos nos dados e permitem manipular um arranjo de dado que contenha mais variáveis que amostras (mais colunas do que linhas na matriz de dados) (FERREIRA *et al*, 1999).

A principal diferença entre eles é a forma pela qual as componentes principais são calculadas. O PLS relaciona a informação contida no bloco **Y**, das variáveis independentes (concentração do analito ou outra propriedade), com o bloco **X**, das variáveis dependentes (espectrais), durante a decomposição dos dados, utilizando os dois simultaneamente, isto leva a uma pequena perda da ortogonalidade das componentes principais, e com isso, elas recebem a denominação mais abrangente de variáveis latentes (LV). O PCR decompõe **X** separadamente e depois correlaciona seus *scores* com **Y**, através de uma Regressão Linear Múltipla (FERREIRA *et al*, 1999).

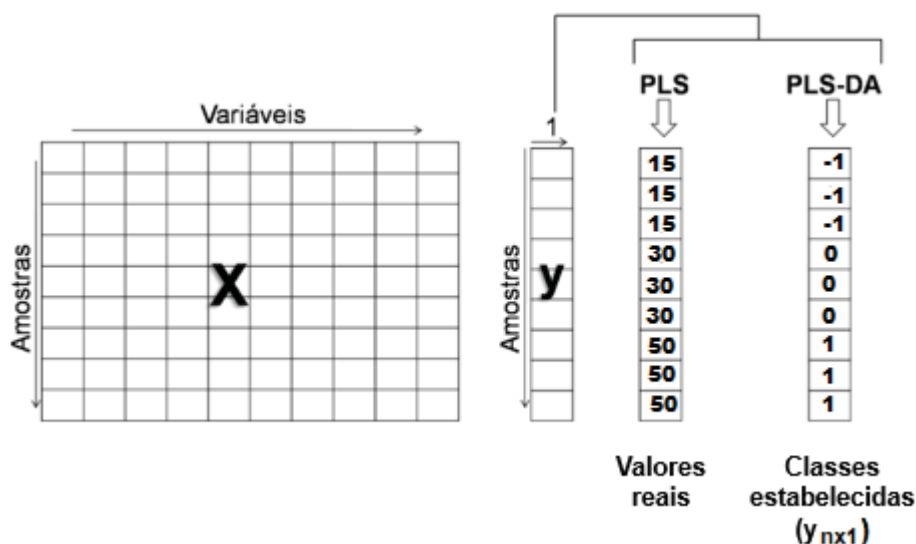
O PLS-DA, baseia-se no método de regressão PLS para construção de modelos preditivos, e buscam relacionar as respostas instrumentais (**X**) com os rótulos das classes como um vetor coluna dependente *y* (PEERBHAY *et al*, 2013; ALMEIDA *et al*, 2013; PONTES, 2011).

### 2.4.3 Análise Discriminante pelos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

Barker & Rayens (2003) notaram que algumas pesquisas estavam aplicando o modelo PLS não apenas para a determinação quantitativa, mas para problemas de classificação e discriminação. Diante disso, este tipo de modelagem via PLS foi formalizado como análise discriminante com a denominação PLS-DA, acrônimo para Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais.

O PLS-DA é classificado como um método supervisionado, pois é desenvolvido mediante o conhecimento prévio das classes do conjunto de calibração (NAES *et al*, 2004; SOUZA & POPPI, 2012). A construção destes modelos segue o desenvolvimento de um modelo PLS tradicional, no entanto difere no vetor  $y_{nx1}$ , que ao invés de informações da propriedade de interesse, são inseridos os números das classes das amostras, conforme demonstrado na FIGURA 12.

FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRUPOS X E Y DE MODELOS PLS DE PLS-DA.



FONTE: A autora (2019).

Observa-se que o vetor  $y_{nx1}$  no modelo PLS-DA foi preenchido com valores de -1, 0 e 1, no exemplo da FIGURA 12. Esses números são escolhidos arbitrariamente (NAES *et al*, 2004) e servem para distinguir uma classe em relação às demais.

### 2.4.4 Etapas na construção de um modelo



Ao longo do processo de modelagem deve-se atentar a algumas etapas indispensáveis para garantia de qualidade do modelo, além da organização adequada dos dados. São elas o emprego de pré-processamentos, seleção de variáveis, detecção de amostras anômalas e validação do modelo (cruzada e externa) (FERREIRA, 2015).

#### 2.4.4.1 Pré-processamentos

Os métodos de pré-processamentos são frequentemente utilizados antes da regressão multivariada (THOMAS, 1994). Esses são capazes de facilitar a interpretação dos dados multivariados e melhorar a qualidade de previsão dos modelos de calibração, através da redução de efeitos físicos que podem influenciar nas medidas instrumentais, remoção de problemas na linha de base, diminuição de ruído, entre outras medidas que podem ser aplicadas a princípio nos registros instrumentais antes da construção dos modelos com a finalidade de evitar que fontes de variações possam impedir a classificação e, assim, permitir o desenvolvimento de um modelo simples e robusto (THOMAS, 1994).

Ao longo do trabalho foram testados diversos tipos de pré-processamento, como:

- a) Centrar os dados na média: que resulta em uma translação dos eixos para o valor médio de cada um deles, ou seja, a estrutura dos dados é preservada;
- b) Correção Multiplicativa de Espalhamento (MSC): utilizado para corrigir efeitos de espalhamento aditivos e multiplicativos na absorbância, principalmente causados por fenômenos físicos (alteração de caminho ótico, sensibilidade do detector, entre outros);
- c) Variação Normal Padrão (SNV): Também corrige efeitos aditivos e multiplicativos e é apropriada para remover interferências de espalhamento e tamanho de partícula sólida;
- d) Primeira derivada: que desloca o espectro como um todo de um valor constante, positivo ou negativo, em relação ao zero de absorbância;
- e) Alisamento pela média: utilizado quando se deseja aumentar a relação Sinal/Ruído (FERREIRA, 2015).

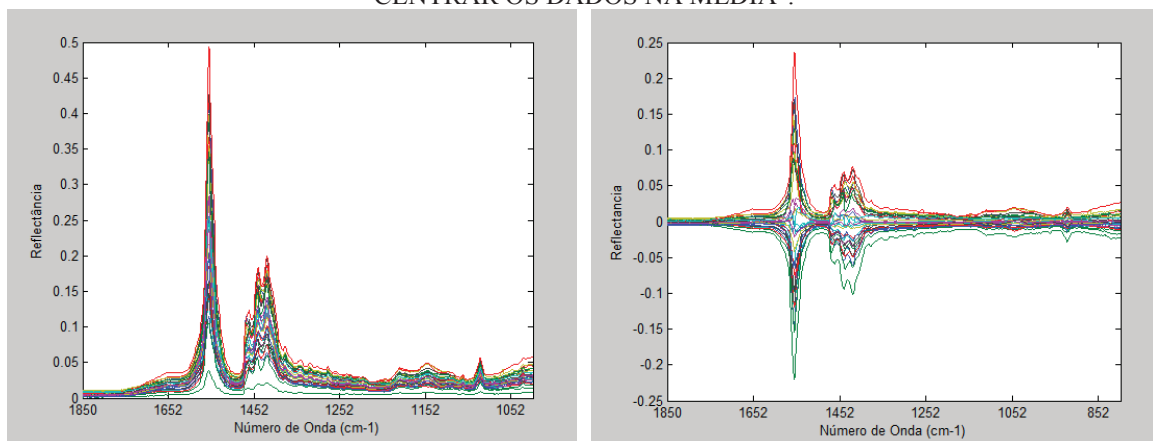
Porém, centrar os dados na média e alisamento foram os que geraram melhores resultados e serão apresentados como mais detalhes nos tópicos a seguir.

Centrar os dados na média:

Calcula a média das intensidades de todas as amostras de calibração para cada variável fixa como, por exemplo, o comprimento de onda. Em seguida, subtrai o valor médio

de cada uma das intensidades. Esse procedimento pode ser realizado tanto nas propriedades de interesse ( $y$ ) quanto nos registros instrumentais ( $X$ ), desde que submetidos um de cada vez, e pode reduzir em um fator ( $LV$ ) o tamanho do modelo construído (THOMAS, 1994). O efeito do pré-processamento pode ser visualizado na FIGURA 13.

FIGURA 13. ILUSTRAÇÃO DO RESULTADO DA APLICAÇÃO DO PRÉ-PROCESSAMENTO "CENTRAR OS DADOS NA MÉDIA".

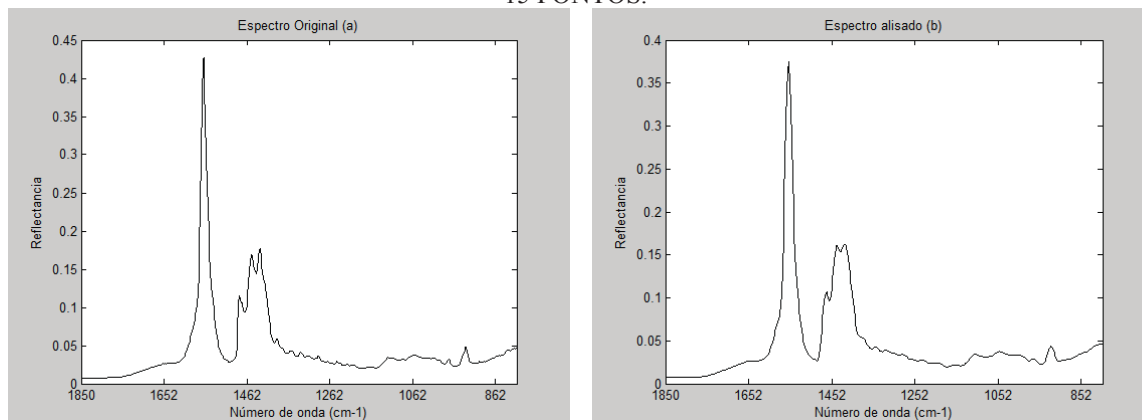


FONTE: Adaptada de GERÔNIMO (2016).

Alisamento pela média móvel:

O objetivo é aumentar a razão sinal/ ruído e reduzir o número de variáveis. Para realização deve selecionar o tamanho da janela de alisamento, levando-se em consideração que o valor selecionado irá influenciar no decréscimo do número de variáveis e podem alterar algumas características do espectro conforme exemplificado na FIGURA 14. É aplicável quando deseja-se reduzir a quantidade de ruídos (FERREIRA, 2015).

FIGURA 14. EXEMPLIFICAÇÃO DE UM ESPECTRO ORIGINAL (A) E ALISADO COM JANELA DE 15 PONTOS.



FONTE: Adaptada de GERÔNIMO (2016).

#### 2.4.4.2 Validação cruzada e validação externa do modelo

Uma das etapas mais importantes do desenvolvimento de um modelo de calibração é a validação (BRERETON, 2003). Nesta etapa é possível verificar a capacidade de previsão de um modelo, comparando as propriedades de interesse estimadas pelo modelo com aquelas de referência de amostras conhecidas, mas não participantes do seu processo de construção (PASQUINI, 2003; THOMAS, 1994).

Quando existe um número restrito de amostras disponíveis, uma forma de realizar a validação do modelo e/ou a escolha do número de variáveis latentes empregando-se as próprias amostras do conjunto de calibração é através da validação cruzada (CV) (BRERETON, 2003; WOLD *et al*, 2001). Neste procedimento, realizado interativamente pelos programas computacionais, retira-se uma ou mais amostras do conjunto de calibração para a construção do modelo, método denominada “*leave-one-out*” utilizando esta(s) amostra(s) para prever a propriedade de interesse (NAES *et al*, 2004; BRERETON, 2003; THOMAS, 1994). Ou seja, na validação cruzada a amostra retirada, não participa da construção do modelo na rodada em que será utilizada para a previsão. Este procedimento é realizado várias vezes, até que todas as amostras do conjunto de calibração, sejam utilizadas como objeto de previsão.

A partir da previsão da propriedade de interesse das amostras removidas, é possível calcular o erro (subtração do valor da propriedade de interesse conhecida pela estimada) e estimar a raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV) para cada variável latente (NAES *et al*, 2004; BRERETON, 2003; THOMAS, 1994). Assim, o RMSECV pode ser expresso pela EQUAÇÃO 12.

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

Sendo:

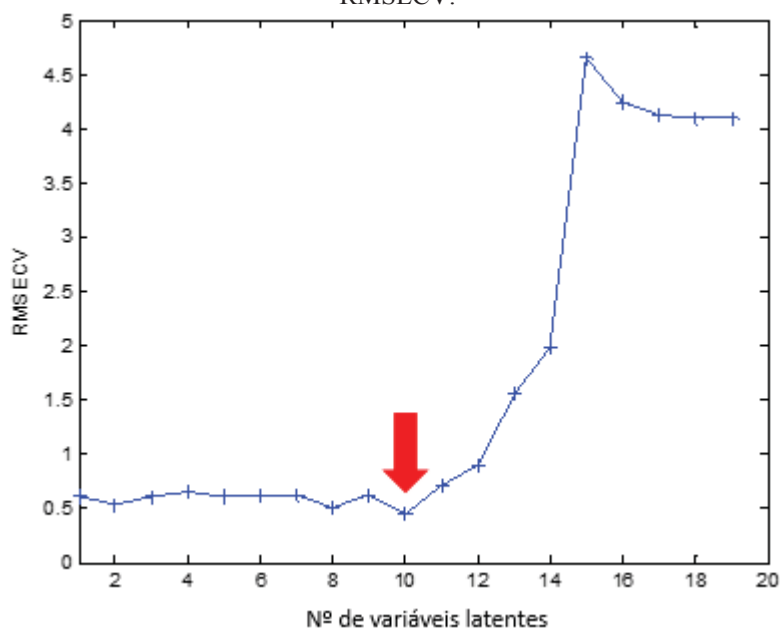
$n$  = número total de amostras de calibração utilizadas

$y_i$  = vetor dos valores de referência das propriedades de interesse

$\hat{y}_i$  = vetor das propriedades de interesse estimadas

Assim, um modelo é construído sob diferentes números de variáveis latentes, e o número de LV escolhido é determinado pelo RMSECV. Normalmente, a partir de um gráfico RMSECV versus número de LV, como exemplificado na FIGURA 15, seleciona-se o valor mínimo ou o valor a partir do qual se observa uma estabilização do RMSECV, pois indicará o menor número que atingiu o menor erro estimado para o processo de validação cruzada (CV) (NAES *et al*, 2004; BRERETON, 2003; THOMAS, 1994).

FIGURA 15. EXEMPLIFICAÇÃO DE GRÁFICO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTE VERSUS RMSECV.



FONTE: A autora (2019).

Uma vez que a validação cruzada utiliza amostras do conjunto de calibração, o seu procedimento auxilia na remoção de influências de fatores internos, como o ruído instrumental, porém, quando ocorre uma alta correlação dessas amostras esse tipo de validação não é eficaz. Por isso, recomenda-se uma outra forma de validação baseada em amostras diferentes daquelas empregadas na etapa de calibração, denominadas amostras de previsão ou teste, que também devem ter as propriedades de interesse conhecidas (PASQUINI, 2003; NAES, 2004; FERREIRA *et al*, 1999; BRERETON, 2003). Portanto, com estas amostras independentes da construção do modelo, efetua-se novas previsões para então comparar os valores estimados com os valores de referência conhecidos pela raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP) determinada pela EQUAÇÃO 13, sendo certificada a validade ou invalidade do método, atestando a capacidade de previsão do mesmo (PASQUINI, 2003; NAES, 2004).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{np} (y_i - \hat{y}_i)^2}{np}} \quad (13)$$

Sendo:

n=número total de amostras de validação utilizadas

$y_i$  = vetor dos valores de referência das propriedades de interesse

$\hat{y}_i$  = vetor das propriedades de interesse estimadas

Depois de escolhido o número de variáveis latentes, desenvolvido e validado o modelo, pode-se empregá-lo em situações práticas com amostras reais para a previsão, desde que essas sejam submetidas às mesmas condições adotadas pelas amostras do conjunto de calibração (FERREIRA *et al*, 1999).

## 2.5 TRABALHOS CORRELATOS

A primeira metodologia de avaliação de fotoproteção *in vitro* através da espectrometria ultravioleta foi proposta por Diffey & Robson (1989), em que os produtos eram aplicados na quantidade de 0,75 mg.cm<sup>-2</sup> no substrato Transpore<sup>TM</sup>. Grande parte das demais metodologias propostas a partir desta publicação foram adaptações do método sugerido, pois até então tentava se obter o FPS sem a avaliação do filme e sim do produto.

Stanfield *et al* (2010) realizou diferentes experimentos variando parâmetros que podem influenciar na dose resposta de um produto e consequentemente no resultado *in vitro* gerado, e verificou que os aspectos críticos na avaliação de protetores solares são: o substrato, a quantidade de produto aplicado, a técnica de aplicação e a instrumentação empregada. Além disso, a medida *in vitro* além de facilitar a obtenção do FPS fornece informações a respeito da fotoestabilidade e espectro de proteção do produto.

Miksa *et al* (2015) propôs uma metodologia para avaliação do fator de proteção solar *in vitro*, dando ênfase especialmente aos aspectos matemáticos da avaliação, propondo uma nova abordagem de método de ensaio para obtenção de resultados mais similares aos *in vivo* para fins de rotulagem. A metodologia empregando espectrometria leva em consideração as principais recomendações da ISO 24443:2012, e fez uso de dois tipos de placas de PMMA (moldada e jateada) para avaliação de 27 produtos de mercado na forma de emulsão. Os resultados obtidos para ambos substratos foram comparados e o resultado

obtido para a correlação entre FPS *in vitro* e FPS *in vivo*, originou um coeficiente de correlação de aproximadamente 0,812 e coeficiente angular de 0,883.

No ano seguinte, Miksa *et al* (2016) deu sequência ao trabalho realizado anteriormente, avaliando 113 protetores solares divididos em 5 grupos (emulsão, óleo, álcool, bastão e pó). O método demonstrou boa correlação entre o resultados *in vitro* e *in vivo* para diferentes tipos de produto, atingindo um coeficiente de correlação que varia de 0,8 até 0,993 para o grupo dos óleos, composto por 8 produtos.

A principal metodologia que está sendo cotada para a ISO como método internacional de determinação de FPS *in vitro*, é denominada *Hybrid DSR*, e foi proposta por Junior *et al* (2014). Nela, é feita a avaliação da intensidade refletida de radiação UVA monocromática (320-400 nm) antes e após a aplicação de um filtro solar na pele através da técnica de espectrofluorimetria, acompanhada da avaliação da absorção de UVB (290-320) *in vitro* pela técnica de espectroscopia UV utilizando o equipamento Labsphere UV-2000S e placas de PMMA como substrato. Foram testadas 17 formulações de FPS conhecido através das técnicas de espectrometria de absorção, empregando substratos com cores similares aos diferentes Fototipos de pele (I a IV – branca a negra) que também possuíam resultados de reflectância similares aos de cada tipo de pele. Os autores sugerem limitar o uso de substratos que correspondem aos Fototipos I, II e III (empregados no teste de FPS *in vivo*), que originou um coeficiente de correlação de 0,98 comparado aos resultados obtidos no teste *in vivo*. (JUNIOR *et al*, 2014).

De modo geral, nos últimos 56 anos, várias metodologias *in vitro* foram desenvolvidas e publicadas para avaliar o FPS *in vitro* de produtos, empregando diversos instrumentos, substratos, densidade óptica da aplicação do produto, com o objetivo de desenvolver uma alternativa ao teste oficial *in vivo* que envolve a exposição de humanos a radiação UV, no entanto, ainda não existe um método internacional validado que justifique a substituição do teste *in vivo*.

Técnicas analíticas associadas a ferramentas quimiométricas tem sido cada vez mais utilizadas na indústria, uma vez que fornecem respostas rápidas, e são acopladas a avaliações que podem ser realizadas *in situ*. O artigo publicado por Karoui & Baerdemaeker (2016) faz uma revisão de técnicas alternativas, para a determinação da qualidade e da autenticidade dos produtos lácteos, tais como, espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), e médio (MIRS), espectroscopia da fluorescência da face dianteira (FFFS), isótopo estável e ressonância magnética nuclear (NMR) acoplados a quimiometria.

Oliveira *et al* (2015) avaliou FPS *in vitro* e a estabilidade de 20 filtros solares comerciais empregando a técnica de espectrometria de massa acoplado a análise PCA, em que foi possível classificar e agrupar produtos de mesmo FPS, além de identificar a concentração de filtros UVB e UVA antes e após irradiação ultravioleta. Também em 2015, Abdel-Ghany *et al* desenvolveu um método para determinação simultânea de 3 tipos de filtros orgânicos em protetores solares empregando técnicas de calibração multivariada.

Outras aplicações das ferramentas quimiométricas na indústria cosmética envolvem a identificação de fraude (DECONINCK *et al*, 2014; KURIAKOSE *et al*, 2010), controle de qualidade (LAFHAL *et al*, 2016; KULIKOV *et al*, 2012), determinação do tempo de validade (PEDRO & FERREIRA, 2009), entre outros.

Neste sentido, o uso de ferramentas quimiométricas, tais como a geração de modelos de calibração a partir dos espectros brutos de absorção da radiação na região do ultravioleta mostram-se uma alternativa promissora. A partir do qual, busca-se a geração de modelos de calibração multivariada utilizando PLS-DA a fim de identificar regiões importantes dos espectros para obtenção dos modelos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Através do presente trabalho, propõe-se investigar a correlação entre os fatores de proteção (FPS) de protetores solares, obtidos através de medidas *in vivo*, com os resultados de absorção na região ultravioleta adquiridos através de medidas espectroscópicas, empregando-se técnicas de calibração multivariada.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de absorvidade de amostras de protetores solares através de análise espectrofotométrica utilizando equipamento Labsphere UV-2000S, seguindo as diretrizes da norma ISO 24443:2012;
- Realizar uma análise exploratória dos dados espectroscópicos através da análise de componentes principais para verificar possíveis agrupamentos de interesse;
- Otimizar modelos de calibração multivariada entre os dados espectrométricos obtidos dos produtos comerciais e seus respectivos FPS (nominais ou *in vivo*) pela análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA);
- Validar o modelo através da técnica de validação externa, investigando a capacidade de previsão em amostras que não participaram da construção do modelo.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Para a condução dos testes foram obtidos espectros de absorção molecular empregando-se o equipamento Espectrofotômetro ultravioleta (*Labsphere*, UV-2000S, *North Sutton, NH, USA*), como também placas de polimetilmetacrilato (PMMA) (*Helioscreen, Helioplates HD6, Lokeren, Belgium*) de dimensões 5x5cm e rugosidade de 6 µm, como substrato para avaliação. Para aplicação dos produtos foram empregadas pipetas de deslocamento positivo. Para pesagem das placas utilizou-se a Balança Analítica (*Mettler toledo, XS204, Ohio, EUA*) e para secagem das amostras foi utilizado um Forno de Hibridização (*Shel lab, Sho1, Cornelius, USA*) como estufa.

### 4.2 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Para obtenção das medidas, empregou-se o software *Labsphere* UV-2000S (*Labsphere*) que opera conectado ao espectrofotômetro ultravioleta. Para a montagem das matrizes de dados utilizou-se o *software Origin Pro 8.0<sup>®</sup>* (*OriginLab*), enquanto que para as análises quimiométricas, o pacote *PLS-toolbox 3.0* (*Eigenvector Research, Inc.*) que opera em ambiente *MATLAB<sup>®</sup>* v.7.0.1 (*Math Work Inc.*) e o *software Solo 87* (*Eigenvector Research, Inc.*).

### 4.3 AMOSTRAS AVALIADAS

Foram avaliadas trinta amostras de protetores solares comerciais de diferentes marcas do mercado como Sundown, Natura, Avon, Australian Gold, entre outros, e produtos fornecidos pelo Grupo Boticário. Entre as amostras havia produtos rotulados como FPS 15, FPS 30 e FPS 50, e o material de referência S2 recomendado pela ISO 24443:2012, cujo FPS nominal é 16. Todas as amostras avaliadas são classificadas como “Protetor solar sem cor”, ou seja, não possuem pigmentos em sua fórmula. A Tabela 5 lista as amostras analisadas, bem como seus respectivos códigos de identificação, fator de proteção rotulado e real, obtido através de estudos de avaliação realizados no instituto de avaliação de produtos: Allergisa do Grupo Investiga.

TABELA 5. DESCRIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AVALIADOS.

<b>Descrição do Produto</b>	<b>Identificação da amostra</b>	<b>FPS<sub>rótulo</sub></b>	<b>FPS<sub>real</sub></b>
Padrão ISO FPS 16 (S2) - Padrão Secundário	1a	16	16,6
Protetor Solar Corporal FPS 15 – Marca A	2a	15	16,1
Protetor Solar FPS 15 – Marca B	3a	15	15,2
Protetor FPS 15 – Marca C	4a	15	nd
Protetor Solar FPS15 – Marca D	5a	15	nd
Protetor Solar FPS 15 – Marca E	6a	15	nd
Protetor Solar FPS15 – Marca F	7a	15	nd
Protetor Solar Corporal Spray Gel FPS 15 – Marca G	8a	15	15,2
Creme de mãos FPS 15 – Marca H	9a	15	15,1
Protetor Solar FPS 30 – Marca C	11b	30	nd
Protetor Solar FPS 30 – Marca D	12b	30	nd
Protetor Solar Corporal FPS 30 – Marca A	13b	30	30,8
Protetor Solar FPS30 – Marca B	14b	30	33,1
Protetor Solar Spray Gel FPS 30 – Marca G	15b	30	33,8
Protetor Solar Loção FPS 30 – Marca I	16b	30	nd
Protetor Solar FPS 30 – Marca J	17b	30	nd
Loção Protetora FPS 30 – Marca K	18b	30	nd
Protetor Corpo FPS 30 – Marca E	19b	30	nd
Protetor Solar FPS30 – Marca F	20b	30	nd
Protetor Solar FPS 50 – Marca C	21c	50	54,9
Protetor Solar FPS 50 – Marca D	22c	50	53,8
Protetor solar FPS 50 sem cor – Marca L	23c	50	nd
Protetor Solar Loção FPS 50 – Marca I	24c	50	nd
Protetor Solar FPS 50 – Marca M	25c	50	nd
Protetor Solar FPS 50 – Marca E	26c	50	52,7
Protetor Solar FPS50 – Marca F	27c	50	nd
Protetor Solar Facial FPS 50 – Marca N	28c	50	nd
Protetor Solar FPS 50 – Marca J	29c	50	nd
Protetor Solar Corporal Spray Gel FPS 50 – Marca G	30c	50	58,6
Protetor Solar Facial FPS 30 – Marca N	33c	30	nd

nd: não determinado

#### 4.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

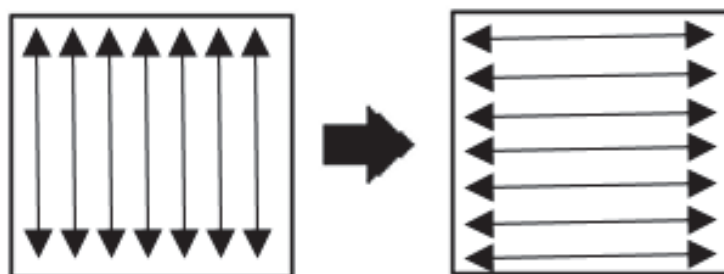
Os ensaios foram inspirados na metodologia ISO 24443:2012, de avaliação da FPUVA *in vitro*, para isso, aplicaram-se aproximadamente 32,5 mg (variação de  $\pm 10\%$ ) de amostra, equivalentes a concentração de 1,3 mg/cm<sup>2</sup> de produto, de forma padronizada em

2 a 4 placas de PMMA. Então, o produto foi espalhado manualmente com a ponta do dedo pré-saturado (com excesso de produto), até se obter um filme visualmente uniforme.

A pesagem foi realizada diretamente sobre a placa posicionada em uma balança, depositando o produto em pequenas quantidades espalhadas por toda a superfície da placa, totalizando 25 cm<sup>2</sup> de área de aplicação. O espalhamento foi realizado em duas etapas: primeiro o produto foi rapidamente espalhado com movimentos circulares sem pressão até que toda a placa estivesse preenchida pelo produto; depois realizou-se a homogeneização do filme, com movimentos retilíneos e com pressão moderada, até a formação de um filme uniforme. A FIGURA 16 ilustra a forma de espalhamento do produto.

2

FIGURA 16. FORMA DE ESPALHAMENTO DOS PRODUTOS NA PLACA DE PMMA.

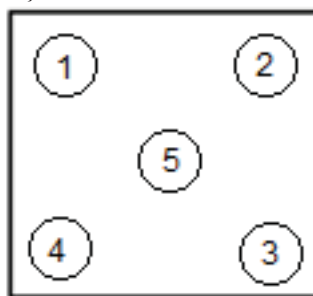


FONTE: A autora (2019).

Após o espalhamento, as placas foram novamente pesadas, com uma perda aproximada de 20% de amostra, e então deixadas em repouso por no mínimo 30 minutos ao abrigo da luz, em câmara fechada com temperatura controlada ( $34,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ), antes do início das análises, para secagem e formação do filme dos produtos no substrato. Decorrido este período foram realizadas as determinações através da técnica de espectroscopia ultravioleta.

Os espectros de absorvância das amostras foram obtidos na faixa de 290 nm - 450 nm, em intervalos de 1 nm, sendo que em cada placa foram obtidos cinco espectros, em cinco pontos diferentes da placa (FIGURA 17). O espectro de absorvância médio de uma placa com 15 µL de glicerina pura foi utilizado como branco analítico para todas as análises.

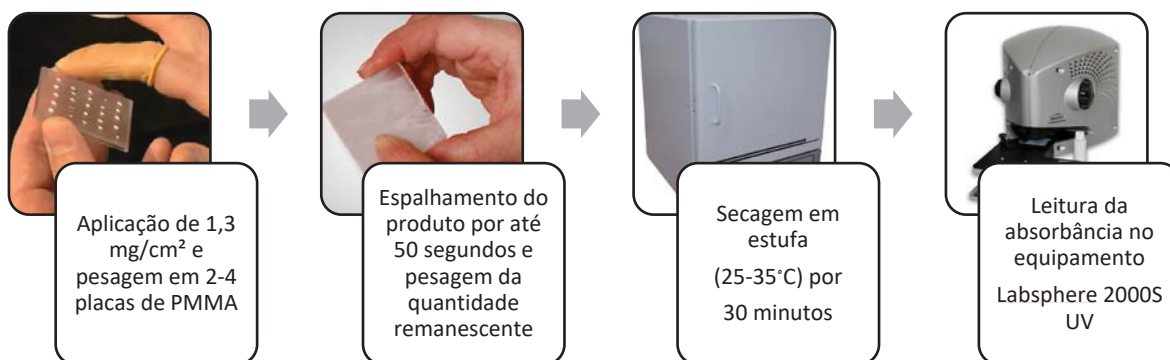
FIGURA 17. ILUSTRAÇÃO DOS PONTOS DE MEDIÇÃO NA PLACA.



FONTE: A autora (2019).

A FIGURA 18 apresenta uma ilustração referente as etapas que foram realizadas para a aquisição das medidas de espectroscopia ultravioleta, conforme passos descritos anteriormente.

FIGURA 18. ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE AQUISIÇÃO DAS MEDIDAS.



FONTE: A autora (2019).

Após a obtenção da absorvância inicial descrita anteriormente, as placas foram expostas a uma dose controlada de radiação na faixa de 300-800 nm, empregando-se um simulador solar. A dose de radiação UVA (D) foi calculada através do FP-UVA fornecido pelo equipamento através do ajuste da curva obtida pelo FPS nominal, através da EQUAÇÃO 10 (anteriormente apresentada).

Após a irradiação com a dose equivalente, determinou-se novamente os espectros de absorvância UV, dessa vez identificados como “b” (após irradiação), da mesma forma e nos mesmos pontos de análises anteriores. Os dados gerados durante esta segunda avaliação foram submetidos a avaliação via PCA, onde identificou-se que as diferenças entre as amostras eram superiores as diferenças entre os mesmos produtos antes e após a radiação, ou seja, as amostras permaneciam distribuídas da mesma forma antes e após a irradiação, por conta disto, os dados após irradiação não foram utilizados nas análises posteriores.

#### 4.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Conforme descrito anteriormente, os softwares empregados para as análises quimiométricas foram o pacote *PLS-toolbox* 3.0 (*Eigenvector Research, Inc.*) que opera em ambiente *MATLAB*® v.7.0.1 (*Math Work Inc.*) e o software *Solo 87* (*Eigenvector Research, Inc.*) para elaboração das ilustrações.

A avaliação exploratória dos dados foi realizada pela análise de componentes principais (PCA), e consistiu na verificação dos agrupamentos para as amostras de mesmo e diferentes valores de FPS através da aplicação de diferentes pré-processamentos dos dados, dentre eles foram testados: centrar os dados na média, primeira derivada, alisamento, MSC e SNV.

Após a análise da PCA e a verificação de um possível padrão de agrupamento das amostras, foram feitas diversas tentativas de construção de modelos PLS-DA para classificação delas. Para a construção do modelo, foram consideradas as 30 amostras analisadas neste trabalho, e incluídos os dados de 7 amostras testadas em outro laboratório de pesquisa (Allergisa), conforme procedimento experimental descrito no item 4.4.

Para a seleção das amostras pertencentes ao conjunto de calibração e validação, observou-se a distribuição espacial das amostras (em termos de *scores*) nas duas primeiras componentes principais (PC1 x PC2), evitando-se que amostras pertencentes ao conjunto de validação não estivessem nos limites extremos de cada classe. Assim, foram selecionadas 28 amostras para o conjunto de calibração e 8 amostras para o conjunto de validação externa, em ambos os grupos existiam amostras cujo FPS real está disponível.

O modelo PLS-DA é uma derivação do método de regressão, para isso, é necessário definir o bloco das variáveis dependentes do conjunto  $y$ , que consiste em um vetor coluna contendo números inteiros que codificam a classe de cada uma das amostras (FERREIRA, 2016). No presente trabalho, as classes dos produtos foram codificadas conforme apresentado na Tabela 6.

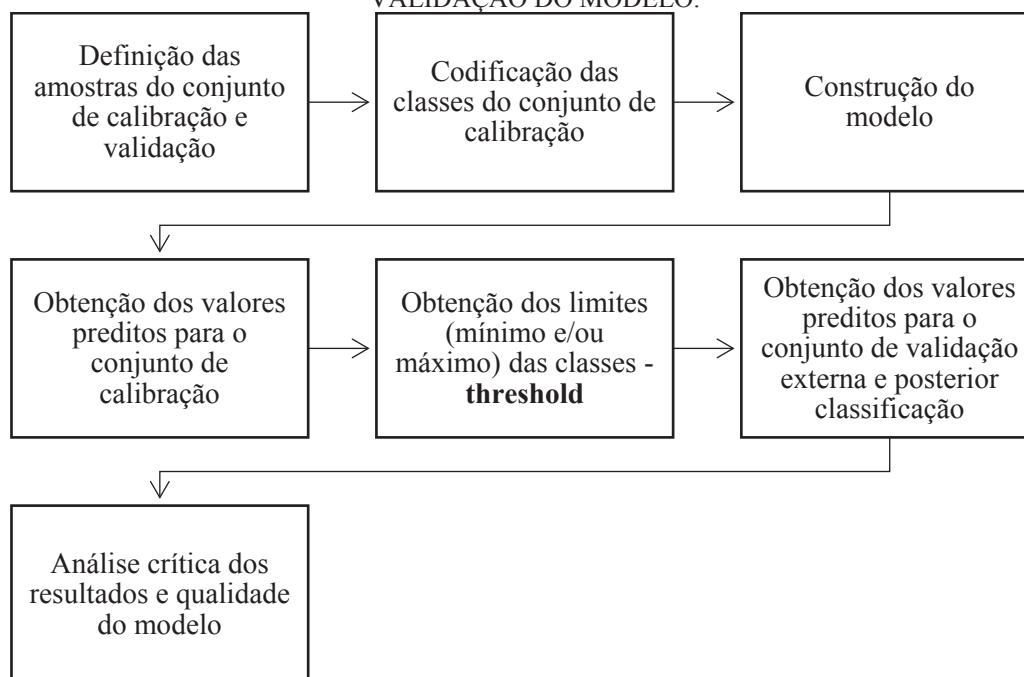
TABELA 6. CODIFICAÇÃO DAS CLASSES PARA O MODELO PLS-DA.

FPS	Classe atribuída
15	-1
30	0
50	+1

Os modelos tiveram sua capacidade de previsão avaliada a partir de procedimentos de seleção do número de variáveis latentes e variância explicada, regiões dos espectros característicos de UVA e UVB, ausência de anomalias, assertividade do modelo tanto em amostras do conjunto de calibração (através de procedimentos de *cross validation*), quanto nas amostras do conjunto de validação externa.

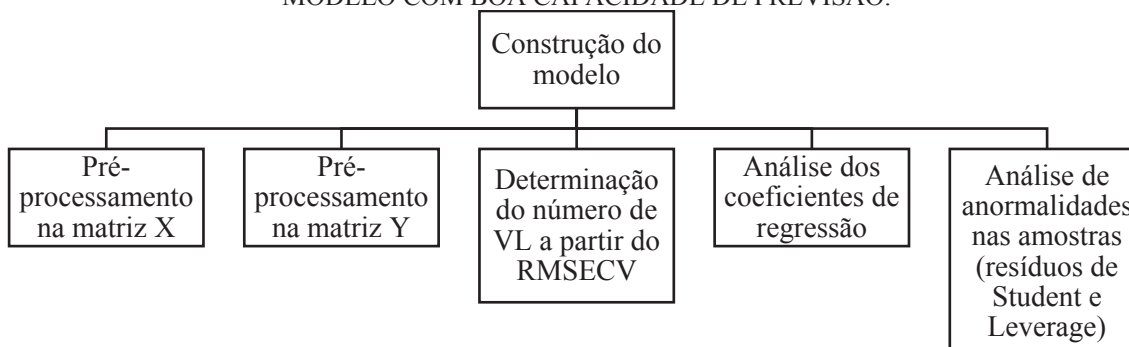
As etapas gerais para a obtenção e validação de modelos estão descritas na FIGURA 19, sendo que a construção do modelo com boa capacidade de previsão levou em consideração os detalhes das etapas descritas na FIGURA 20.

FIGURA 19. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS GERAIS ENVOLVIDAS NA ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO.



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 20. DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS A SEREM ESTUDADAS PARA OBTENÇÃO DE UM MODELO COM BOA CAPACIDADE DE PREVISÃO.



FONTE: A autora (2019).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

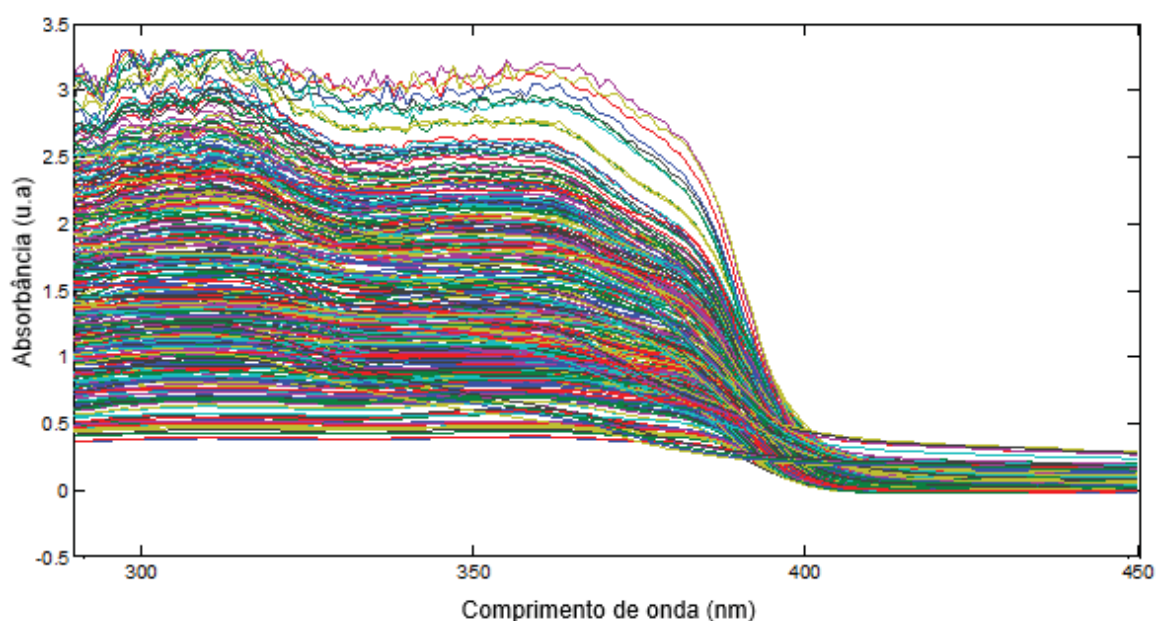
### 5.1 ESPECTROS OBTIDOS

Muitas metodologias *in vitro* tem sido desenvolvidas e publicadas para avaliar o FPS de produtos empregando-se diferentes instrumentos, substratos e concentrações de produtos, com um intuito de desenvolver uma alternativa às exposições aos raios ultravioleta em seres humanos, no entanto, ainda não há um método que tenha boa correlação com resultado *in vivo* e que seja internacionalmente reconhecido e validado.

Na tentativa de gerar dados para suprir esta demanda, utilizou-se a técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta atrelada a calibração multivariada com o intuito de correlacionar dados espectrais *in vitro* com resultados de fator de proteção solar *in vivo*.

Para isto, as 30 amostras comerciais de protetor solar foram preparadas conforme descrito no item 4.4 e seus espectros foram adquiridos (FIGURA 21) na faixa de 290 a 450 nm, com absorbância relevante principalmente na região do ultravioleta (290 a 400 nm), como era de se esperar para o tipo de produto.

FIGURA 21. ESPECTROS UV-VIS NA REGIÃO ESPECTRAL ENTRE 290 E 450 nm, PARA AS 30 AMOSTRAS ANALISADAS.



FONTE: A autora (2019).

O equipamento utilizado para obtenção das medidas, o analisador de transmitância UV-2000S (Labsphere®), mede a transmitância difusa em películas finas de produtos na região de comprimento de onda de 250 a 450 nm, consiste em uma fonte de luz xenônio, que através de uma esfera integradora, emite um feixe de luz difusa que ilumina a amostra, minimizando o tempo de integração dos dados. Uma dupla de espectrômetros de diodos, é acoplado à fonte de luz e por meio de um sistema de fibra óptica projetado para sistemas de luz difusa de baixa intensidade.

## 5.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA

### 5.2.1 Análise de componentes principais (PCA)

Posteriormente, os espectros foram submetidos a análise através de PCA, objetivando-se verificar se as amostras semelhantes quanto ao nível de proteção UVB, ou seja, de mesmo FPS, gerariam agrupamentos, fato que poderia evidenciar regiões espectrais que estariam mais correlacionadas com cada um dos grupos.

O FPS representa principalmente o nível de proteção à radiação UVB (290-320 nm) (ISO 24444:2010) principal responsável pela formação do eritema da pele.

Foram realizadas tentativas de análise utilizando todo o intervalo analisado (290-450 nm) e vários intervalos de comprimento de onda, no entanto, considerando o exposto acima, uma melhor visualização dos agrupamentos das amostras foi alcançado, empregando-se a faixa de 290 a 340 nm, correspondente às regiões UVB e UVA II, principal região UV responsável pelo aparecimento do eritema (AHMAD, 2017).

Neste conjunto de dados, foram testados os dados originais e alguns pré-processamentos como alisamento, MSC (Correção do Espalhamento Multiplicativo), SNV (Variação Normal Padrão) e derivação, no entanto, a transformação de dados que promoveu o melhor agrupamento dos dados foi centrar os dados na média, um pré-processamento amplamente empregado em espectros UV, e um dos mais usuais de maneira geral (FERREIRA *et al*, 1999).

Pela análise de PCA, verificou-se que o emprego de 4 componentes principais é suficiente para explicar quase toda a variância dos dados. A escolha por este número de componentes principais se deu através dos dados de *loadings* atrelados a cada PC, ou seja, a partir da PC5 a informação espectral é irrelevante, evidenciando a presença de ruído



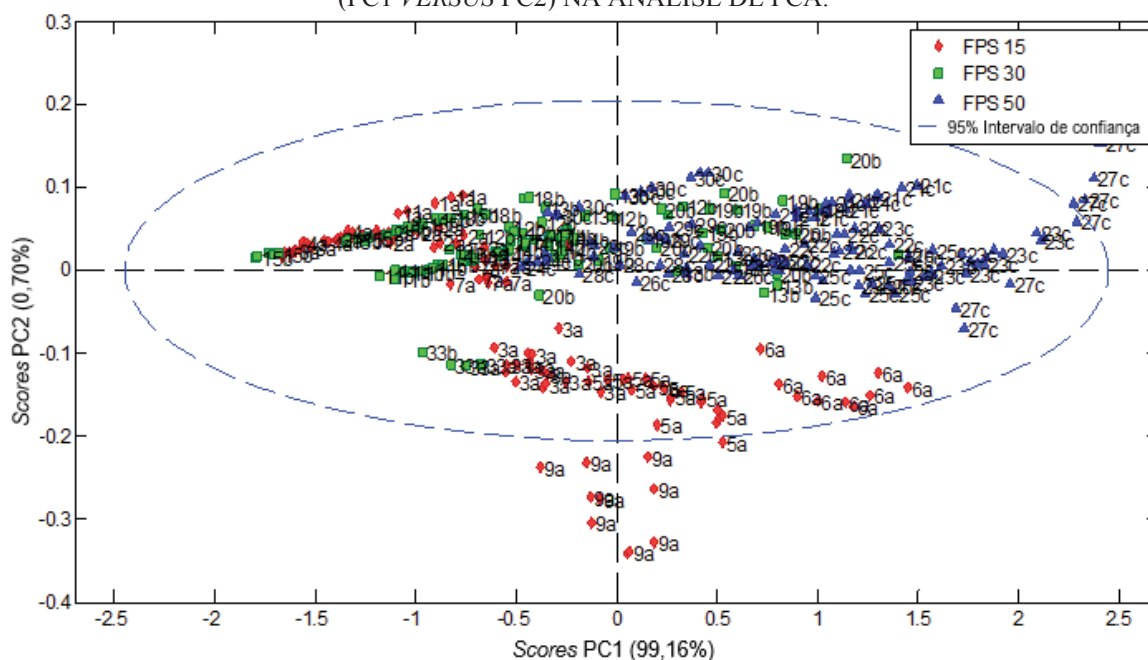
instrumental. A TABELA 7 indica a variância explicada por cada uma das componentes. Como previsto, a PC1 explicou praticamente toda a variância dos dados, observação esperada devido a semelhança dos espectros dos produtos.

TABELA 7. PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA DE CADA COMPONENTE PRINCIPAL PARA PCA CONSIDERANDO TODAS AS MEDIDAS.

Componente principal	Variância individual (%)	Variância acumulada (%)
PC1	99,16	99,16
PC2	0,70	99,86
PC3	0,09	99,95
PC4	0,02	99,97

A relação entre os *scores* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) explicam 99,86% da variação das amostras, e gera um agrupamento parcial das amostras de acordo com o FPS rotulado, conforme demonstrado na FIGURA 22.

FIGURA 22. GRÁFICO DE *SCORES* DE TODAS AS MEDIDAS PARA A 1ª E A 2ª COMPONENTES (PC1 VERSUS PC2) NA ANÁLISE DE PCA.

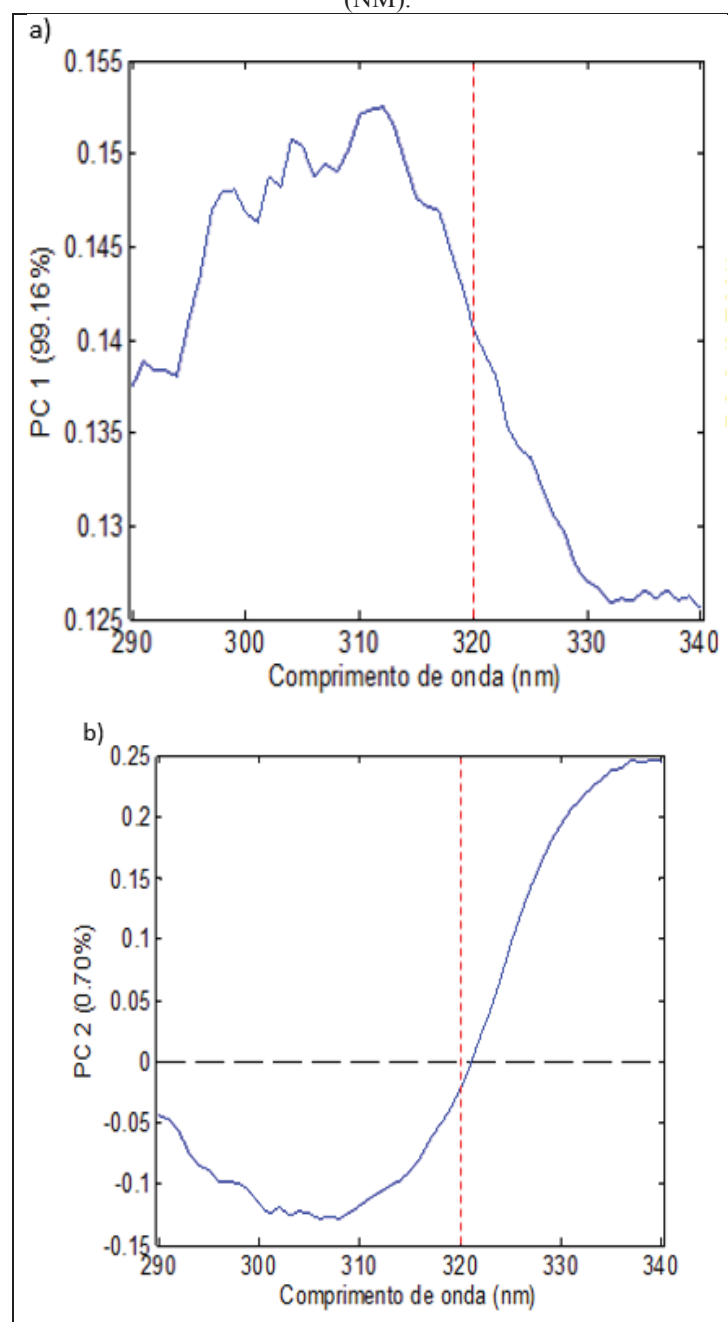


FONTE: A autora (2019).

Através da análise de *scores* e *loadings* da PC1, apresentados nas FIGURA 22 e FIGURA 23 e respectivamente, é possível observar que amostras que apresentam absorção mais intensa na região UVB (290 – 320 nm) estão no quadrante positivo desta componente principal. Além disso, de modo geral, pode-se verificar que quanto maior a intensidade da

absorbância na região UVB, maior o *score* da amostra. Enquanto a análise da PC2 reflete a intensidade de absorção na região do UVA II (320-340 nm), sendo que amostras com intensidade de absorção mais intensa estão agrupadas no lado positivo desta PC. Devido a absorção superior, estas amostras apresentam menor decaimento do espectro na região do UVA II quando comparada ao do UVB.

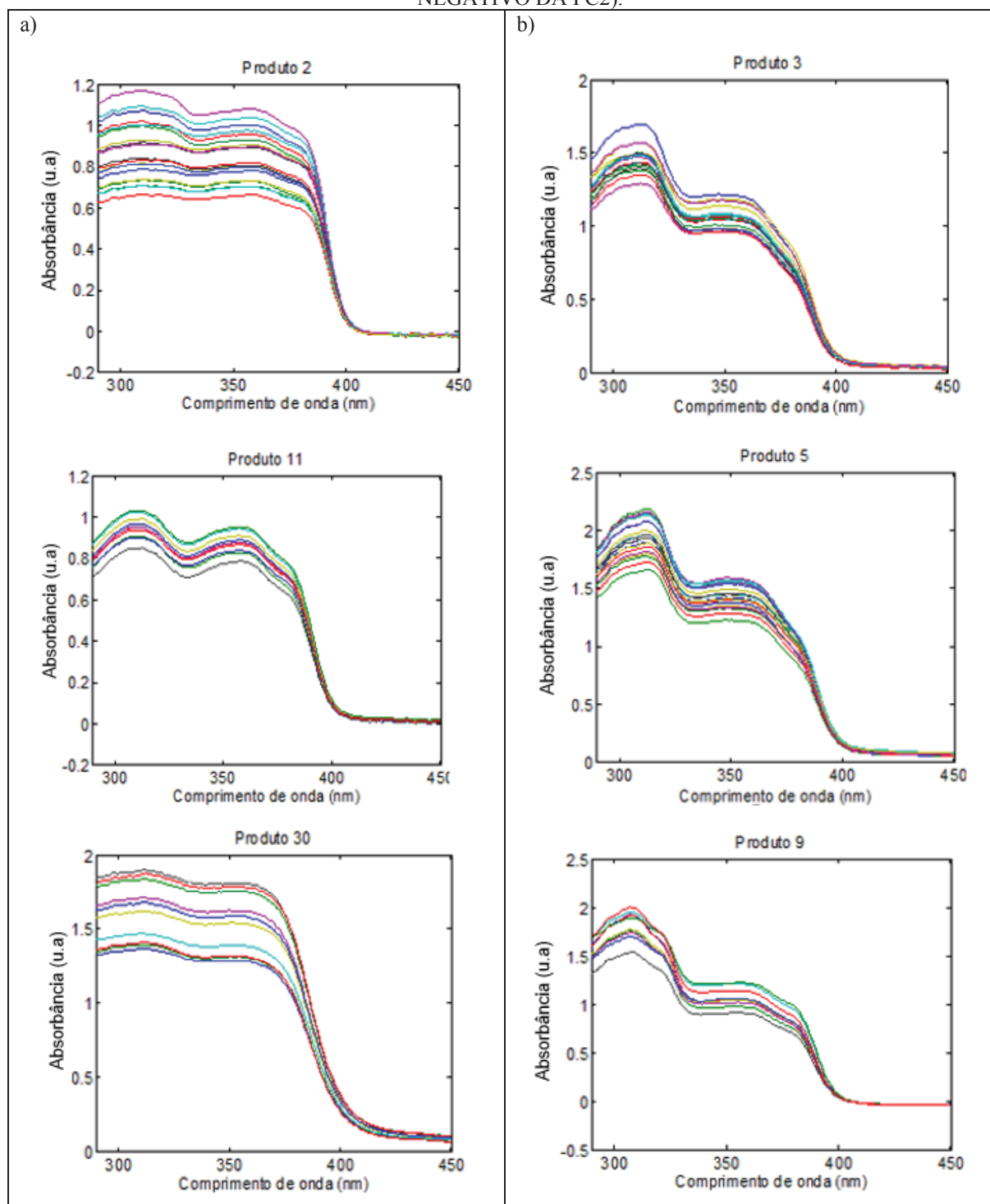
FIGURA 23. GRÁFICOS DE *LOADINGS* DA PC1 (A) E PC2 (B) *VERSUS* COMPRIMENTO DE ONDA (NM).



FONTE: A autora (2019).

O perfil de decaimento na região ultravioleta A, e o desequilíbrio entre a proteção UVB/UVA fica mais evidente ao compararmos o perfil espectral de amostras do lado positivo e do lado negativo da PC2, conforme demonstrado na FIGURA 24.

FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO UV DE ALGUNS DOS PRODUTOS AVALIADOS. (A) PRODUTO 2, PRODUTO 11 E PRODUTO 30 (PRESENTES NO LADO POSITIVO DA PC2); (B) PRODUTO 3; PRODUTO 5 E PRODUTO 9 (PRESENTES NO LADO NEGATIVO DA PC2).



FONTE: A autora (2019).

Assim, a avaliação simultânea das duas primeiras componentes principais, permite inferir que amostras que se encontram no lado positivo de ambas as PCs apresentam alta intensidade de proteção nas duas regiões do espectro avaliado, tanto UVB quanto UVA II, perfil já esperado para amostras com fatores de proteção mais elevados, sendo nesta amostragem, as de FPS 50.

De modo geral, os protetores solares não obedecem a Lei de *Lambert-Beer* sobre a absorvância em filmes finos, quando aplicados sobre uma superfície não homogênea, como é o caso da pele humana. Ao se determinar a absorvância na forma de filmes finos, as propriedades ópticas são determinadas por vários fatores, como a rugosidade da superfície do substrato, extensão da permeação dos filtros no substrato utilizado, força utilizada na aplicação durante o cisalhamento do produto e ainda o grau de interação dos ingredientes do produto com a superfície do substrato em uso e como esta interação afeta a qualidade da uniformidade do filme formado (COLE, 2001). Porém na avaliação dos produtos foi possível se estabelecer uma relação com esta Lei, pois, os produtos de maior FPS, que se infere que possuíam maior quantidade de filtros, exibiram maiores valores de absorvância, de forma geral.

Amostras que apresentam *scores* negativos na PC1 são majoritariamente FPS 15, assim como amostras que apresentam *scores* positivos na PC1 e negativos para PC2. Já os produtos com *scores* positivos na PC2 e negativos na PC1 apresentam algumas amostras de FPS 15 e FPS 30 sem uma separação para esses fatores de proteção diferenciados.

Apesar das divisões que retratam as diferenças entre os perfis das amostras, ainda é possível observar a localização errônea de algumas leituras, uma vez que foram realizadas medidas espectrofotométricas em 5 pontos das placas de PMMA. Algumas medidas das amostras 30 e 24 estão no quadrante negativo da PC1 e positivo da PC2 quando em sua maioria se localizam ao lado positivo da PC1 e PC2. Os produtos 12, 13, 19, 20, em sua maioria se localizam ao lado negativo da PC1 e positivo da PC2, no entanto, algumas leituras ficaram localizadas no quadrante positivo das componentes 1 e 2. Bem como as amostras 23, 25 e 27 presentes no lado positivo da PC1 e negativo da PC2, quando em sua maioria estão nos lados positivos das duas componentes.

Conforme pode ser visualizado na FIGURA 22, a maioria das leituras das amostras citadas anteriormente ainda permanecem agrupadas com outros produtos de FPS similar,

deste modo, estes erros podem ser decorrentes de variações na quantidade de amostra aplicada e espessura do filme formado na região de leitura.

Em um estudo publicado por Schalka *et al* (2009) foi avaliado a interferência da quantidade aplicada de dois fotoprotetores (valores de FPS 15 e 30, respectivamente) na determinação do valor de FPS, de acordo com a metodologia proposta pela FDA. Concluiu-se que existe uma relação exponencial entre o valor aplicado e a mudança no valor do FPS, ou seja, quanto maior a quantidade de produto maior a proteção oferecida. Além disso, a Lei de *Lambert-Beer* estabelece uma relação matemática entre a transmitância (ou absorbância) medida, a espessura da amostra e a concentração das espécies absorventes (SKOOG *et al*, 2002).

O método da ISO 24443:2012 utilizado para determinação do fator de proteção de UVA, em que a análise foi fundamentada, corrige as variações decorrentes da diferença de quantidade e filme de amostra entre os pontos da placa, através do cálculo do coeficiente *C* que ajusta o FPS *in vitro* pelo *in vivo*.

Como em análises quimiométricas se trabalha com os dados puros do espectro, esses desvios decorrentes da variação de quantidade de amostra não são corrigidos, o que pode caracterizar posicionamentos errôneos das amostras, aspecto verificado pela dispersão entre leituras de mesma amostra.

A RDC nº 250 Anvisa (2018) determina a obrigatoriedade da presença do INCI (*Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) que significa a Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos, dos componentes na rotulagem de produtos cosméticos e dispõe sobre a recomendação da ordem de descrição, que deve ser decrescente, ou seja, da maior para a menor concentração. A partir disso foi possível listar os filtros UV presentes em cada formulação, listados na TABELA 8.



Ainda na análise de PC1xPC2 é possível verificar que existem dois agrupamentos característicos para amostras de FPS 15. O grupo A composto pelos produtos 1, 2, 4 e 8, ficaram posicionados no lado negativo de PC1 e positivo de PC2; e o grupo B composto pelos produtos 3, 5, 6 e 9, localizaram-se no lado negativo da PC2; além do produto 7, que está entre esses dois grupos.

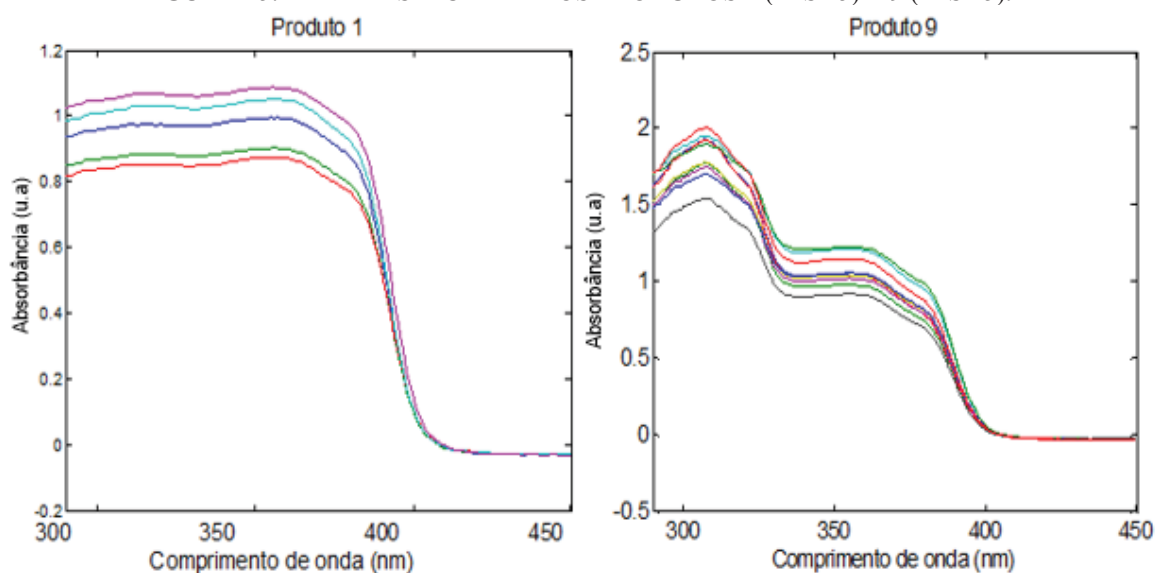
Comparando os componentes de ambos os grupos se constata que, de modo geral os filtros presentes são bem similares, sendo possível observar algumas características relevantes: os produtos de FPS 15 (com exceção do produto 1) possuem o mesmo filtro UVA *Butyl Methoxydibenzoylmethane*, as amostras do grupo B (com exceção da amostra 9) ainda possuem em sua composição o filtro de amplo espectro *Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine* e *Titanium dioxide*, que possui maior absorção na região UVB mas também contribui com proteção na região UVA (SAMBANDAN *et al*, 2011). É provável que os produtos deste grupo apresentem concentrações inferiores do filtro *Butyl Methoxydibenzoylmethane*, e que parte da proteção UVA seja decorrente da existência dos filtros de amplo espectro, como estes, além de protegerem na região do UVA também oferecem absorção no UVB, esta sobreposição de proteção no UVB pode estar intensificando o decaimento UVB: UVA.

As amostras do grupo A não possuem filtros de amplo espectro, porém pelo perfil, devem apresentar concentrações balanceadas de filtros UVB: UVA, sendo que destas, os produtos 2, 4, e 8 se diferenciam das demais pela presença do filtro *Phenylbenzimidazol sulfonic acid* e a amostra 1 por ser a única que contém os filtros *Ethylhexyl dimethyl PABA* e *Benzophenone-3*.

O *Phenylbenzimidazol sulfonic acid* apresenta absorção UV na faixa de 290-340 nm com pico de absorção máxima em 310 nm (SAMBANDAN *et al*, 2011) portanto classificado como um filtro UVB. Um estudo realizado por Couteau *et al* (2007) evidenciou que este possui eficácia absorptiva inferior na região UVB quando comparado aos outros filtros (UVB ou de amplo espectro) encontrados nas amostras do grupo B, sendo a eficácia ascendente dos filtros a seguinte: *Phenylbenzimidazol sulfonic acid* < *Ethylhexyl methoxycinnamate* < *Ethylhexyl dimethyl PABA* < *Diethylhexyl butamido triazone* < *Isoamyl p-methoxycinnamate* < *Ethylhexyl trizone* < *Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine*. A relação de filtros presentes evidencia o menor nível de absorção e proteção UVB verificado para estas amostras, o que por sua vez justifica a sua posição no lado negativo da PC1.

A amostra 1 é composta pelos filtros *Ethylhexyl dimethyl PABA*, potente filtro UVB que atua absorvendo de 290-315 nm (SAMBANDAN *et al*, 2011), e a *Benzophenone-3* também nomeada como Oxibenzona, que possui absorção na região de 270 a 350 nm, com pico em 290 e 325 nm (SAMBANDAN *et al*, 2011; GILABERTE *et al*, 2010). Como estes filtros são potentes absorvedores UV que apresentam absorção em toda faixa do espectro considerado, o perfil constante representa um balanço nas concentrações de ambos filtros, portanto, não é observado decaimento na transição UVB: UVA II, conforme visto na FIGURA 25.

FIGURA 25. PERFIL ESPECTRAL DOS PRODUTOS 1 (FPS 15) E 9 (FPS 15).



FONTE: A autora (2019).

O produto 9 é composto pelos filtros, nesta ordem crescente de concentração: *Ethylhexyl methoxycinnamate* > *Octocrylene* > *Butyl Methoxydibenzoylmethane*, estes oferecem absorção nas faixas de 270 a 328 nm (NASCIMENTO *et al*, 2014) (com pico em 311 nm), de 287 a 323 nm (com pico em 303 nm), e de 310 a 400 nm (com pico em 360 nm) respectivamente (SAMBANDAN *et al.*, 2011). O perfil do espectro ilustrado na FIGURA 25, evidencia uma absorção superior na região UVB e decaimento na região do UVA II de praticamente 100% quando comparado ao UVB, isto demonstra a proporção desbalanceada de filtros UVB/UVA que podem ser uma justificativa para o enquadramento fora do intervalo de confiança de 95% para a amostra, e redução superior da absorção em UVA II quando comparado as demais amostras do mesmo quadrante.

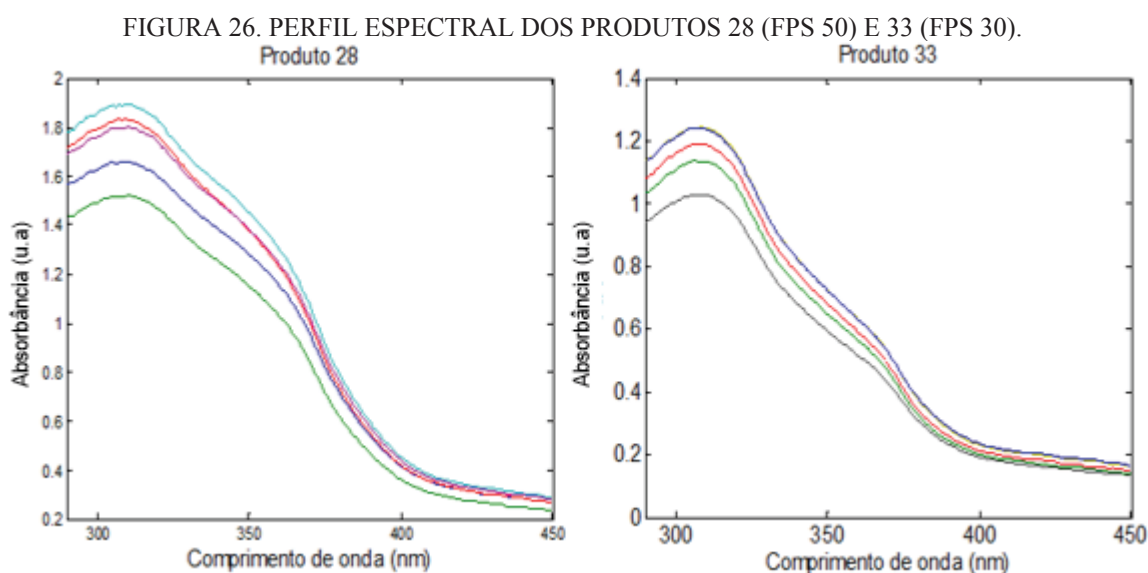
Tendo como base a análise de componentes principais e o exposto acima, conclui-se que os produtos rotulados com FPS 15 podem ainda ser subdivididos em 2 subcategorias:



1) Baixa absorção na região de 290 a 320 nm, com proteção balanceada (baixo declínio na faixa UVA II, como é o caso do produto 1; e 2) Proteção maior na região UVB se comparado ao UVA II, que acarreta em desequilíbrio da proteção entre ambos os comprimentos de onda, ou seja, redução no nível de proteção da radiação ultravioleta A (como é o caso do produto 9).

A amostra 33, pertencente ao grupo FPS 30, demonstrou um comportamento anômalo ao ser a única a se distanciar das demais amostras de mesmo nível de proteção. Isto pode ser decorrente da sua atípica composição, constituída basicamente por filtro inorgânico *Titanium dioxide*, enquanto as demais também contam com filtros orgânicos.

Filtros inorgânicos atuam principalmente refletindo e dispersando as radiações visível, ultravioleta e o infravermelho (MITCHNICK *et al*, 1999). Ambos os filtros apresentam proteção dentro de todo o espectro UV (SAMBANDAN *et al*, 2011), no entanto, o óxido de zinco oferece melhor proteção UVA, enquanto o *Titanium dioxide* micronizado fornece proteção UVB superior de coloração mais branca, devido ao seu maior índice de refração (PINNEL *et al*, 2000). A avaliação do perfil espectral, evidenciado na FIGURA 26, permite inferir que a ausência de um filtro UVA como o óxido de zinco reduz o nível de proteção UVA quando comparado ao UVB e por isso o enquadramento no lado negativo da PC2.



FONTE: A autora (2019).

Apesar da amostra 28 (FPS 50) também apresentar composição atípica sendo constituída basicamente por filtros físicos, a presença do óxido de zinco neste produto

oferece maior proteção na região UVA, conforme evidenciado na FIGURA 26, o que permitiu que ela permanecesse agrupada junto aos demais produtos de mesmo FPS.

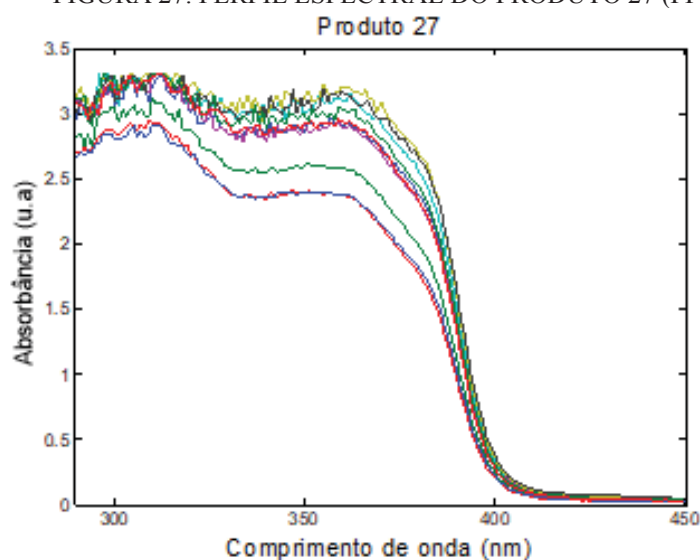
Os protetores solares ideais fornecem proteção uniforme através do ultravioleta B e ultravioleta A, enquanto mantêm os recursos sensoriais e táteis que melhoram a experiência do usuário e aumentam a incidência de uso (JANSEN *et al*, 2013).

De modo geral, a segmentação gerada pelo método de PCA para as amostras de FPS 30 e 50, demonstra que para atingir estes níveis de proteção é necessário um balanço da proteção UVB e UVA ao longo de todo o espectro, ou seja, filtros UV que sejam capazes de oferecer proteção em vários comprimentos de onda.

Além disso, a principal diferença observada entre estes dois grupos é a diferença no nível de absorção, produtos com fator de proteção mais alto, são formulados com concentrações superiores de filtro e logo oferecem maior absorção no espectro.

Na análise de *scores* entre PC1 e PC2, algumas leituras da amostra 27 foram consideradas *outliers* em um intervalo de confiança de 95%, apesar de não impactar no agrupamento do produto, isto pode ter sido decorrente do elevado nível de absortividade na faixa analisada, conforme apresentado na FIGURA 27, com regiões ruidosas devido à proximidade do limite de detecção do equipamento, além de possíveis influências de variações na quantidade e espessura do filme de amostra.

FIGURA 27. PERFIL ESPECTRAL DO PRODUTO 27 (FPS 50).

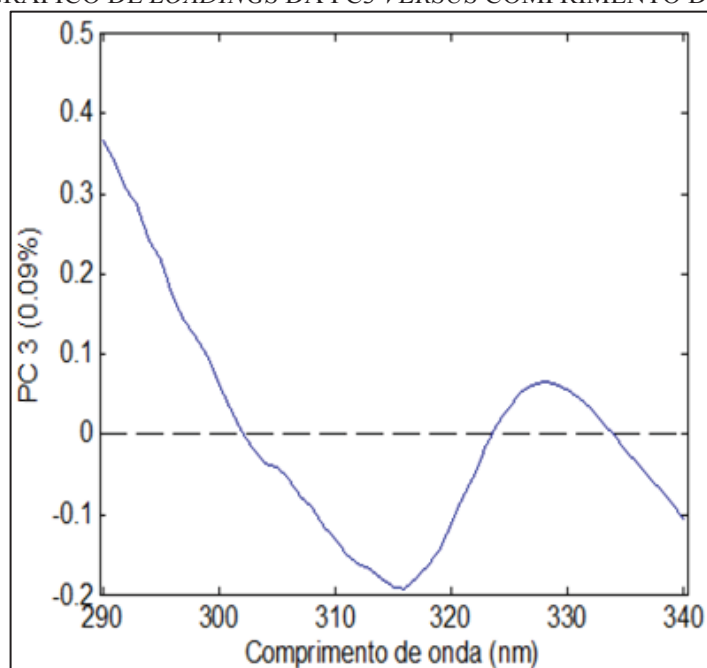


FONTE: A autora (2019).

As componentes principais PC3 e PC4, também consideradas na análise, não trazem informações relevantes a respeito do nível de proteção (FPS 15, FPS 30 e FPS 50), no entanto, corroboram com informações sobre a composição de filtros dos produtos.

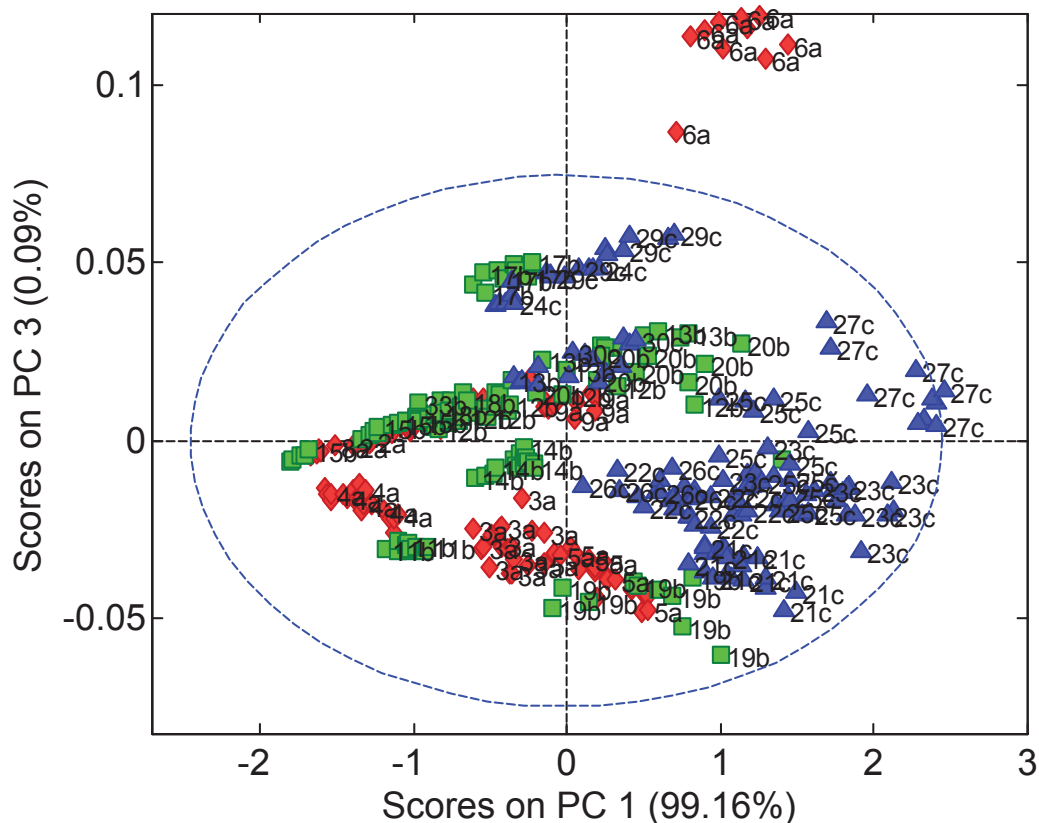
Ao confrontar os dados dos *loadings* e *scores* da componente principal 3, na FIGURA 28 e na FIGURA 29, respectivamente, nota-se que as amostras do lado positivo da PC3, ou seja, os produtos 1, 2, 7, 9, 6, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 24, 25, 27 e 29 possuem como características comuns, a inexistência do filtro *Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine* em sua composição, classificado como de amplo espectro, com picos de absorção em 310 e 348 nm (SAMBANDAN *et al*, 2011), justificando o baixo peso desses comprimentos de onda no lado positivo da PC3.

FIGURA 28. GRÁFICO DE *LOADINGS* DA PC3 *VERSUS* COMPRIMENTO DE ONDA (NM).



FONTE: A autora (2019).

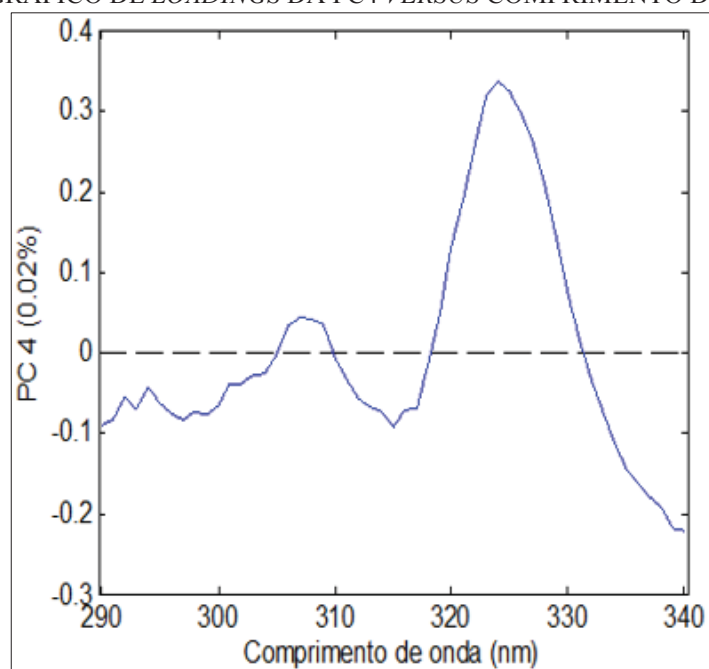
FIGURA 29. GRÁFICO BIDIMENSIONAL DE SCORES – PC1 VERSUS PC3.



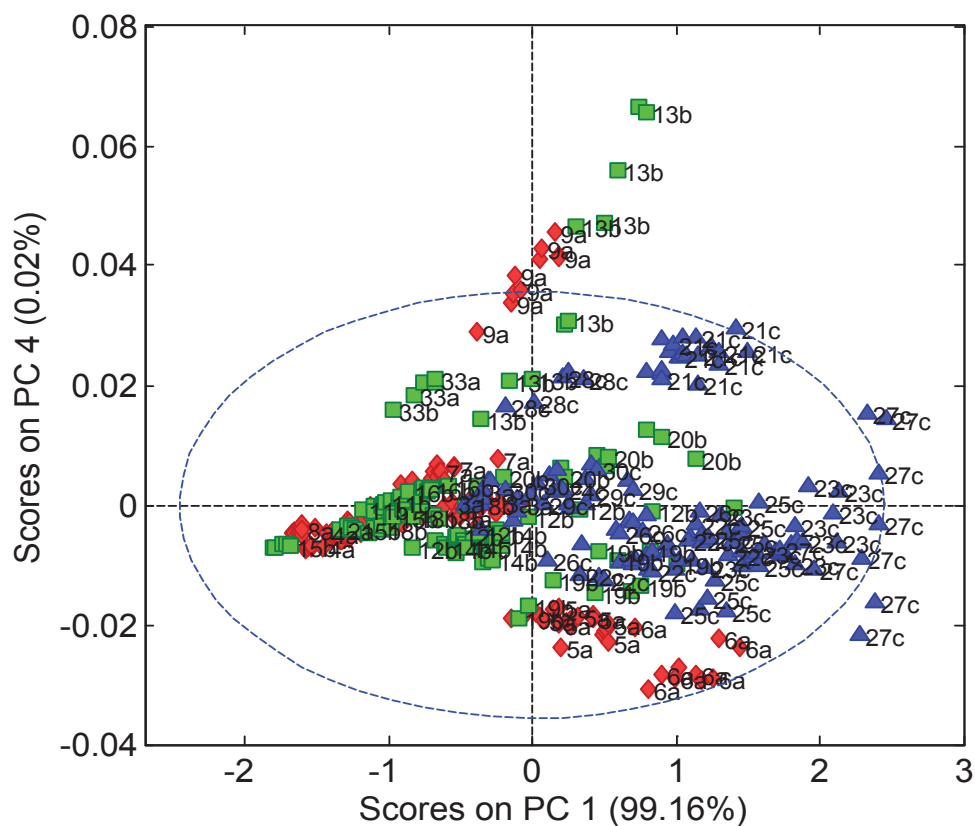
FONTE: A autora (2019).

Na análise de *loadings* e *scores* da PC4, apresentados na FIGURA 30 e na FIGURA 31, verifica-se que as amostras 9, 7, 13, 16, 20, 21, 33, 30, 28 e 29, posicionadas do lado positivo da PC4 possuem um declive característico na região de 310 a 320 nm, evidenciando a ausência de filtros que possuam absorção máxima na região, como o *Ethylhexyl trizone* (SAMBANDAN *et al*, 2011). Além disso, os produtos 7, 13, 16, 20, 21, 33, 30, 28 e 29 possuem em sua composição o filtro *Homosalate* que possui máxima absorbância em 306 nm (GILABERTE *et al*, 2011), justificando os valores positivos de *loadings* neste comprimento de onda e *scores* positivos na PC4.

Os outros produtos também classificados do lado positivo da PC4, amostras 9 e 30, são constituídas pelo filtro UVB *Ethylhexyl methoxycinnamate* que possui picos de absorção próximos a faixa do *Homosalate*, em 310 nm (GILABERTE *et al*, 2011), sendo o filtro predominante em ambas amostras.

FIGURA 30. GRÁFICO DE *LOADINGS* DA PC4 *VERSUS* COMPRIMENTO DE ONDA (NM).

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 31. GRÁFICO BIDIMENSIONAL DE *SCORES* – PC1 *VERSUS* PC4.

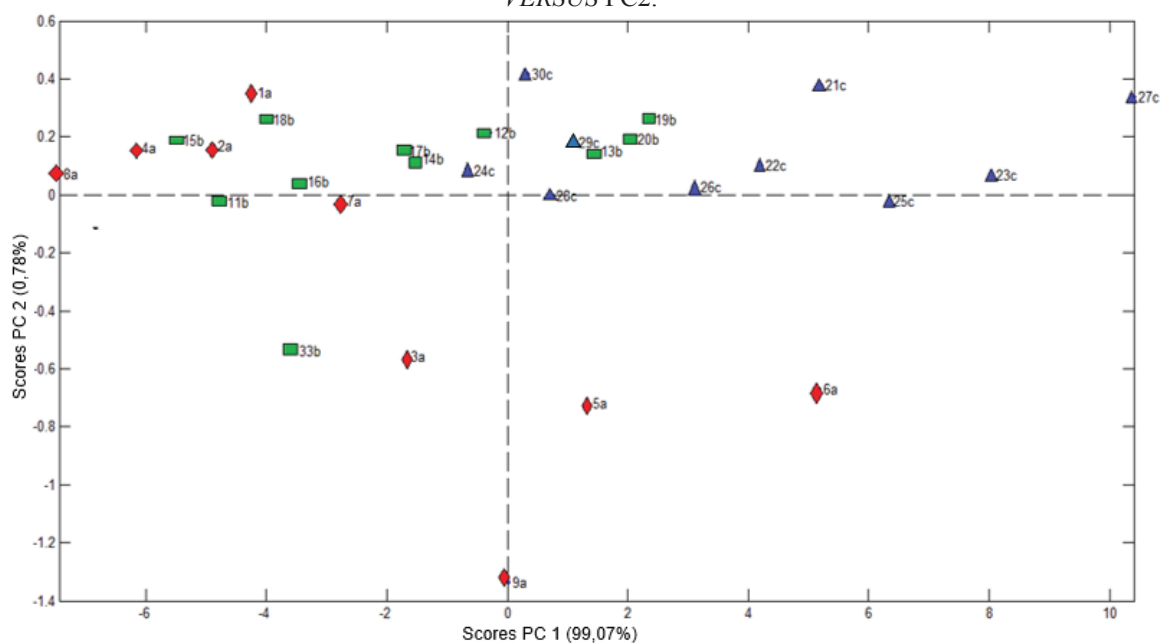
FONTE: A autora (2019).

Para melhor visualização das posições espaciais dos produtos, uma nova PCA foi gerada considerando a média espectral de cada amostra para a região anteriormente

selecionada (290-340 nm). Para esta avaliação, foram realizadas algumas transformações dos dados na tentativa de correção dos desvios relacionados à massa de amostra efetivamente depositada nas placas e a espessura do filme nas diferentes posições. As seguintes operações foram realizadas nos espectros: divisão pelo somatório das absorvâncias UV, divisão pela maior absorvância, produto pelo índice eritematoso, divisão pelo somatório por região (UVB e UVA), divisão pela massa final da placa, a divisão pela razão da normalização de todas as massas para 32,5 mg e para 29,25 mg, que representam a massa inicial esperada e a massa considerando 10% de perda de produto, respectivamente. No entanto, os ganhos foram praticamente nulos e optou-se por continuar o trabalho de modelagem com a média dos espectros brutos.

Na nova PCA gerada, a PC1 e a PC2 explicam 99,85% da variância, conforme demonstrado na FIGURA 32.

FIGURA 32. GRÁFICO DE SCORES DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS DA PC1 VERSUS PC2.

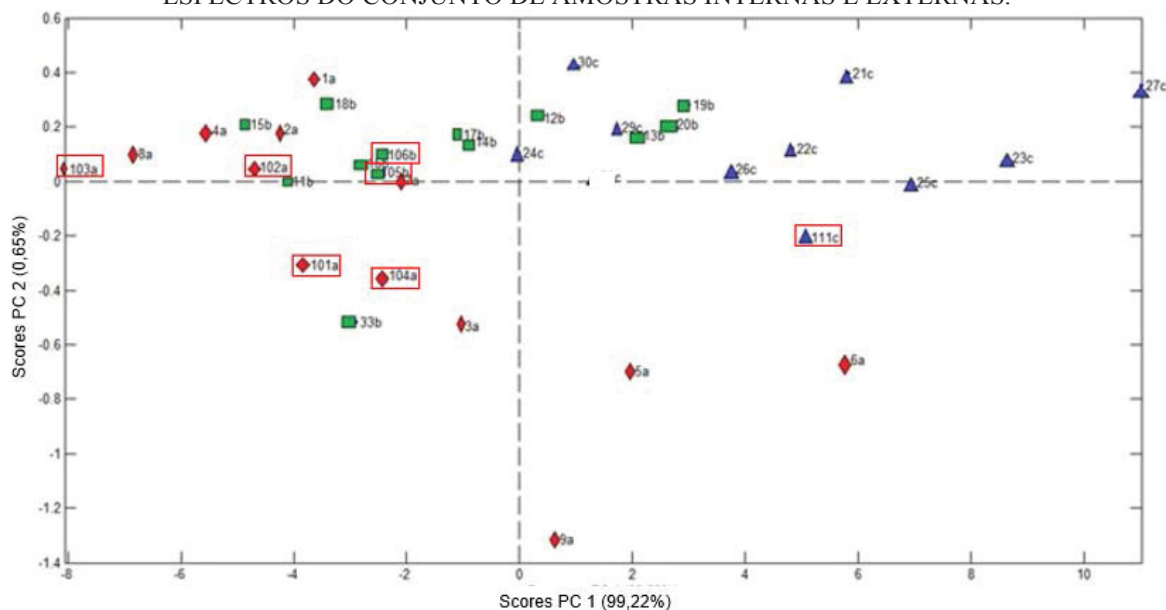


FONTE: A autora (2019).

Devido à tendência de agrupamento obtido para as amostras avaliadas, e objetivando-se a construção de um modelo de classificação, mais sete amostras externas foram consideradas na análise exploratória. Estes novos produtos possuem os valores de FPS reais (possuem os resultados da análise *in vivo*) e seus dados espectrais foram obtidos através de medidas em outro laboratório de pesquisa utilizando-se o mesmo equipamento e procedimento de análise das demais amostras. Os mesmos pré-processamentos

anteriormente citados foram testados e o melhor agrupamento correspondeu a centrar os dados na média e alisamento dos espectros, os gráficos de *scores* da nova PCA gerada estão demonstrados na FIGURA 33 e na FIGURA 34 e as informações das amostras na TABELA 9.

FIGURA 33. GRÁFICO DE *SCORES* DA PC1 *VERSUS* PC2 NA ANÁLISE DE PCA DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DO CONJUNTO DE AMOSTRAS INTERNAS E EXTERNAS.



Legenda:  amostras externas incluídas. FONTE: A autora (2019).

TABELA 9. DESCRIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS SETE AMOSTRAS EXTERNAS AVALIADAS.

Descrição do Produto	Identificação da amostra	FPS <sub>real</sub>
Amostra externa 1	101a	15,0
Amostra externa 2	102a	15,0
Amostra externa 3	103a	15,0
Amostra externa 4	104a	15,1
Amostra externa 5	105b	30,0
Amostra externa 6	106b	30,0
Amostra externa 7	111c	55,2

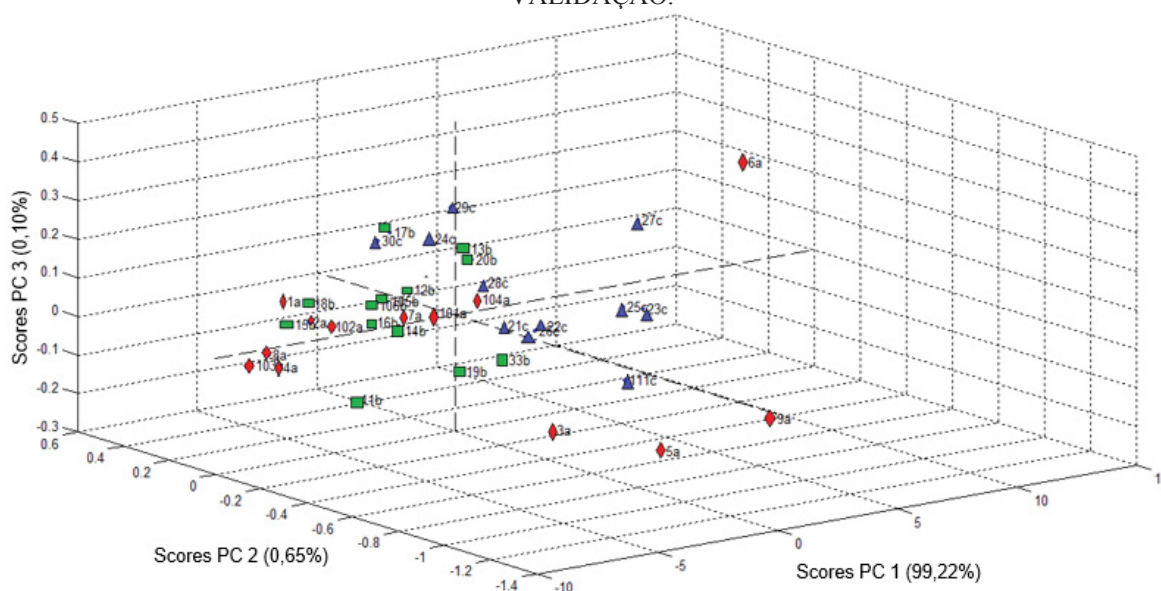
### 5.3 MODELO DE CLASSIFICAÇÃO PLS-DA

Para construção do modelo de classificação para estimativa do FPS através dos dados espectrais das amostras, empregou-se o método de análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), para isso, as amostras foram divididas em dois conjuntos, o de calibração e o de validação. Em ambos, a matriz *y* foi codificada de acordo

com seu FPS rotulado, onde amostras de FPS 15 foram codificadas como “-1”, FPS 30 como “0” e FPS 50 como “1”.

Para a seleção das amostras de cada conjunto utilizou-se como base a distribuição das mesmas no gráfico de *scores* da análise de componentes principais, apresentado na FIGURA 34. Este procedimento permite a seleção de amostras de uma maneira sistemática, levando em consideração amostras representativas de todo o espaço amostral (XIA *et al*, 2015).

FIGURA 34. GRÁFICO TRIDIMENSIONAL DE SCORES DA PC1 VERSUS PC2 VERSUS PC3 NA ANÁLISE DE PCA DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DO CONJUNTO DE AMOSTRAS INTERNAS E EXTERNAS UTILIZADO PARA ESCOLHA DOS PRODUTOS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.



FONTE: A autora (2019).

Foram selecionadas 28 amostras para o conjunto de calibração e 8 amostras para o conjunto de validação externa, em ambos os grupos existiam amostras cujo FPS real está disponível. As amostras selecionadas para cada conjunto serão posteriormente descritas na TABELA 11 e na TABELA 12. Com o intuito de se obter o melhor modelo de classificação, os dados da matriz  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  foram submetidos as transformações descritas na TABELA 10, assim como a combinação entre elas, no caso dos dados espectrais (matriz  $\mathbf{X}$ ).



TABELA 10. PRÉ-PROCESSAMENTOS TESTADOS PARA CONSTRUÇÃO DO MODELO.

<b>Pré-processamento Y</b>	<b>Pré-processamento X</b>
Nenhum	Nenhum
Auto-escalamento	Centrar os dados na média
Centrar os dados na média	Alisamento
	Correção multiplicativa de espalhamento (MSC)
	SNV
	1ª derivada

A primeira etapa após a seleção das amostras é a seleção dos pré-processamentos adequados, e o modelo PLS-DA que apresentou melhor capacidade de classificação foi obtido centrando os dados na média para matriz  $\mathbf{y}$  e centrando os dados na média em conjunto ao alisamento com janela de 11 pontos para a matriz  $\mathbf{X}$ .

Então seguiu-se para a etapa de validação cruzada (*cross validation*). O método de validação cruzada *Leave-one-out* foi o empregado para seleção do número de variáveis latentes adequados para construção do modelo. Neste método uma amostra do conjunto de calibração tem seus dados removidos da matriz  $\mathbf{X}$  e da  $\mathbf{y}$ . O modelo é construído com as remanescentes, em seguida, o dado removido é utilizado para prever a propriedade de interesse e então, por comparação com o valor conhecido, são calculados os erros de validação cruzada (RMSECV). Os dados da amostra são devolvidos ao conjunto de dados e este procedimento é repetido até que todas as amostras tenham sido retiradas e o erro médio tenha sido calculado em função do número de variáveis latentes (AMARAL, 2014).

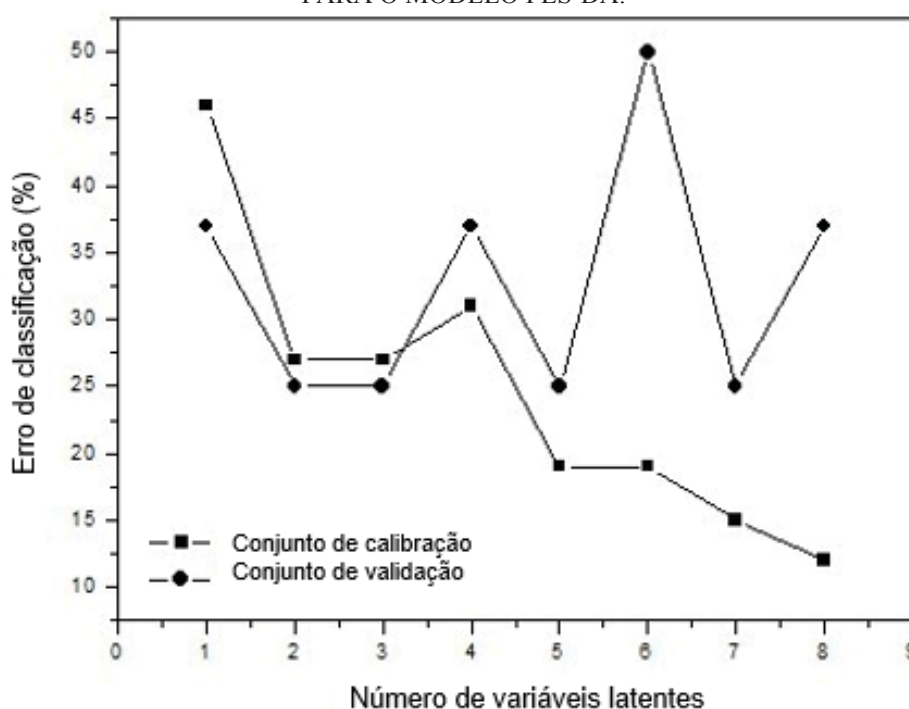
O melhor modelo foi formado usando 3 LVs, conforme determinado pela análise pelo Erro de Classificação (%), como mostra a FIGURA 35. Embora o erro de classificação diminua constantemente com o aumento do número de variáveis latentes para o conjunto de calibração, o mesmo comportamento não é observado para o conjunto de validação externa. Assim, para evitar um modelo de ajuste excessivo no conjunto de calibração e manter a robustez do modelo, foram escolhidas 3 LVs para a construção do modelo.

Em geral, o comportamento dos *loadings* se assemelha ao do espectro original nas primeiras variáveis latentes e este comportamento muda até se tornar uma representação do ruído existente. Isso é observado pelo fato de as primeiras variáveis latentes serem responsáveis pela informação espectral como um todo, sendo as demais responsáveis por pequenas diferenças que fazem parte do modelo (DE CARVALHO *et al.*, 2016). Por este motivo, não é possível considerar um modelo com mais de 4 LV, porque, como mostra a

Figura 36, não há informações importantes sobre espectros, e ruídos seriam incluídas no modelo. Os coeficientes de regressão são frequentemente usados para ajudar na seleção de preditores relevantes de acordo com a magnitude de seus valores absolutos (FERREIRA, 2015), portanto, refletem informações importantes dos espectros associados ao número de variáveis latentes.

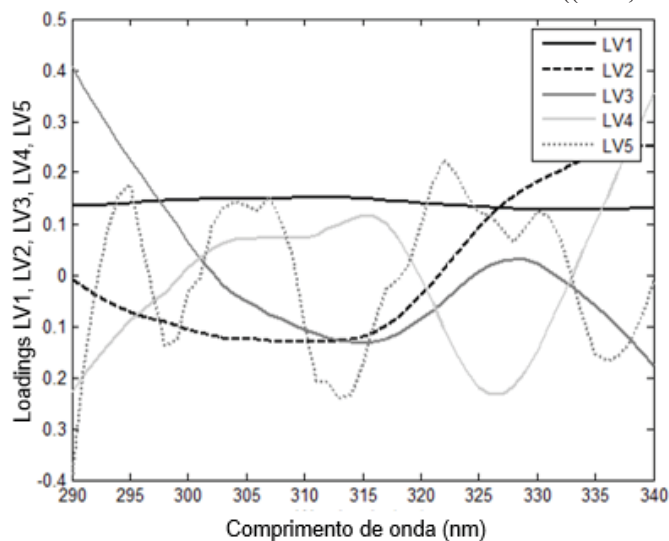
O modelo PLS-DA maximiza a relação entre a variável dependente e os *scores* pode-se afirmar que as variáveis latentes representam as direções que melhor discriminam as classes, ou seja, que definem a máxima separação entre elas (FERREIRA, 2015). Para o problema proposto, portanto, esperava-se a seleção de 3 variáveis latentes, porém, com os dados centrados na média, a direção da primeira componente principal é coincidente com a direção da maior variância intrínseca do conjunto de dados, consequentemente, um conteúdo maior de variabilidade dos dados por ser descrito com uma componente a menos quando os dados são tratados dessa forma (FERREIRA, 2015), dessa forma o menor erro foi obtido empregando-se 2 LV, entretanto, dada a maior relação das regiões do espectro, o modelo considerado ideal para a proposta foi construído considerando-se 3 LV, sendo o RMSECV equivalente a 0.5248.

FIGURA 35. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES E O ERRO DE CLASSIFICAÇÃO DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO PARA O MODELO PLS-DA.



FONTE: A autora (2019).

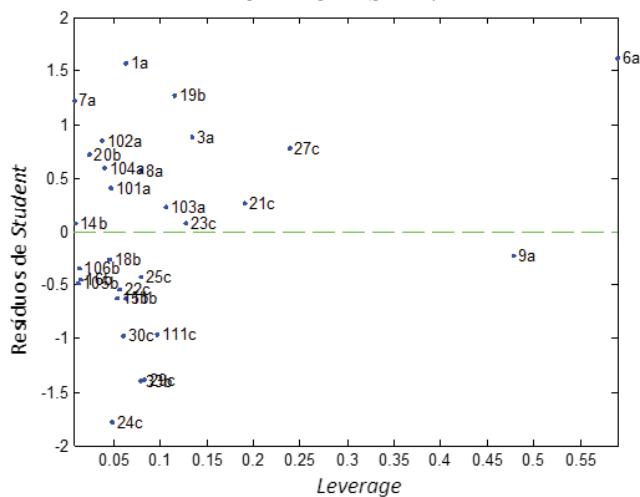
FIGURA 36. GRÁFICO DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO *VERSUS* COMPRIMENTO DE ONDA PARA DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES ((2LV, 3LV, 4LV, 5LV).



FONTE: A autora (2019).

Para construção do modelo descrito anteriormente, durante a etapa de detecção de amostras com comportamento atípico, denominadas anômalas, foram retiradas do conjunto de calibração três amostras: 6, 9 e 33. As amostras 6 e 9 foram retiradas por possuírem elevado *leverage* (FIGURA 37), outras motivações foram o fato do produto 6 se isolar em relação às demais amostras na avaliação tridimensional, e o fato do produto 9 não atender os requisitos necessários de um protetor solar como infere-se sobre os demais produtos, ou seja, não possuir 1/3 do FPS de proteção UVA. Enquanto a amostra 33 foi retirada por conta da sua composição atípica e comportamento anômalo durante a avaliação exploratória.

FIGURA 37. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS DE *STUDENT* PARA MODELO ANTES DA RETIRADA DE AMOSTRAS ANÔMALAS, RESULTADOS COM 2VL PARA O MODELO PLS-DA.



FONTE: A autora (2019).

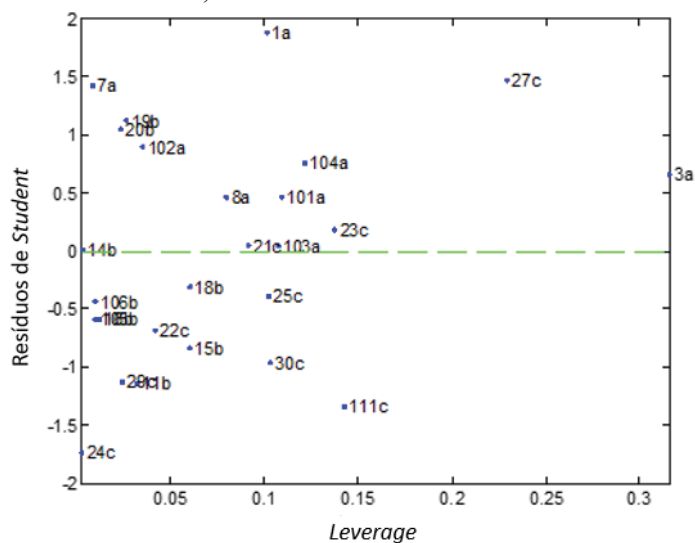
A avaliação de amostras anômalas é realizada através da análise do gráfico que correlaciona dois parâmetros estatísticos relevantes: a influência (*leverage*) e os resíduos de *Student* (FERREIRA, 2015). O valor de *leverage* reflete a capacidade de uma amostra influenciar no modelo de calibração, amostras com elevado *leverage* possuem peso significativo na construção do modelo, tendo em vista que diferem bastante do perfil médio do restante das amostras do conjunto de calibração.

Os resíduos de *Student* indicam a presença de amostras que foram mal modeladas e que por isso apresentam uma diferença significativa entre os valores reais e os obtidos pelo modelo de calibração.

O limite que determina quais amostras devem ser avaliadas em relação à influência do *leverage* é calculado a partir do número de variáveis latentes (VL) consideradas e a quantidade de amostras do conjunto de calibração (n), através da equação  $3VL/n$ , enquanto que para os resíduos de *Student* o limite equivale a  $\pm 2,5$ , considerando-se 95% de confiança (FERREIRA, 2015).

Após a geração do primeiro modelo com as 29 amostras selecionadas e a retirada das amostras 6, 9 e 33, houve uma pequena redução de RMSECV, que passou de 0,6 para grandeza de 0,5 atrelado à 2-3 variáveis latentes, e o modelo considerado foi construído, considerando 26 amostras. Na nova análise de Resíduos *versus Leverage* (FIGURA 38), apesar da amostra 3 ainda ter apresentado valor de *leverage* levemente superior ao limite estabelecido para 2 VL (0,27), não se fez necessária a retirada da amostra, pois ela não estava influenciando negativamente no modelo.

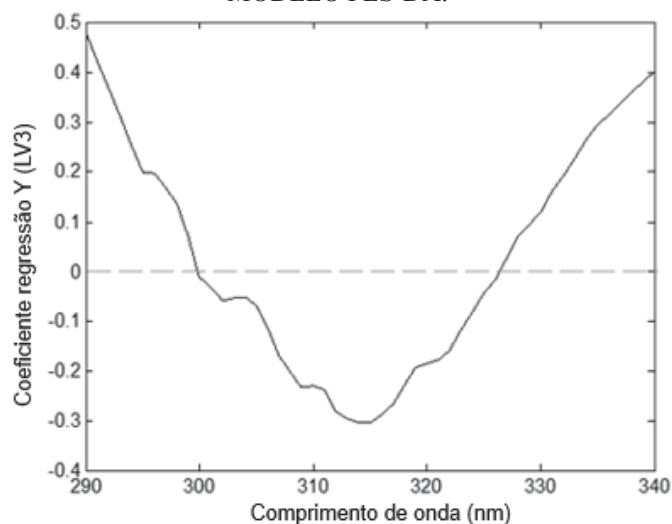
FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS DE *STUDENT* APÓS A RETIRADA DAS AMOSTRAS, RESULTADOS COM 2VL PARA O MODELO PLS-DA.



FONTE: A autora (2019).

Os *loadings* são responsáveis por expressar os efeitos e correlações das variáveis com as informações contidas nos dados, por isso faz-se importante observar o vetor dos coeficientes de regressão atrelado à variável latente selecionada (FIGURA 39).

FIGURA 39. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COEFICIENTE DE REGRESSÃO COM 2VL PARA O MODELO PLS-DA.



FONTE: A autora (2019).

Como o FPS reflete principalmente da proteção na região do UVB (290 – 320 nm), esperava-se uma maior influência dessa região. A avaliação dos coeficientes de regressão (FIGURA 39) corrobora com o esperado e ainda demonstra uma importante influência da região UVA II (320 – 340 nm) na diferenciação de produtos de mesmo FPS. Caso fossem notadas bandas não características, isto significaria que ruídos estavam sendo considerados

durante a modelagem e novas tentativas deveriam ser realizadas (FERREIRA, 2015). A avaliação do gráfico de coeficiente de regressão do modelo proposto permite inferir que a região UVA é a principal responsável por diferenciar os produtos com diferentes FPS, esta característica pode ser decorrente do fato dos produtos apresentarem espectros muito semelhantes, principalmente na região UVB.

Para a etapa de previsão, é necessário se estabelecer limites numéricos para as classes, denominados *threshold*, estes limites são resultado da combinação das funções de densidade de probabilidade e a teoria Bayesiana, essas probabilidades são calculadas assumindo que as amostras do conjunto de calibração são representativas da população (FERREIRA, 2015).

Os limites mínimo e máximo encontrados para o modelo gerado foram -0,3206 e 0,3244, respectivamente, portanto, para interpretação dos resultados considerou-se que amostras com valores preditos inferiores a -0,3206 pertencem a classe FPS 15, entre -0,3206 e 0,3244 pertencem a classe FPS 30, e acima de 0,3244 pertencem a classe FPS 50.

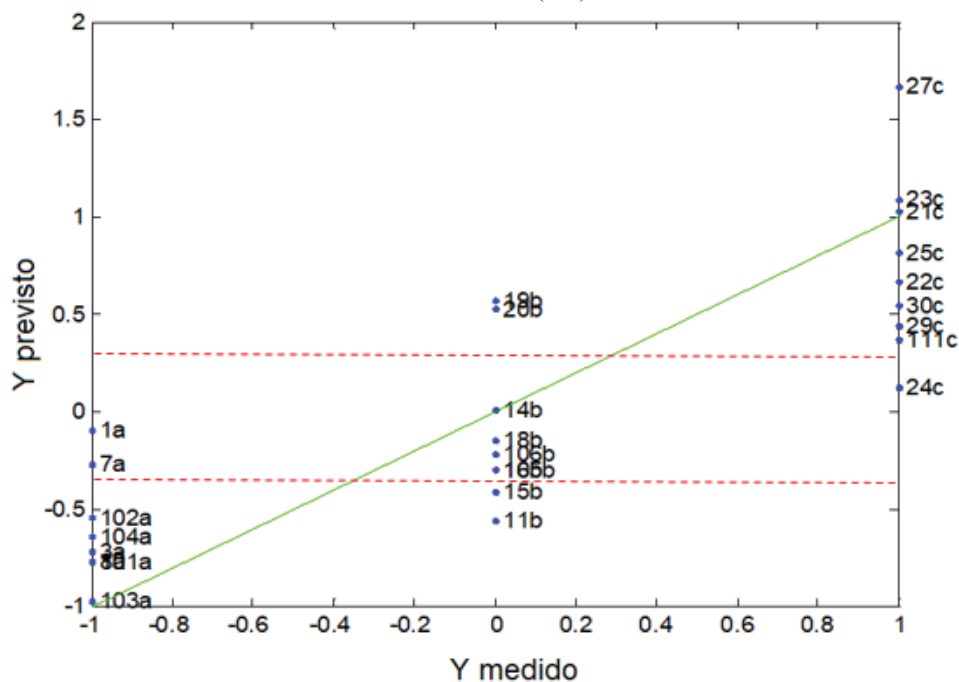
Os resultados preditos para cada amostra do conjunto de calibração estão apresentados na TABELA 11, e a visualização gráfica esta apresentada na FIGURA 40, de modo geral, obteve-se uma assertividade de 73% em relação à classe. Destes, 2 amostras das classes de FPS 15 e FPS 30 foram erroneamente classificadas, representando 8% em cada, e 1 amostra da classe de FPS 50, representando 4%.

TABELA 11. CLASSES REAIS E CLASSES PREVISTAS PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO DO MODELO PLS-DA.

<b>Amostra</b>	<b>Classe real</b>	<b>Valor de y previsto</b>	<b>Classe prevista</b>
1a	15	-0,15597	30
3a	15	-0,82102	15*
7a	15	-0,29358	30
8a	15	-0,84279	15*
11b	30	-0,73827	15
14b	30	-0,05501	30*
15b	30	-0,46353	15
16b	30	-0,33385	30*
18b	30	-0,19028	30*
19b	30	0,37207	50
20b	30	0,53646	50
21c	50	0,74714	50*
22c	50	0,57952	50*
23c	50	1,02640	50*
24c	50	0,24259	30
25c	50	0,80924	50*
27c	50	1,69730	50*
29c	50	0,60143	50*
30c	50	0,54192	50*
101a	15	-0,75224	15*
102a	15	-0,59423	15*
103a	15	-1,0380	15*
104a	15	-0,60769	15*
105b	30	-0,32405	30*
106b	30	-0,25835	30*
111c	50	0,31474	50*

\*Amostras corretamente classificadas.

FIGURA 40. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO VALOR PREVISTO PELO MODELO E O VALOR MEDIDO PARA O MODELO PLS-DA. (---) *THRESHOLD* OBTIDOS.



FONTE: A autora (2019).

De modo geral, o conjunto de validação deve ter no mínimo 20 amostras, caso contrário, o tamanho do conjunto de validação é quatro vezes o número de fatores no modelo, não sendo ainda possível, o conjunto de validação externa deve ter no mínimo 30% das amostras do conjunto de calibração (FERREIRA, 2015), no modelo proposto então, deveria ser de no mínimo 8. Os valores preditos para as oito amostras que compõe o conjunto de validação externa estão descritos na TABELA 12, e representou assertividade de 75% das amostras avaliadas.

TABELA 12. CLASSES REAIS E CLASSES PREVISTAS PARA O CONJUNTO DE VALIDAÇÃO DO MODELO PLS-DA.

Amostra	Classe real	Valor de y previsto	Classe prevista
2a	15	-0,41	15*
4a	15	-0,67	15*
5a	15	-0,58	15*
12b	30	0,23	30*
13b	30	0,36	50
17b	30	0,21	30*
26c	50	0,39	50*
28c	50	0,13	30

\*Amostras corretamente classificadas.



Das amostras erroneamente classificadas, o produto 28 também é composto unicamente de filtros físicos, assim como o caso do produto 33, anteriormente retirado do conjunto. Esta observação revela que o modelo construído não é indicado para produtos que são compostos unicamente de filtros físicos, já que o conjunto de calibração carece de amostras com esse tipo de composição. A partir da análise de todos os parâmetros e da assertividade tanto no conjunto de calibração quanto no conjunto de validação, podemos concluir que o modelo construído apresenta boa capacidade de predição da classe dos protetores solares, portanto, as informações espectrais representam sim, correlação com o nível de proteção UVB (FPS) associado a resposta biológica de formação do eritema da pele nas metodologias clássicas.

Vale ressaltar que a escolha pelo método classificatório foi feita devido a indisponibilidade do valor de FPS real de todas as amostras, e que a assertividade foi obtida considerando-se que os produtos pertenciam as classes descritas no rótulo, porém, produtos rotulados como FPS 15, 30 e 50, podem ser rotulados desta forma e apresentar níveis de proteção no mínimo superiores ao valor descrito. Desta forma, podemos inferir que no modelo construído, as amostras classificadas como FPS 15 podem ter resultados *in vivo* de 15 a 30, as classificadas como 30, podem ter resultados de 30 a 50 e as classificadas como 50, resultados iguais ou superiores a este valor, com categorias indicadas no rótulo (DCP), de respectivamente: média proteção, alta proteção e proteção muito alta.

Das amostras que possuíam valores de FPS reais disponíveis (16 produtos), apenas 2 delas foram erroneamente classificadas, 1 no conjunto de calibração e 1 no conjunto de validação, dessa forma, em termos do valor real, a assertividade obtida neste conjunto foi de 87,5%. Cabe destacar que previamente foi construído um modelo sem os dados espectroscópicos das amostras analisadas externamente e que quando incluídas essas amostras, o modelo não sofreu grandes alterações em termos de características e assertividade. O fato de o modelo não ter sofrido alterações com a inclusão dessas amostras externas é um forte indicativo de robustez.

O intervalo de confiança tolerado no teste *in vivo* de avaliação de FPS é de até 17% e um estudo realizado por Miksa *et al* (2016) testou 44 protetores solares comerciais disponíveis na Europa, a maioria dos produtos rotulava de 15 a 50+. Para cada produto pelo menos 3 testes de FPS *in vivo* foram realizados em institutos diferentes, e os resultados variaram bastante, sendo que em alguns casos o coeficiente de variação excedeu 50%.

Por conta da variabilidade do teste *in vivo*, apesar do modelo PLS-DA construído para estimativa do valor do FPS apresentar uma assertividade inferior ao desejado, devido a limitação das informações disponíveis, ainda assim, é de grande aplicabilidade na indústria na etapa de desenvolvimento de produtos e demonstrou resultados satisfatórios.

A metodologia proposta possibilita a redução do número de avaliações prévias em humanos, principalmente quando atrelado a softwares de previsão do fator de proteção solar a partir da quantidade e características dos filtros aplicados, como o *DSM Sunscreen Optimizer*. Isso porque o software levaria em consideração a susceptibilidade óptica dos filtros empregados enquanto o modelo levaria em conta os resultados da combinação de filtros e fórmula de produtos disponíveis no mercado.

## 6 CONSIDERACOES FINAIS E CONCLUSÕES

Um dos principais passos antes da elaboração de um modelo de calibração multivariada, consiste em interpretar a distribuição das amostras no gráfico cujos eixos são as componentes principais e identificar as variáveis originais com maior peso na combinação linear das componentes principais mais importantes. Em outras palavras, verificar se as componentes principais refletem as similaridades e as diferenças dentro e entre grupos.

A análise de PCA reduziu a dimensionalidade dos dados espectrais, indicando que 2 PC's foram capazes de descrever 99,86% da variação existente nos dados e foi capaz de promover agrupamentos de produtos no gráfico de *scores* de acordo com o nível de proteção solar rotulado. A análise de *loadings* corroborou com o conhecimento prévio das regiões do espectro de acordo com seu nível de relevância. Esta separação entre os grupos reforçou a hipótese inicial de que poderia existir uma correlação entre os dados espectroscópicos dos produtos e a resposta biológica atrelada ao valor de FPS.

As informações obtidas pelo método PCA, como também as informações prévias em relação as amostras, possibilitaram a seleção de conjuntos de calibração e validação externa para construção do modelo de classificação. A partir do cruzamento do perfil espectroscópico das amostras e os resultados de FPS, foram realizadas avaliações na tentativa de propor um modelo de calibração apropriado para correlacionar o FPS *in vivo* através do perfil absorptivo de produtos.

Em relação ao modelo de calibração PLS-DA construído, ele foi considerado satisfatório na predição das classes consideradas para as amostras, onde foi possível se verificar essa relação entre perfil espectral e o FPS rotulado para cerca de 74% das amostras avaliadas, considerando os conjuntos de calibração e validação. Este resultado foi considerado satisfatório, tendo em vista que o real valor de FPS não estava disponível para todas as amostras e para aquelas que possuíam o resultado real, a capacidade de predição chegou a 87,5%.

Os resultados obtidos para o modelo, reforçam sobre a importância do conhecimento sobre as amostras, seja seu real valor de FPS ou a informação da concentração dos filtros empregados, que possibilitariam a construção de modelos mais eficientes e robustos.

Com base nos resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho e devido a importância do tema, que envolve em seu método tradicional a exposição de seres

humanos a radiação para estimativa de proteção solar; os métodos quimiométricos podem ser considerados como um método alternativo, sendo uma opção rápida, barata, simples e sustentável do ponto de vista ambiental e social.

Conclui-se que o modelo proposto é de grande aplicabilidade na indústria, especialmente na etapa de desenvolvimento de produtos, o método demonstrou-se ser um método de rápida e fácil execução e de alta reprodutibilidade, coerente com a realidade da indústria de cosméticos. Além disso, a rapidez e facilidade de determinação da absorvidade de protetores solares empregando-se o equipamento Labsphere UV-2000S merece destaque.

Com ele, é possível se estimar a classe a que um produto pertenceria principalmente quando atrelado à softwares de previsão que levam em consideração a concentração de filtros. Esta associação permite a redução do número de testes prévios que significam economia de tempo, custo e redução da quantidade de voluntários humanos, além de possibilitar uma análise mais assertiva de qual amostra realmente deveria ser testada na metodologia *in vivo*.

Entretanto, é importante salientar que devido a relevância do tema, a avaliação de mais amostras de informações conhecidas e confiáveis, trariam maior confiabilidade e robustez ao modelo para que pudesse ser aplicado a nível global.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros, podemos citar:

- 1) Aplicar o método de reconhecimento de padrões supervisionados em um banco de dados de protetores solares maior com as informações reais dos FPS *in vivo* obtido e com base nos resultados obtidos construir um modelo de calibração através da regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) considerando o valor real do FPS para obtenção do valor de FPS esperado.
  
- 2) Aplicar o método de reconhecimento de padrões supervisionados em um banco de dados de produtos formados basicamente por filtros físicos, notadamente com comportamento diferente aos do que possuem filtros químicos. Classificando-os de acordo com o tipo e tamanho de partícula dos filtros aplicados, e com base nos resultados obtidos construir um modelo de calibração através da regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) considerando o valor real do FPS para obtenção do valor de FPS esperado.
  
- 3) Realizar avaliações em produtos com cor (com pigmentos) para verificar a influência do pigmento na estimativa do FPS através de modelos de calibração multivariada.

## 7 REFERÊNCIAS

1. ABDEL-GHANY, M. F.; ABDEL-AZIZ, O.; AYAD, M.F.; MIKAWY, N.N. Simultaneous Determination of Octinoxate, Oxybenzone, and Octocrylene in a Sunscreen Formulation Using Validated Spectrophotometric and Chemometric. **Journal of AOAC International**. v.98, n.5, p.1215–1225, 2015.
2. AHMAD, S.I. **Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment**. New York: Springer, 2017.
3. ALMEIDA, M.R.; CORREA, D.N; ROCHA, W.F.C.; SCAFI, F.J.O.; POPPI, R.J. Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation. **Microchemical Journal**. v.109, p.170–177 2013.
4. AMARAL, B. Avaliação de métodos de pré-concentração em fase sólida para determinação da atrazina e seus metabólitos empregando-se métodos espectroscópicos multivariados. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Química) –Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/38709/R%20-%20D%20-%20BIANCA%20DO%20AMARAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em ago.2019.
5. ANDREASSI, L.; FLORI, M.L.; RUBEGNI, P. Sun and skin: Role of phototype and skin colour. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.455, p.469–475, 1999.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 30: Regulamento Técnico Mercosul sobre protetores solares em cosméticos. 2012.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 69: Regulamento Técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. 2016.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 250: Projeto de Arte de Etiqueta ou Rotulagem no processo de regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. 2018.
9. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS (ABIHPEC). Conscientização impulsiona consumo de protetor solar no Brasil, 2014. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/conscientizacao-impulsiona-consumo-de-protetor-solar-no-brasil/>>. Acesso em ago.2019.
10. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS (ABIHPEC). Aumento de ICMS sobre protetor solar traria riscos à saúde da população em SE, 2019. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/release/aumento-de-icms-sobre-protetor-solar-traria-riscos-a-saude-da-populacao-em-se-diz-abihpec/>>. Acesso em ago.2019.

11. BALOGH, T.S.; VELASCO, M.V.R.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.86, n.4, p.732–742, 2011.
12. BAYERL, C.; TAAKE, S.; MOLL, I.; JUNG, E.G. Characterization of sunburn cells after exposure to ultraviolet light. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**. v.11, p.149–154, 1995.
13. BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**. v.17, n.3, p.166–173, 2003.
14. BEATTIE, P.E.; DAWE, R.S.; FERGUSON, J.; IBBOTSON, S.H. Dose–response and time–course characteristics of UV–A1 erythema. **Archives of Dermatology**. v.141, n.12, p.1549–1555, 2005.
15. BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: John Wiley & Sons, 1998.
16. BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.
17. CARVALHO, L.C.de; MORAIS, C.L.M.de; LIMA, K.M.G; JÚNIOR, L.C.C.; NASCIMENTO, P.A.M.; FARIA, J.B.; TEIXEIRA, G.H.A. Determination of the geographical origin and ethanol content of Brazilian sugarcane spirit using near–infrared spectroscopy coupled with discriminant analysis. **Analytical Methods**. v.8, n.28, p–5658–66, 2016.
18. CHUMMUN, S.; MCLEAN, N.R. Management of malignant skin cancers. **Surgery**. v.29, n.10, p.529–533, 2011.
19. COLE, C. Sunscreen protection in the ultraviolet A region: how to measure the effectiveness. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**. v.17, p.2–10, 2001.
20. COUTEAU, C.; POMMIER, M.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested in vitro. **Pharmazie**. v.62, n.6, p.449–452, 2007.
21. CUI, R.; WIDLUND, H.R.; FEIGE, E.; LIN, J.Y.; WILENSKY, D.L.; IGRAS, V.E.; D’ORAZIO, J.; FUNG, C.Y.; SCHANBACHER, C.F.; GRANTER, S.R.; FISHER, D.E. Central role of p53 in the Suntan response and pathologic hyperpigmentation. **Cell**, v.128, n.5, p.853–864, 2007.
22. DAZARD, J.E.; PIETTE, J.; BASSET–SEGUIN, N.; BLANCHARD, J.M.; GANDARILLAS, A. Switch from p53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. **Oncogene**. v.19, p.3693–3705, 2000.
23. DECONINCK, J.L. BOTHY, B. DESMEDT, P. COURSELLE, J.O. DE BEER, Detection of whitening agents in illegal cosmetics using attenuated total reflectance–

- infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.98, p.178–185, 2014.
24. DE CARVALHO, L.C.; DE MORAIS, C.D.L.M.; DE LIMA, K.M.G.; JÚNIOR L.C.C.; NASCIMENTO, P.A.M.; DE FARIA, J.B., et al. Determination of the geographical origin and ethanol content of Brazilian sugarcane spirit using near-infrared spectroscopy coupled with discriminant analysis. **Analytical Methods**. v.8, n.28, p.5658–5666, 2016.
  25. DE GRUIJL, F.R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**. v.15, n.5, p.316–320, 2000.
  26. DE PAOLA, M.V.R.V.; RIBEIRO, M.E. Interação entre filtros solares. **Cosmetics & Toiletries**. v.10, p.40–50, 1998.
  27. DIFFEY, B.L.; ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**. v.40, n. 3, p.127–133, 1989.
  28. DIFFEY, B.L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**. v.16, n.2, p.47–52, 1994.
  29. D’ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences**.v.14, p.12222–12248, 2013.
  30. EPSTEIN, J. H. Biological effect of sunlight. In: LOWE, N. J.; SHAATH, N. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspect**. New York: Marcel Dekker, 1990.
  31. FAURSCHOU, A.; WULF, H. C. The relation between sun protection factor and amount of sunscreen applied in vivo. **British Journal of Dermatology**. v.156, n.4, p.716–9, 2007.
  32. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Department of Health and Human Services, USA. Sunscreen Drug Product for Over-The-Counter Human Use, Tentative Final Monograph. 21 CFR, 1993.
  33. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Department of Health and Human Services, USA. Sunscreen Drug Product for Over-The-Counter Human Use, Final Monograph. 21 CFR, 1999.
  34. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Department of Health and Human Services, USA. Proposed Amendment of the Final Sunscreen Monograph. v.72, n.165, p.49070–49122, 2007.
  35. FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, n. 5, p.724–731, 1999.



36. FERREIRA, Márcia M.C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 496p., 2015.
37. FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**. v.30, n.1, p.153 – 158, 2007.
38. FORESTIER S. Rationale for sunscreen development. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.58, p.133–138, 2008.
39. GASPARRO, F. P.; MITCHNICK, M.; NASH, J. F. A Review of Sunscreen Safety and Efficacy. **Photochemistry and Photobiology**. v.68, n.243, 1998.
40. GERÔNIMO, D.M. Aplicação de ferramentas quimiométricas na indústria cosmética: um estudo sobre análise de produtos, controle de qualidade e determinação multivariada de compostos. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016. Disponível em: <  
<https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/trabalhoConclusaoWS?idpessoal=28085&idprograma=40001016026P2&anobase=2016&idtc=1330>>. Acesso em: ago. 2019.
41. GIGLIO, A.D.; PINTO, F.N.; PRUDENTE, F.V.B.; GONÇALVES, M.S.; SILVA, P.D.V. Mutação do gene p53 induzindo predisposição genética ao câncer: relato de um caso da Síndrome de Li–Fraumeni. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**. v.28, p.256–259, 2002.
42. GILABERTE, Y.E.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas**. v.101, p.659–672, 2010.
43. GOGNA, D.; JAIN, S.K.; YADAV, A.K.; AGRAWAL, G.P. Microsphere based improved sunscreen formulation of ethylhexyl methoxycinnamate. **Current Drug Delivery**. v.4, n.2, p.153–159, 2007.
44. GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ–LORENTE, M.; GILABERTE–CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**. v.26, n.6, p.614–626, 2008.
45. GRAFF, V.D. **Anatomia humana**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2003.
46. GREENLEE, R.T.; MURRAY T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v.50, p.7–33, 2000.
47. IKEHATA, H.; ONO, T. The mechanisms of UV mutagenesis. **Journal of Radiation Research**. v.52, p.115–125, 2011.
48. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministérios da Saúde. **O que é câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: ago.2019.
49. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 24444: Sun protection test methods – In vivo determination of the sun protection factor (SPF)**, 2010.

50. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 24442**: Sun protection test methods — In vivo determination of sunscreen UVA protection, 2011.
51. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 24443**: Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro, 2012.
52. JANSEN, R.; OSTERWALDER, U.; WANG, S.Q.; BURNETT, M.; LIM, H.W. Photoprotection: part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.69, n.6, p.867e1–867e14, 2013.
53. JUNIOR, E.R.; KOLLIAS, N.; COLE, C. New noninvasive approach assessing in vivo sun protection factor (SPF) using diffuse reflectance spectroscopy (DRS) and in vitro transmission. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**. v.30, p.202–211, 2014.
54. JOHNCOCK, W. Interação de formulações com filtro solar. **Cosmetics & Toiletries** (São Paulo). v.12, n.4, p.40–50, 2000.
55. KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**. v.2, n.4, p.1–12, 2002.
56. KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J.D. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**. Belgium, v.102, n.3, p.621–640, 2007.
57. KAWADA, A. Risk and preventive factors for skin phototype. **Journal of Dermatological Science**. v.23, p.27–29, 2000.
58. KLEIN, K. Encyclopedia of UV absorbers for sunscreen products. **Cosmetics and Toiletries**, v.107, p.45–65, 1992.
59. KOLARSICK, P.A.J.; KOLARSICK, M.A; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses Association**. v.3, n.4, p.203–213, 2011.
60. KULIKOV, E., LATHAM, K. and ADAMS, M. J. Classification and discrimination of some cosmetic face powders using XRF spectrometry with chemometric data analysis. **X-Ray Spectrometry**. v.41, n.6, p.410–415, 2012.
61. KULLAVANIJAYA; P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.52, p.937–958, 2005.
62. KURIAKOSE, S.; THANKAPPAN, X.; JOE, H.; VENKATARAMAN, V. Detection and quantification of adulteration in sandalwood oil through near infrared spectroscopy. **The Royal Society of Chemistry**. v.135, p. 2676–2681, 2010.

63. LAFHAL, S.; VANLOOT, P.; BOMBARDA, I.; KISTER, J.; DUPUY, N. Chemometric analysis of French lavender and lavandin essential oils by near infrared spectroscopy. **Industrial Crops and Products**. v.80, p.156–164, 2016.
64. LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. **Sunscreens: development, evaluation, and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker. p.589 – 600, 1997.
65. LU, H.; EDWARDS, C.; GASKELL, S.; PEARSE, A.; MARKS, R. Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. **British Journal of Dermatology**. v.135, p.263–267, 1996.
66. MANAIA, E.B.; KAMINSKI, R.C.K.; CORRÊA, M.A.; CHIAVACCI, L.A. Inorganic UV filters. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.49, n.2, p.201-220, 2013.
67. MAVERAKIS, E.; MIYAMURA, Y.; BOWEN, M.P; CORREA, G.; ONO, Y.; GOODARZI, H. Light, including ultraviolet. **Journal of Autoimmunity**. v.34, n.3, p.247–257, 2010.
68. MCCRACKEN, T.; WALKER, R. **Novo Atlas do corpo humano**. São Paulo: Visor, 2001.
69. MCGILL, G.G.; HORSTMANN, M.; WIDLUND, H.R.; DU, J.; MOTYCKOVA, G.; NISHIMURA, E.K.; LIN, Y.L.; RAMASWAMY, S.; AVERY, W.; DING, H.F.; et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. **Cell**. v.109, n.6, p.707–718, 2002.
70. MIKSA, S.; LUTZ, D.; GUY, C. New approach for a reliable in vitro sun protection factor method Part I: Principle and mathematical aspects. **International Journal of Cosmetic Science**, France. v.37, n.6, p.555–566, 2015.
71. MIKSA, S.; LUTZ, D.; GUY, C.; DELAMOUR, E. New approach for a reliable in vitro sun protection factor method – Part II: Practical aspects and implementations. **International Journal of Cosmetic Science**, France. v.38, n. 5, p.504-511, 2016.
72. MITCHNICK, M.A.; FAIRHURST, D.; PINNELL, S.R. Microfine Zinc oxide (Zcote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.40, n.1, p.85–90, 1999.
73. MOITA NETO, J.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**. v.21, n.4, p.467–469, 1998.
74. NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Classification**. Chichester: NIR Publications, 2004.
75. NASCIMENTO, L.F.; SANTOS, E.P.; AGUIAR, A.P. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese Orgânica. **Revista Virtual de Química**. v.6, n.2, p.190–223, 2014.

76. NASH, J.F. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. **Dermatologic Clinics**. v.24, n.1, p.35–51, 2006.
77. NG, K–H. **Non–Ionizing Radiations–Sources, Biological Effects, Emissions and Exposures**. Proceedings of the International Conference on Non–Ionizing Radiation at UNITEN. p.1–16, 2003.
78. NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.33, n.3, p.285–299, 2001.
79. OLIVEIRA, D.N.; DELAFIORI, J.; FERREIRA, M. S.; CATHARINO, R. R. In vitro evaluation of Sun Protection Factor and stability of commercial sunscreens using mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v.988, p.13–19, 2015.
80. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) [World Health Organization]. Global solar UV index: a practical guide. United Nations Environment Programme & International Commission on Non–Ionizing Radiation Protection. 2002.
81. OSTERWALDER, U.; LIM, H.W. Novel developments in photoprotection: Part I. In: LIM, H.W.; HÖNIGSMANN, H.; HAWK, J.L.M. **Photodermatology**. New York: Informa Healthcare USA; p.279–295, 2007.
82. OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. New York: Wiley–VCH, 1999.
83. PALM, M.D.; O'DONOGHUE, M.N. Update on photoprotection. **Dermatology Therapy**. v.20. p.360–76, 2007.
84. PARK, S.B.; HUH, C.H.; CHOE, Y.B.; YOUN, J.I. Time course of ultraviolet–induced skin reactions evaluated by two different reflectance spectrophotometers: DermaSpectrophotometer and Minolta spectrophotometer CM–2002. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**. v.18, n.1, p.23–28, 2002.
85. PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.14, n.2, p.198–219, 2003.
86. PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
87. PEDRO, A.M.K.; FERREIRA, M.M.C. The Use of Near–Infrared Spectroscopy and Chemometrics for Determining the Shelf–Life of Products. **Applied Spectroscopy**. v.63, n.11, p.1308–1314, 2009.
88. PEERBHAY, K.Y.; MUTANGA, O.; ISMAIL, R. Commercial tree species discrimination using airborne AISA Eagle Hyperspectral imagery and partial least squares discriminant analysis (PLS–DA) in KwaZulu–Natal, South Africa. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**. v.79, p.19–28, 2013.

89. PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA, S. et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**. v.246, p.37-45, 2002.
90. PINNELL, S.R.; FAIRHURST, D.; GILLIES, R.; MITCHNICK, M.A.; KOLLIAS, N. Microfine zinc oxide is a superior sunscreen ingredient to microfine titanium dioxide. **Dermatologic Surgery**. v.26, n.4, p.309-314, 2000.
91. PONTES, M.J.C. Algoritmo das projeções sucessivas para seleção de variáveis espectrais em problemas de classificação. 2009. 123 f. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/8196/2/arquivo%20total.pdf>>. Acesso em ago.2019.
92. RAI, R.; SHANMUGA, S.C.; SRINIVAS, C. Update on photoprotection. **Indian Journal of Dermatology**. v.57, n.5, p.335-342, 2012.
93. RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. et al. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra. p.21-27, 2003.
94. RIBEIRO, C.; OHARA, M.T. Entendendo Fotoproteção e Fotoprotetores. **Revista Racine**. São Paulo, v.13, p.34-46, 2003.
95. ROELANDTS R. History of human photobiology In: LIM, H.W.; HÖNIGSMANN, H.; HAWK, J.L.M. **Photodermatology**. New York: Informa Healthcare USA, p.1-13, 2007.
96. SADRIEH, N.; WOKOVICH, A.M.; GOPEE, N.V.; ZHENG, J.; HAINES, D.H.; PARMITER, D.; SIITONEN, P.; COZART, C.R.; PATRI, A.K.; MCNEIL, S.E.; HOWARD, P.C.; DOUB, W.H.; BUHSE, L. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO<sub>2</sub> particles. **Toxicological Sciences**. v.115, n.1, p.156-166, 2010.
97. SAGE, E.; GIRARD, P.M.; FRANCESCONI, S. Unravelling UVA-induced mutagenesis. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v.11, p.74-80, 2012.
98. SAMBANDAN, D.R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.64, n.4, p.748-758, 2011.
99. SANTOS, A. J. M.; MIRANDA, M. S.; SILVA, J. C. G. E. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. **Water Research**. v.46, p.3167, 2012.
100. SANTOS, M.O. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_64/v01/pdf/15-resenha-estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_64/v01/pdf/15-resenha-estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf)> . Acesso em ago.2019.

- 101.SAYES, C.M.; WAHI, R.; KURIAN, P.A.; LIU, Y.; WEST, J.L.; AUSMAN, K.D.; WARHEIT, D.B.; COLVIN, V.L. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. **Toxicological Sciences**. v.92, n.1, p.174–185, 2006.
- 102.SCHALKA, S.; DOS REIS, V.M.; CUCÉ, L.C. The influence of the amount of sunscreen applied and its sun protection factor (SPF): Evaluation of two sunscreens including the same ingredients at different concentrations. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**. v.25, n.4, p.175–180, 2009.
- 103.SCHALKA, S.; DOS REIS, V.M. Sun protection factor: meaning and controversies. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.83, n.3, p.507-515, 2011.
- 104.SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer – A review. **Mutation Research**. v.705, p.141–153, 2010.
- 105.SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**. v.360, n.3, p.794–802, 2007.
- 106.SHAATH, N.A. **The encyclopedia of ultraviolet filters**. New York: APC, 2007.
- 107.SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.
- 108.SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocrine Reviews**. v.21, p.457–487, 2000a.
- 109.SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; LUGER, T.; PAUS, R.; SOLOMON, S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. **Physiological Reviews**. v.80, p.979–1020, 2000b.
- 110.SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD). **Câncer de Pele**. Disponível em: <<https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>>. Acesso em: ago.2019.
- 111.SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, parte I. **Química Nova**. v.35, n.1, p.223–229, 2012.
- 112.SOWA, P.; RUTKOWSKA–TALIPSKA, J.; SULKOWSKA, U.; RUTKOWSKID, K.; RUTKOWSKIE, R. Ionizing and non–ionizing electromagnetic radiation in modern medicine. **Polish Annals of medicine**. p.134–138, 2012.
- 113.STANFIELD, J.; OSTERWALDER, U.; HERZOG, B. In vitro measurements of sunscreen protection. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v.9, n.4, p.489–494, 2010.



114. STIEFEL, C.; SCHWACK, W. Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. **International Journal of Cosmetic Science**. v.37, n.1, p.2-30, 2015.
115. THOMAS, E. V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**. v.66, n.15, p.795–804, 1994.
116. URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.64, p.99–104, 2001.
117. VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**. v.28, n.10, p.469–472, 2010.
118. WIDLUND, H.R.; FISHER, D.E. Microphthalmia-associated transcription factor: A critical regulator of pigment cell development and survival. **Oncogene**. v.22, n.20, p.3035–3041, 2003.
119. WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v.58, p.109–130, 2001.
120. YAN, Y.-D.; SUNG, J. H.; LEE, D. W.; KIM, J. S.; JEON, E.-M.; KIM, D.-D.; KIM, D. W.; KIM, J. O.; PIAO, M. G.; LI, D. X.; YONG, C. S.; CHOI, H. G. Evaluation of physicochemical properties, skin permeation and accumulation profiles of salicylic acid amide prodrugs as sunscreen agent. **International Journal of Pharmaceutics**. v.419, n.154, 2011.
121. ZWINKELS, J.C. Light, Electromagnetic Spectrum. **Encyclopedia of Color Science and Technology**. p.1–8, 2015.

## 8 ANEXOS

## ANEXO 1. DADOS BRUTOS - ESPECTROS MÉDIOS DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

$\lambda$ (nm) → Amostra ↓	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305
6a*	2.440	2.441	2.428	2.458	2.444	2.469	2.484	2.503	2.509	2.499	2.490	2.491	2.485	2.481	2.487	2.484
9a*	1.570	1.587	1.606	1.628	1.651	1.676	1.703	1.722	1.734	1.742	1.755	1.765	1.776	1.787	1.801	1.811
33b*	1.067	1.074	1.080	1.089	1.098	1.108	1.118	1.126	1.131	1.134	1.142	1.149	1.154	1.159	1.164	1.166
1a	0.924	0.926	0.928	0.931	0.933	0.936	0.940	0.942	0.942	0.942	0.944	0.945	0.947	0.948	0.950	0.950
3a	1.260	1.273	1.286	1.307	1.325	1.344	1.368	1.384	1.390	1.396	1.412	1.424	1.432	1.441	1.446	1.447
7a	1.148	1.154	1.160	1.168	1.176	1.185	1.194	1.201	1.203	1.203	1.205	1.208	1.211	1.213	1.217	1.218
8a	0.479	0.481	0.482	0.485	0.488	0.491	0.494	0.496	0.497	0.497	0.500	0.502	0.504	0.505	0.506	0.507
9a	1.570	1.587	1.606	1.628	1.651	1.676	1.703	1.722	1.734	1.742	1.755	1.765	1.776	1.787	1.801	1.811
11b	0.803	0.814	0.826	0.837	0.847	0.858	0.868	0.880	0.889	0.899	0.907	0.914	0.921	0.927	0.934	0.940
14b	1.292	1.301	1.309	1.318	1.326	1.335	1.344	1.354	1.362	1.369	1.375	1.378	1.382	1.385	1.389	1.392
15b	0.756	0.758	0.760	0.763	0.766	0.769	0.773	0.775	0.776	0.777	0.780	0.782	0.783	0.785	0.786	0.787
16b	1.049	1.054	1.058	1.065	1.072	1.079	1.086	1.093	1.095	1.097	1.101	1.106	1.110	1.112	1.116	1.117
18b	0.965	0.969	0.971	0.973	0.977	0.981	0.985	0.989	0.990	0.991	0.993	0.995	0.997	0.999	1.001	1.002
19b	1.755	1.769	1.780	1.806	1.818	1.844	1.863	1.881	1.890	1.898	1.916	1.925	1.937	1.947	1.955	1.957
20b	1.813	1.821	1.824	1.836	1.843	1.857	1.877	1.891	1.897	1.894	1.893	1.897	1.903	1.906	1.912	1.914
21c	2.120	2.143	2.157	2.173	2.195	2.228	2.255	2.287	2.300	2.307	2.317	2.334	2.351	2.362	2.382	2.383
22c	2.051	2.072	2.082	2.096	2.111	2.138	2.160	2.189	2.198	2.205	2.215	2.218	2.233	2.240	2.253	2.254
23c	2.598	2.611	2.616	2.624	2.616	2.663	2.707	2.773	2.789	2.792	2.768	2.773	2.813	2.809	2.854	2.849
24c	1.494	1.500	1.501	1.503	1.504	1.509	1.511	1.513	1.514	1.513	1.511	1.509	1.510	1.510	1.512	1.510
25c	2.372	2.396	2.397	2.406	2.430	2.451	2.498	2.532	2.540	2.536	2.542	2.544	2.573	2.569	2.594	2.589
27c	2.970	3.003	2.962	2.929	2.906	3.003	3.040	3.128	3.143	3.153	3.104	3.054	3.138	3.114	3.181	3.173
29c	1.749	1.755	1.753	1.754	1.755	1.760	1.764	1.768	1.766	1.761	1.756	1.752	1.751	1.751	1.754	1.752
30c	1.580	1.582	1.583	1.586	1.591	1.595	1.600	1.605	1.607	1.606	1.607	1.608	1.611	1.613	1.616	1.618
101a	0.970	0.973	0.975	0.979	0.983	0.984	0.987	0.992	0.989	0.986	0.985	0.989	0.987	0.987	0.989	0.988
102a	0.796	0.797	0.799	0.803	0.807	0.809	0.812	0.818	0.815	0.813	0.814	0.819	0.819	0.821	0.823	0.823
103a	0.315	0.314	0.315	0.316	0.318	0.319	0.320	0.324	0.322	0.321	0.322	0.325	0.325	0.325	0.328	0.327
104a	1.168	1.173	1.178	1.183	1.188	1.190	1.192	1.197	1.196	1.195	1.196	1.198	1.197	1.197	1.198	1.198
105b	1.106	1.107	1.111	1.116	1.120	1.123	1.127	1.134	1.132	1.130	1.132	1.137	1.137	1.139	1.142	1.142
106b	1.111	1.113	1.116	1.121	1.127	1.131	1.136	1.144	1.142	1.141	1.143	1.150	1.152	1.154	1.158	1.158
111c	2.072	2.092	2.118	2.152	2.177	2.190	2.226	2.253	2.263	2.276	2.294	2.306	2.327	2.337	2.337	2.349



$\lambda$ (nm) → Armostra ↓	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324
6a*	2.466	2.451	2.448	2.438	2.444	2.429	2.422	2.403	2.378	2.349	2.323	2.308	2.284	2.257	2.225	2.197	2.171	2.140	2.114
9a*	1.816	1.824	1.822	1.814	1.803	1.786	1.769	1.751	1.726	1.697	1.677	1.658	1.641	1.624	1.609	1.592	1.570	1.534	1.487
33b*	1.168	1.168	1.168	1.167	1.165	1.161	1.157	1.152	1.145	1.137	1.129	1.120	1.109	1.096	1.082	1.067	1.050	1.031	1.012
1a	0.952	0.954	0.957	0.959	0.961	0.961	0.961	0.961	0.962	0.962	0.962	0.962	0.962	0.961	0.961	0.961	0.960	0.960	0.959
3a	1.448	1.452	1.456	1.462	1.466	1.467	1.468	1.464	1.462	1.460	1.454	1.439	1.421	1.397	1.368	1.338	1.304	1.270	1.235
7a	1.219	1.220	1.221	1.221	1.222	1.220	1.218	1.215	1.211	1.208	1.204	1.200	1.195	1.188	1.181	1.172	1.163	1.152	1.142
8a	0.507	0.508	0.509	0.510	0.511	0.510	0.510	0.509	0.509	0.510	0.509	0.509	0.508	0.507	0.507	0.505	0.504	0.503	0.502
9a	1.816	1.824	1.822	1.814	1.803	1.786	1.769	1.751	1.726	1.697	1.677	1.658	1.641	1.624	1.609	1.592	1.570	1.534	1.487
11b	0.944	0.947	0.948	0.948	0.949	0.948	0.950	0.951	0.946	0.940	0.936	0.932	0.926	0.918	0.909	0.899	0.888	0.876	0.863
14b	1.393	1.394	1.394	1.396	1.399	1.403	1.406	1.409	1.407	1.402	1.399	1.394	1.386	1.376	1.362	1.348	1.333	1.317	1.302
15b	0.788	0.789	0.790	0.791	0.791	0.791	0.790	0.789	0.789	0.789	0.788	0.788	0.786	0.785	0.784	0.783	0.781	0.779	0.777
16b	1.117	1.119	1.120	1.120	1.120	1.118	1.116	1.113	1.110	1.108	1.104	1.101	1.095	1.090	1.084	1.077	1.070	1.061	1.053
18b	1.002	1.003	1.004	1.005	1.005	1.005	1.005	1.004	1.002	1.001	1.001	1.000	0.998	0.996	0.994	0.992	0.990	0.988	0.985
19b	1.957	1.967	1.973	1.979	1.986	1.993	1.996	1.999	2.001	2.003	2.000	1.994	1.980	1.960	1.935	1.906	1.880	1.851	1.820
20b	1.911	1.914	1.914	1.916	1.921	1.920	1.919	1.913	1.902	1.895	1.893	1.887	1.876	1.867	1.856	1.843	1.834	1.820	1.808
21c	2.385	2.393	2.392	2.404	2.418	2.415	2.415	2.406	2.389	2.376	2.370	2.363	2.348	2.336	2.321	2.307	2.293	2.277	2.261
22c	2.250	2.253	2.256	2.266	2.279	2.282	2.282	2.283	2.270	2.263	2.253	2.240	2.218	2.197	2.169	2.139	2.115	2.086	2.060
23c	2.813	2.834	2.833	2.861	2.891	2.897	2.900	2.874	2.840	2.816	2.805	2.793	2.763	2.733	2.690	2.660	2.648	2.593	2.575
24c	1.509	1.509	1.507	1.507	1.507	1.504	1.502	1.499	1.493	1.490	1.486	1.482	1.477	1.470	1.462	1.454	1.446	1.437	1.428
25c	2.586	2.588	2.586	2.602	2.622	2.622	2.623	2.607	2.584	2.564	2.557	2.545	2.520	2.493	2.455	2.428	2.401	2.365	2.336
27c	3.126	3.153	3.125	3.143	3.197	3.199	3.201	3.194	3.138	3.094	3.095	3.122	3.072	3.020	2.995	2.987	2.971	2.911	2.909
29c	1.749	1.750	1.748	1.751	1.752	1.751	1.750	1.746	1.739	1.735	1.733	1.732	1.726	1.717	1.709	1.701	1.693	1.682	1.672
30c	1.616	1.619	1.621	1.623	1.626	1.627	1.627	1.625	1.623	1.620	1.618	1.617	1.613	1.610	1.604	1.598	1.596	1.592	1.586
101a	0.987	0.990	0.992	0.996	0.996	0.996	0.993	0.989	0.984	0.984	0.979	0.974	0.967	0.959	0.952	0.944	0.935	0.926	0.915
102a	0.822	0.825	0.827	0.831	0.831	0.832	0.830	0.828	0.826	0.829	0.827	0.826	0.822	0.819	0.817	0.813	0.809	0.804	0.799
103a	0.326	0.328	0.328	0.330	0.330	0.331	0.330	0.329	0.327	0.330	0.330	0.330	0.330	0.329	0.329	0.328	0.328	0.327	0.327
104a	1.199	1.202	1.203	1.206	1.205	1.204	1.201	1.198	1.193	1.190	1.184	1.178	1.170	1.162	1.152	1.142	1.131	1.119	1.106
105b	1.141	1.145	1.146	1.150	1.150	1.151	1.148	1.146	1.143	1.144	1.142	1.139	1.134	1.129	1.125	1.119	1.112	1.106	1.098
106b	1.157	1.161	1.162	1.166	1.166	1.166	1.163	1.160	1.157	1.159	1.156	1.154	1.149	1.144	1.140	1.134	1.128	1.121	1.114
111c	2.349	2.356	2.352	2.361	2.364	2.361	2.360	2.353	2.352	2.338	2.327	2.303	2.277	2.239	2.210	2.166	2.128	2.091	2.051

$\lambda$ (nm) → Amostra ↓	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
6a*	2.091	2.064	2.041	2.021	1.992	1.974	1.959	1.939	1.929	1.916	1.895	1.904	1.883	1.880	1.871	1.863
9a*	1.434	1.372	1.313	1.259	1.207	1.163	1.130	1.105	1.087	1.074	1.059	1.065	1.055	1.053	1.052	1.052
33b*	0.993	0.973	0.955	0.937	0.918	0.899	0.882	0.866	0.852	0.838	0.813	0.825	0.802	0.791	0.780	0.769
1a	0.959	0.958	0.957	0.957	0.956	0.956	0.956	0.956	0.957	0.958	0.959	0.959	0.961	0.962	0.964	0.965
3a	1.205	1.175	1.150	1.128	1.108	1.093	1.082	1.073	1.067	1.063	1.060	1.061	1.060	1.060	1.061	1.064
7a	1.132	1.121	1.110	1.100	1.089	1.080	1.072	1.064	1.059	1.054	1.047	1.050	1.045	1.043	1.042	1.041
8a	0.500	0.499	0.497	0.496	0.494	0.492	0.491	0.490	0.489	0.489	0.489	0.489	0.489	0.490	0.491	0.492
9a	1.434	1.372	1.313	1.259	1.207	1.163	1.130	1.105	1.087	1.074	1.059	1.065	1.055	1.053	1.052	1.052
11b	0.853	0.842	0.833	0.826	0.818	0.811	0.806	0.803	0.802	0.802	0.805	0.802	0.809	0.813	0.818	0.823
14b	1.290	1.278	1.269	1.262	1.255	1.250	1.247	1.246	1.246	1.247	1.251	1.249	1.254	1.257	1.261	1.262
15b	0.776	0.773	0.771	0.769	0.767	0.765	0.764	0.763	0.762	0.762	0.763	0.762	0.764	0.764	0.766	0.767
16b	1.046	1.037	1.029	1.022	1.014	1.007	1.002	0.996	0.992	0.989	0.985	0.986	0.983	0.982	0.981	0.981
18b	0.983	0.980	0.978	0.976	0.973	0.971	0.970	0.968	0.968	0.967	0.968	0.968	0.968	0.968	0.969	0.970
19b	1.801	1.777	1.762	1.751	1.744	1.740	1.743	1.747	1.753	1.762	1.776	1.773	1.786	1.793	1.804	1.811
20b	1.798	1.783	1.770	1.758	1.745	1.732	1.724	1.717	1.711	1.705	1.701	1.703	1.699	1.696	1.697	1.696
21c	2.248	2.229	2.212	2.198	2.175	2.160	2.150	2.140	2.138	2.134	2.135	2.134	2.136	2.134	2.137	2.136
22c	2.040	2.019	2.003	1.987	1.977	1.966	1.962	1.956	1.957	1.958	1.962	1.960	1.966	1.967	1.971	1.971
23c	2.563	2.532	2.509	2.491	2.460	2.449	2.440	2.433	2.432	2.432	2.433	2.439	2.435	2.436	2.439	2.441
24c	1.419	1.409	1.401	1.392	1.382	1.374	1.366	1.359	1.352	1.346	1.336	1.341	1.332	1.327	1.321	1.316
25c	2.318	2.288	2.267	2.249	2.228	2.215	2.207	2.199	2.199	2.194	2.198	2.199	2.202	2.202	2.210	2.207
27c	2.920	2.907	2.872	2.852	2.817	2.800	2.793	2.769	2.783	2.782	2.790	2.811	2.823	2.782	2.786	2.760
29c	1.661	1.651	1.640	1.630	1.619	1.610	1.601	1.596	1.590	1.584	1.579	1.581	1.575	1.571	1.567	1.565
30c	1.581	1.576	1.570	1.565	1.558	1.553	1.549	1.546	1.542	1.541	1.537	1.539	1.537	1.533	1.534	1.532
101a	0.904	0.892	0.878	0.865	0.849	0.835	0.819	0.804	0.789	0.774	0.760	0.746	0.734	0.722	0.713	0.705
102a	0.794	0.789	0.783	0.777	0.771	0.765	0.759	0.754	0.749	0.744	0.740	0.736	0.733	0.729	0.727	0.726
103a	0.326	0.325	0.324	0.323	0.322	0.322	0.322	0.322	0.322	0.321	0.321	0.322	0.322	0.322	0.323	0.323
104a	1.093	1.078	1.062	1.047	1.029	1.010	0.992	0.974	0.956	0.938	0.920	0.905	0.891	0.877	0.866	0.856
105b	1.090	1.081	1.072	1.062	1.052	1.043	1.033	1.024	1.015	1.007	0.999	0.993	0.987	0.981	0.978	0.975
106b	1.106	1.098	1.089	1.081	1.072	1.065	1.057	1.050	1.044	1.039	1.034	1.029	1.026	1.022	1.021	1.020
111c	2.020	1.992	1.970	1.950	1.933	1.923	1.918	1.916	1.916	1.919	1.923	1.928	1.934	1.938	1.950	1.958

\* Amostras anômalas que não foram consideradas no conjunto de calibração.

## ANEXO 2. ESPECTROS MÉDIOS DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO

$\lambda$ (nm) → Amostra ↓	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305
2a	0.840	0.841	0.843	0.849	0.853	0.858	0.866	0.867	0.865	0.864	0.868	0.872	0.874	0.877	0.878	0.878
4a	0.626	0.630	0.635	0.644	0.652	0.659	0.670	0.674	0.674	0.673	0.681	0.687	0.691	0.696	0.698	0.699
5a	1.672	1.691	1.708	1.734	1.755	1.782	1.812	1.835	1.849	1.861	1.879	1.891	1.904	1.912	1.921	1.922
12b	1.480	1.488	1.492	1.500	1.499	1.510	1.517	1.527	1.539	1.543	1.542	1.543	1.547	1.550	1.554	1.558
13b	1.742	1.752	1.758	1.763	1.763	1.772	1.779	1.791	1.800	1.801	1.801	1.803	1.805	1.806	1.812	1.816
17b	1.353	1.357	1.357	1.358	1.357	1.357	1.356	1.355	1.353	1.349	1.344	1.340	1.340	1.337	1.337	1.335
26c	1.915	1.931	1.937	1.953	1.967	1.994	2.016	2.039	2.048	2.053	2.061	2.072	2.082	2.089	2.104	2.104
28c	1.637	1.646	1.648	1.659	1.668	1.676	1.686	1.695	1.698	1.701	1.708	1.714	1.722	1.728	1.734	1.736

$\lambda$ (nm) → Amostra ↓	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324
2a	0.878	0.880	0.883	0.884	0.884	0.883	0.880	0.877	0.877	0.878	0.878	0.876	0.875	0.873	0.872	0.870	0.869	0.867	0.863
4a	0.700	0.704	0.707	0.710	0.711	0.710	0.708	0.704	0.705	0.707	0.707	0.704	0.702	0.699	0.697	0.694	0.690	0.687	0.683
5a	1.925	1.929	1.934	1.941	1.949	1.954	1.957	1.957	1.952	1.939	1.925	1.903	1.872	1.833	1.787	1.740	1.691	1.642	1.595
12b	1.557	1.552	1.555	1.558	1.564	1.568	1.571	1.574	1.567	1.561	1.559	1.553	1.546	1.536	1.526	1.516	1.500	1.487	1.474
13b	1.814	1.818	1.815	1.819	1.822	1.822	1.823	1.821	1.813	1.805	1.805	1.802	1.799	1.797	1.795	1.794	1.792	1.787	1.779
17b	1.333	1.332	1.331	1.330	1.331	1.330	1.329	1.327	1.324	1.323	1.321	1.319	1.316	1.312	1.307	1.300	1.295	1.287	1.281
26c	2.104	2.110	2.110	2.116	2.123	2.124	2.125	2.117	2.108	2.100	2.090	2.080	2.062	2.041	2.015	1.992	1.969	1.941	1.915
28c	1.735	1.740	1.738	1.741	1.741	1.738	1.736	1.731	1.725	1.719	1.712	1.706	1.698	1.689	1.677	1.664	1.652	1.638	1.623

$\lambda$ (nm) → Amostra ↓	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
2a	0.859	0.854	0.849	0.844	0.840	0.837	0.834	0.832	0.831	0.831	0.831	0.831	0.832	0.833	0.835	0.837
4a	0.680	0.676	0.673	0.671	0.670	0.670	0.670	0.670	0.671	0.673	0.678	0.677	0.681	0.684	0.688	0.694
5a	1.557	1.522	1.493	1.471	1.450	1.435	1.425	1.417	1.414	1.412	1.413	1.412	1.416	1.418	1.421	1.424
12b	1.467	1.455	1.447	1.440	1.433	1.426	1.424	1.420	1.419	1.417	1.420	1.419	1.419	1.421	1.421	1.419
13b	1.769	1.754	1.732	1.713	1.685	1.657	1.636	1.617	1.603	1.594	1.585	1.587	1.583	1.585	1.587	1.587
17b	1.274	1.267	1.261	1.255	1.248	1.242	1.238	1.233	1.229	1.226	1.222	1.223	1.219	1.217	1.215	1.212
26c	1.896	1.877	1.859	1.842	1.827	1.817	1.813	1.805	1.802	1.804	1.806	1.803	1.808	1.810	1.815	1.819
28c	1.610	1.596	1.582	1.569	1.554	1.543	1.529	1.517	1.508	1.497	1.477	1.486	1.467	1.458	1.448	1.437