

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

MICHELE MARIN DA COSTA

**ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA NA OBSERVAÇÃO DE PRINCÍPIOS
ATIVOS DE REPELENTES DE INSETOS E PROTETORES SOLARES NA PELE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU**

São José dos Campos, junho/2018

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

MICHELE MARIN DA COSTA

**ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA NA OBSERVAÇÃO DE PRINCÍPIOS
ATIVOS DE REPELENTES DE INSETOS E PROTETORES SOLARES NA PELE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos, junho/2018

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

MICHELE MARIN DA COSTA

**ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA NA OBSERVAÇÃO DE PRINCÍPIOS
ATIVOS DE REPELENTE DE INSETOS E PROTETORES SOLARES NA PELE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Strictu Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Engenharia
Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

Orientador

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Viviane Gadret Bório (externo)

Universidade do Vale do Paraíba

Prof. Dr. Leandro Procópio Alves (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Janaína Duarte (suplente)

Universidade Paulista

São José dos Campos, junho/2018

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

MICHELE MARIN DA COSTA

Mestranda e pesquisadora em Engenharia Biomédica, pós-graduada em Psicopedagogia e graduada em Ciências e Matemática pela Universidade Metodista de Piracicaba (2004). Atualmente é professora na área de exatas na Secretaria de Educação do Estado de São Paulo (SP).

Ficha Catalográfica

M337ee da Costa, Michele Marin
Espectroscopia Raman aplicada na observação de princípios ativos de repelentes de insetos e protetores solares na pele / Michele Marin da Costa – 2018.
78f: il: 30 cm.

Orientador: Landulfo Silveira Jr.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2018.
Bibliografia: f. 73-78

1. Engenharia biomédica. 2. Espectroscopia Raman. 3. Protetor solar. 4. Repelente de insetos. 5. Detecção *in vivo*. 6. Controle de qualidade.

CDD 610.28

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, mas também a minha família, marido e filhos, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Durvalino e minha mãe Roseli, por servirem de exemplo além de todo apoio, incentivo e amor, sempre acreditando em mim.

Aos meus irmãos, sobrinhos, familiares e amigos que estão sempre presentes na minha vida compartilhando bons momentos.

Ao meu marido João, por colaborar e apoiar, pela compreensão nos momentos de ausência e por todo o carinho de sempre.

Aos meus queridos filhos Miguel e Pedro por iluminarem meus dias e por compreenderem a importância deste trabalho e suportarem a minha ausência.

Agradeço ao Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr., pelos ensinamentos, orientações e pela paciência que teve comigo em todo esse período, permitindo que eu realizasse mais uma importante meta na minha vida profissional.

A Universidade Anhembi Morumbi pela concessão da bolsa que permitiu a conclusão desta dissertação além de todo o apoio dado através do pessoal administrativo, em especial a Nídia Lúcia Domingues Macedo pela prontidão, prestatividade e grande generosidade para com todos os alunos.

Agradeço aos Prof. Dr. Leandro Procópio Alves e Prof. Dr. Rodrigo Alexis Lazo Osório pela atenção dispensada durante toda esta jornada e, em especial, pelo apoio na fase de qualificação.

RESUMO

O presente trabalho propõe o uso da espectroscopia Raman para a identificação dos princípios ativos de repelentes de insetos e protetores solares aplicados topicamente à pele. Atualmente estes produtos são testados a partir de protocolos que sofrem críticas por, recorrentemente, usarem seres humanos nos testes e cujos resultados, apesar de amplamente aceitos, são criticados por estarem sujeitos a imprecisões. Produtos de uso tópico como repelentes de insetos e protetores solares dependem da presença dos seus princípios ativos na pele para produzir a ação de proteção esperada. Assim a identificação destes princípios ativos na pele poderia servir como meio de verificação da eficácia destes produtos, reaproveitando testes já realizados em humanos para verificação da eficácia destes princípios ativos. Neste contexto apresenta-se a espectroscopia Raman como opção para a identificação dos princípios ativos destes produtos aplicados a pele. No estudo foram obtidos espectros Raman de amostras de duas apresentações de repelentes de inseto [repelente em creme (CR) e *spray* (SPR)] e quatro apresentações de protetores solares [protetores solares de duas marcas comercialmente disponíveis (SD e CEN)], não aplicados à pele, e dos mesmos produtos aplicados à pele de voluntários selecionados para o estudo. Também foram obtidos os espectros da pele dos mesmos voluntários sem aplicação de produto (controle). Os espectros obtidos passaram por um pré-processamento que envolveu a retirada de *outliers*, a remoção da fluorescência produzida pelas amostras por um polinômio de 7^a ordem e normalização pela área sob a curva. Nos espectros relativos aos produtos não aplicados a pele foram identificados picos Raman correspondentes aos princípios ativos, conforme identificado na literatura especializada, e nos espectros relativos aos produtos aplicados sobre a pele, foram observados picos dos ingredientes ativos quando comparados com o espectro da pele controle. O teste de Tukey ($p < 0,05$) indicou que, para repelentes de insetos, os picos 526 cm^{-1} e 1003 cm^{-1} (referentes ao diethyl toluamide - DEET), apresentaram significância estatística; já para os protetores solares, os picos 1177 e 1288 cm^{-1} (associados ao octinoxate e ao benzophenone-3), presentes na marca CEN, e o pico em 1605 cm^{-1} (associado ao avobenzone), presente na marca SD apresentaram significância estatística, todos versus controle o que é uma evidência da presença destes princípios ativos na pele dos voluntários. Com isso conclui-se que é possível a utilização da espectroscopia Raman para identificação dos princípios ativos de repelentes de insetos e protetores solares na pele e que a sistemática aplicada pode ser utilizada como metodologia para a identificação de outros produtos tópicos com características similares.

Palavras-chave: espectroscopia Raman; protetor solar; repelente de insetos; detecção *in vivo*; controle de qualidade.

ABSTRACT

This work proposes the use of Raman spectroscopy to identify the active ingredients of insect repellents and sunscreens applied to the skin. Currently, these products are tested using protocols that are criticized for recurring use of humans in tests and whose results, although widely accepted, may possess inaccuracies. Topical use products, such as insect repellents and sunscreens, depend on the presence of their active ingredients in the skin to produce the expected protective action. Thus, the identification of these active ingredients in the skin could serve as a means of verifying the efficacy of these products, reusing human tests that already verified the efficacy of these active ingredients. In this context Raman spectroscopy is presented as an option to identify the active principles of products applied to the skin. In this study, Raman spectra were acquired from samples of two insect repellent (cream repellent (CR) and spray (SPR) presentations and four presentations of sunscreens [sunscreens of two commercially available brands (SD and CEN)] undiluted, and the same products applied to the skin of volunteers selected for the study. The skin spectra of the same volunteers were also acquired without application of the product (control). The acquired spectra underwent pre-processing which involved the removal of outliers, removal of the fluorescence produced by the samples using a 7th order polynomial and normalization by the area under the curve. In the spectra relative to the undiluted products, Raman peaks corresponding to the active ingredients were identified accordingly to peaks presented on specialized literature, and, in the spectra of products applied on the skin, the peaks of the active ingredients, previously observed within undiluted products, were observed when compared with the spectrum of the control skin. The Tukey test ($p < 0.05$) indicated that, for insect repellents, the peaks 526 cm^{-1} and 1003 cm^{-1} (related to diethyl toluamide - DEET) were statistically significant; for sunscreens, peaks 1177 and 1288 cm^{-1} (associated with octinoxate and benzophenone-3), present in the CEN brand, and the peak at 1605 cm^{-1} (associated with avobenzone), present in the SD brand, showed statistically significant difference versus control which is an evidence that these peaks are indicators of presence of referred active ingredients on volunteer's skin. These findings lead to a conclusion that it is possible to use Raman spectroscopy to identify the active ingredients of insect repellents and sunscreens in the skin and that the systematics, followed during study, can be used as a methodology to identify other topically applied products with similar characteristics.

Keywords: Raman spectroscopy; sunscreen; insect repellent; *in vivo* detection; quality control.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 A pele.....	20
1.2 Produtos de uso tópico para tratamentos localizados na pele.....	22
1.2.1 Repelentes de insetos.....	23
1.2.2 Protetores solares	29
1.3 Espectroscopia Raman.....	38
1.3.1 Efeito Raman	38
1.3.2 Aplicação da espectroscopia Raman a materiais orgânicos	40
1.3.3 Pré-processamento do espectro Raman	41
1.3.4 Potencial da espectroscopia Raman como método de avaliação de produtos de uso tópico.....	43
CAPÍTULO 2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1 Sujeitos de pesquisa.....	46
2.2 Amostras	46
2.3 Aplicação dos produtos	49
2.4 Obtenção dos espectros Raman	51
2.5 Pré-processamento dos espectros e análise estatística.....	53
CAPÍTULO 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 Observações sobre os espectros dos repelentes de insetos e protetores solares	55
3.2 Repelentes de insetos.....	60
3.2.1 Espectros Raman dos produtos não aplicados a pele e picos mais significativos.....	60
3.2.2 Análise estatística dos picos dos repelentes identificados na pele	62
3.3 Protetores solares	63
3.3.1 Espectros Raman dos produtos não aplicados à pele e picos mais significativos.....	63
3.3.2 Análise estatística dos picos dos protetores solares identificados na pele	66
3.4 Identificação pela técnica Raman dos princípios ativos na pele	67

3.5	Aplicações <i>in vivo</i> e no controle de qualidade de identificação de substâncias pela espectroscopia Raman.....	69
CONCLUSÃO.....		72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Camadas da pele com detalhe para as camadas da epiderme [adaptada de (BETTS et al., 2013)]	21
Figura 2: Estrutura da molécula de DEET (RSC, 2015a)	26
Figura 3: Estrutura da molécula do IR 3535 (RSC, 2015b)	27
Figura 4: Estrutura da molécula de icaridina (RSC, 2015c).....	28
Figura 5: Estrutura da molécula de octinoxate (RSC, 2015d).....	32
Figura 6: Estrutura da molécula de benzophenone-3 (RSC, 2015e)	33
Figura 7: Estrutura da molécula de octocrylene (RSC, 2015f)	34
Figura 8: Estrutura da molécula de avobenzone (RSC, 2015g)	35
Figura 9: Esquema mostrando o fluxo de atividades utilizados na avaliação da DEM.....	36
Figura 10: Figura esquemática mostrando o efeito Raman e como o espalhamento Raman repercute no espectro coletado; no esquema as setas ascendentes que vão do estado de energia fundamental ao estado de energia virtual correspondem à energia absorvida pela incidência do fóton e as setas descendentes correspondem à liberação de energia decorrente da emissão do fóton espalhado	39
Figura 11: Esquema mostrando como a espectroscopia Raman poderia ser agregada na avaliação de produtos de uso tópico	44
Figura 12: Marcações no antebraço dos voluntários para a aplicação dos produtos: A) aplicação dos repelentes e B) aplicação dos protetores solares	50
Figura 13: Diagrama esquemático do sistema Raman dispersivo que foi utilizado na coleta dos dados espectrais	52
Figura 14: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_SPR - <i>spray</i> e REF_CR - creme) – espectros sem pré-processamento	56
Figura 15: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (SPR - <i>spray</i> e CR - creme) e da pele sem produto (CTR-controle) – espectros sem pré-processamento.....	56
Figura 16: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_SPR - <i>spray</i> e REF_CR - creme) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados.....	57

Figura 17: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (SPR - <i>spray</i> e CR - creme) e da pele sem produto (CTR-controle) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados	57
Figura 18: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_CEN15-Marca CEN FPS 15, REF_SD15-Marca CEN FPS 30, REF_SD15-Marca SD FPS15 e REF_SD30-Marca SD FPS30) – espectros sem pré-processamento	58
Figura 19: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (CEN15-Marca CEN FPS 15, SD15-Marca CEN FPS 30, SD15-Marca SD FPS15 e SD30-Marca SD FPS30) e da pele sem produto (CTR-controle) – espectros sem pré-processamento	58
Figura 20: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_CEN15-Marca CEN FPS 15, REF_SD15-Marca CEN FPS 30, REF_SD15-Marca SD FPS15 e REF_SD30-Marca SD FPS30) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados	59
Figura 21: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (CEN15-Marca CEN FPS 15, SD15-Marca CEN FPS 30, SD15-Marca SD FPS15 e SD30-Marca SD FPS30) e da pele sem produto (CTR-controle) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados	60
Figura 22: Espectros Raman dos repelentes nas formulações creme (REF_CR) e <i>spray</i> (REF_SPR). Os picos indicados representam o princípio ativo DEET	61
Figura 23: A) Espectros Raman médios de pele com repelente nas apresentações <i>spray</i> (SPR) e creme (CR) e de pele sem aplicação de repelente (CTR-controle); B), C) e D) apresentam plotagem dos picos em 527, 690 e 1003 cm^{-1} , respectivamente, com ampliação que permite observar a sobreposição dos espectros referentes a SPR, CR e CTR nos picos comuns à pele e a diferença na intensidade dos picos referentes ao DEET	62
Figura 24: Plotagem das intensidades médias e desvios padrão dos picos Raman do princípio ativo DEET encontrados nos espectros da pele. As letras (a) e (b) indicam significância estatística dos grupos SPR vs CTR (a) e CR vs CTR (b) pelo teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$)	63
Figura 25: Espectros Raman dos protetores solares nos grupos CEN15, CEN30, SD15 e SD30. Os picos marcados representam os picos identificados nos produtos	

aplicados em porta amostra de alumínio. A identificação dos picos faz relação aos princípios ativos indicados na Tabela 8 64

Figura 26: A) Espectros Raman médios dos grupos CTR, CEN15, CEN30, SD15 e SD30; B), C), D), E) e F) apresentam plotagem dos picos em 1003, 1177, 1288, 1611 e 1564 cm^{-1} , respectivamente, com ampliação que permite observar a sobreposição dos espectros referentes a CTR, CEN15, CEN30, SD15 e SD30..... 66

Figura 27: Plotagem das intensidades médias e desvios padrão dos picos Raman dos princípios ativos dos protetores solares encontrados nos espectros da pele. As letras (a), (b), (c) e (d) indicam significância estatística dos grupos CEN15 vs CTR (a), CEN30 vs CTR (b), SD15 vs CTR (c) e SD30 vs CTR (d) pelo teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$)..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de doenças associadas com picadas de artrópodes (STEEN; CARBONARO; SCHWARTZ, 2004)	24
Tabela 2: Relação entre os riscos a saúde da pele e frequência de radiação UV associada (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002)	30
Tabela 3: Escala de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988)	46
Tabela 4: Componentes dos repelentes de insetos considerados no estudo conforme informações do rótulo	47
Tabela 5: Componentes dos protetores solares considerados no estudo conforme informações do rótulo	47
Tabela 6: Regiões de aplicação dos produtos, número de coletas espectrais e nomenclatura dos agrupamentos na pele dos voluntários.....	52
Tabela 7: Picos Raman característicos do princípio ativo nas amostras dos repelentes creme e <i>spray</i> conforme identificados em literatura	61
Tabela 8: Picos Raman característicos de princípios ativos de protetores solares conforme identificados na literatura.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância, <i>analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
COLIPA	<i>The European Cosmetic and Perfumery Association</i>
DEET	Diethyl toluamide (nomenclatura INCI)
DEM	Dose eritematosa mínima
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
HBV	Vírus da hepatite B
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ISPF	<i>International Sun Protection Factor test method</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Computador pessoal
pMPC	Methacryloyloxethyl phosphorylcholine (nomenclatura INCI)
PPD	<i>Permanent Pigment Darkening</i>
RCS	<i>Royal Chemical Society</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
u.a.	Unidades arbitrárias
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
US FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVAPF	Fator de proteção UVA
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C

INTRODUÇÃO

Repelentes de insetos e protetores solares são produtos cosméticos que representam soluções práticas para a proteção contra riscos trazidos pela ação, potencialmente nociva, de artrópodes e pela radiação solar. Os repelentes são substâncias que, quando aplicadas sobre a pele, roupas ou superfícies, desencorajam a aproximação de insetos. Seu uso reduz o risco de transmissão de doenças infecciosas e reações imunoalérgicas resultantes da picada desses artrópodes. Os repelentes químicos de uso tópico que possuem como princípio ativo o diethyl toluamide (DEET) são os mais usados ao redor do mundo (RIBAS; CARREÑO, 2010). Os protetores solares são produtos destinados a minimizar a radiação solar e proteger as células viáveis da pele contra efeitos potencialmente danosos da radiação ultravioleta (UV), como a queimadura solar e o câncer de pele. Estes produtos fazem uso de filtros solares, que são princípios ativos que podem ter ação de absorção (moléculas orgânicas) ou de reflexão e dispersão (partículas de óxidos) da radiação incidente (SCHALKKA; REIS, 2011). Como em outros cosméticos que tem ação protetiva contra aspectos ambientais, é necessária a realização de avaliações sistemáticas que forneçam evidências de que as propriedades de proteção, atribuídas aos produtos, efetivamente alcançam o resultado esperado.

Repelentes de insetos e protetores solares são classificados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como cosméticos de nível 2 (ANVISA, 2015). De acordo com as Resoluções RDC no. 19/2013 e RDC no. 30/2012, ambas da ANVISA (ANVISA, 2012, 2013), os fabricantes devem apresentar estudos para comprovar a eficácia dos produtos a partir de metodologias reconhecidas por esta agência. Para os repelentes de insetos, a RDC 19/2013 (ANVISA, 2013) estabelece os protocolos listados pela *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) (US EPA, 2010) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (OMS, 2009). Para os protetores solares, a RDC 30/2012 (ANVISA, 2012) estabelece que os protocolos de teste mais importantes são os listados pela *United States Food and Drug Administration* (US FDA) (US FDA, 1999) e pelo *European Cosmetic and Perfumery Association* (COLIPA) (COLIPA; CTFA; JCIA, 2006). Em ambos os casos, as metodologias são padronizadas a partir da exposição de indivíduos à ação do agente agressor (insetos no caso dos repelentes e luz solar no caso dos protetores solares), comparando-se os efeitos nos indivíduos em áreas com tratamento e áreas sem tratamento.

As abordagens experimentais como as adotadas para repelentes e protetores solares levantam questões éticas em virtude do uso de seres humanos como sujeitos de pesquisa (SARDENBERG, 1999). Observa-se como agravante a necessidade a realização de novos

ensaios a cada nova formulação proposta pelos fabricantes, exigindo uma rotina de exposição para muitos indivíduos.

Além destas questões éticas, vários estudos criticam tais métodos para avaliar a eficácia dos produtos. Com relação aos repelentes de insetos, Barnard (BARNARD, 2005) faz uma discussão sobre diferentes protocolos de avaliação de repelentes e destaca que essas metodologias trazem incertezas que afetam a precisão dos resultados devido a características como o aparato de testes utilizado ou o apetite dos mosquitos, por exemplo. Outras pesquisas, que baseiam seus protocolos de avaliação no comportamento dos insetos, também tratam das dificuldades relatadas por Barnard, sem no entanto propor soluções para diminuir estas incertezas (RODRIGUEZ et al., 2015; CARROLL et al., 2010; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013).

Com relação aos protetores solares, os trabalhos de Schalka e Reis (SCHALKA; REIS, 2011) e de Zastrow et al. (ZASTROW et al., 2004) apresentam discussões sobre as metodologias atualmente em uso para a determinação do fator de proteção solar (FPS). Os autores criticam o uso de voluntários nos testes e as limitações apresentadas nos mesmos, uma vez que os testes produzem resultados subjetivos ou com variações que dependem de interpretação do observador e da reação da pele ao estímulo da luz ou à formulação (SCHALKA; REIS, 2011) e de não medir o efeito da radiação ultravioleta A (UVA) (ZASTROW et al., 2004). Apesar de existirem evoluções no campo de avaliação dos raios UVA, com o advento de técnicas de medição a partir da pigmentação persistente (*persistant pigment darkening*, PPD) como o fator de proteção UVA (*UVA protection factor*, UVAPF) (BAUMANN, 2008), principalmente as críticas trazidas por Schalka e reforçadas por Wolf et al. (WOLF et al., 2003) sobre a falta de uma relação mais direta entre o eritema, no caso dos testes para identificação do impacto de radiação ultravioleta B (UVB) ou pigmentação persistente para identificação dos impactos de raios UVA, e os impactos na prevenção de doenças causadas pela radiação solar.

Somadas as incertezas quanto à eficácia dos testes, é possível identificar os eventuais problemas de qualidade nos respectivos processos produtivos como fonte de variações das qualidades protetivas destes produtos. Para prevenir isso, as indústrias aplicam técnicas quimiométricas ao controle de qualidade que, no entanto, têm limitações relacionadas à natureza amostral desse procedimento e custos, e dependendo do tipo de produto, do tempo necessário para a obtenção dos resultados destas análises (TREVISAN MARCELLO G.; POPPI RONEI J., 2006).

Nesse contexto, o desenvolvimento de uma técnica que possa mensurar a presença do produto aplicado topicamente à pele poderia agir como auxiliar aos atuais protocolos de teste, para aproveitar os resultados de testes de eficácia já efetuados com os agentes agressores, testando o tempo de persistência do produto topicamente aplicado à pele. Uma técnica que atende a esta característica é a espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman apresenta-se como uma técnica de análise óptica capaz de identificar componentes químicos presentes tanto em formulações quanto em aplicações tópicas na pele, com vantagens que incluem não invasividade, rapidez, não destruição da amostra e especificidade molecular (HANLON et al., 2000). Esses aspectos podem propiciar o desenvolvimento de um protocolo de pesquisa simples, confiável e preciso para a determinação da presença de princípios ativos de protetores solares e repelentes aplicados topicamente.

A espectroscopia Raman baseia-se no efeito Raman, que é o espalhamento inelástico da luz por uma molécula polarizável (HANLON et al., 2000). Nas moléculas polarizáveis (em geral apolares, como a maioria das moléculas orgânicas), a incidência de um fóton promove a polarização da nuvem eletrônica, criando um dipolo induzido pelo campo elétrico da radiação incidente e que vibra na mesma frequência desta radiação. Este dipolo induzido emite radiação no mesmo comprimento de onda da radiação incidente (espalhamento Rayleigh). Porém, as vibrações moleculares podem alterar a polarizabilidade da nuvem eletrônica deste dipolo induzido durante a vibração, refletindo-se em mudanças da energia dos fótons espalhados (decorrentes da polarização induzida) em função da energia da vibração molecular, o que caracteriza o espalhamento inelástico ou Raman. Isso é expresso na forma de um espectro com picos característicos, coletado com um espectrômetro, e que se apresenta como uma assinatura espectral ou “impressão digital” do material em análise (HANLON et al., 2000).

Diante dos problemas relatados relativos ao uso ostensivo de voluntários humanos para a realização de testes de eficácia de repelentes de insetos e protetores solares e dos potenciais problemas relacionados ao controle de qualidade destes produtos, a espectroscopia Raman poderia servir como meio de otimizar o uso de testes de eficácia dos produtos com voluntários humanos ao verificar a permanência dos princípios ativos previamente testados na pele e, pela identificação *in situ* e mesmo *in vivo* que poderia ser adotada como inspeção dos sistemas de controle de qualidade dos fabricantes destes produtos.

Desta forma, reste trabalho tem como o objetivo a análise, através da espectroscopia Raman, de repelentes de insetos e protetores solares disponíveis comercialmente,

identificando os picos principais dos princípios ativos nas formulações destes produtos. O trabalho também objetiva a determinação da presença destes produtos aplicados topicamente em regiões da pele de voluntários comparativamente a regiões de controle, visando obter uma metodologia óptica para avaliação da presença destes produtos na pele.

CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo composta por três camadas principais: epiderme, derme e tecido subcutâneo ou hipoderme. A Figura 1 apresenta a divisão de camadas da pele e, em detalhe, as camadas da epiderme (BAUMANN, 2008). A camada mais exterior, a epiderme, tem como uma de suas características a proteção contra agentes agressores e a retenção de água no corpo, sendo composta por:

- Estrato córneo: camada mais externa da pele, composta de células que perderam seus núcleos e grânulos e coberta por um material proteico conhecido como envelope celular que ajuda na ação de retenção de água e em evitar a absorção de materiais indesejáveis (BAUMANN, 2008);
- Estrato lúcido: encontrado em regiões em que a pele é mais grossa como na palma das mãos ou sola dos pés. É caracterizado por ser composto de células preenchidos por eleidina, proteína translúcida que dá o aspecto desta camada (BETTS et al., 2013);
- Estrato granuloso: camada intermediária, abaixo do estrato córneo e que se notabiliza pela presença de células com grânulos. Estas células estão diferenciadas e substituem as células externas do estrato córneo perdidas no processo de descamação;
- Estrato espinhoso: o estrato espinhoso é composto de células diferenciadas que se notabilizam pelos prolongamentos espinhosos conhecidos como desmossomos que agem como estruturas de adesão celular e proteínas importantes para o transporte celular; e
- Estrato germinativo: o estrato germinativo corresponde a camada em que as células indiferenciadas localizam-se. É a partir desse estrato que são formadas as células para os estratos acima.

Apesar destes produtos serem absorvidos pela pele ao longo do tempo, o local em que sua ação ocorre e que é estudado neste trabalho é o estrato córneo. No entanto, por simplicidade, no trabalho, serão feitas referências à pele como órgão a partir da compreensão de que o estrato córneo está contido no conjunto da pele.

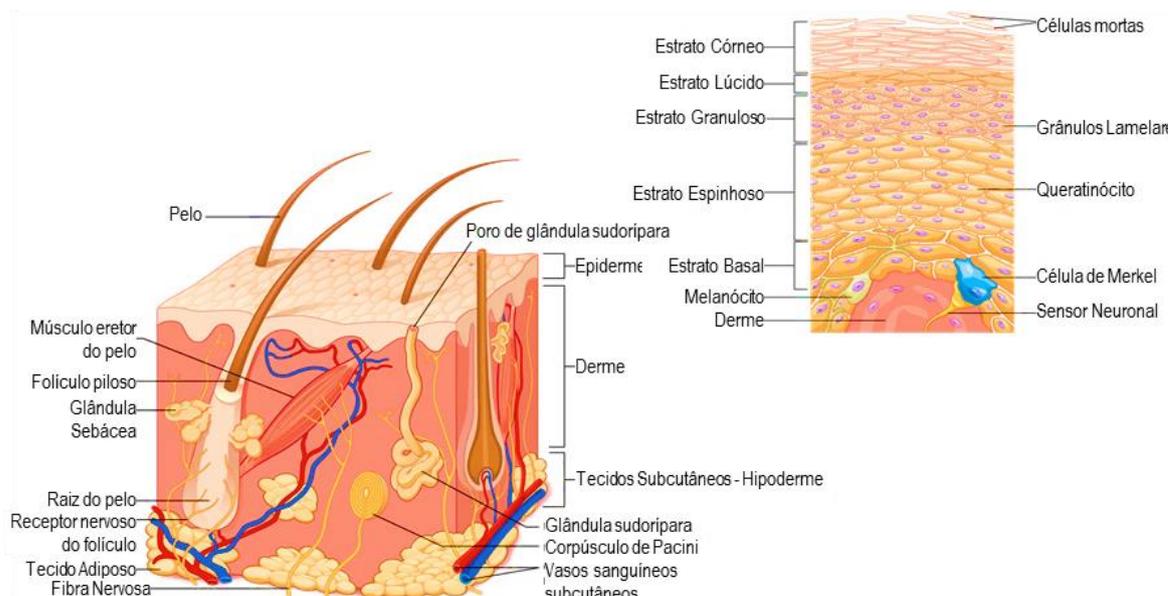


Figura 1: Camadas da pele com detalhe para as camadas da epiderme [adaptada de (BETTS et al., 2013)]

Uma pele de aparência saudável depende da sua integridade física e do seu nível de hidratação (BAUMANN, 2008). Estas características, promovidas a partir de uma nutrição/hidratação corporal adequada, também são beneficiadas pelo uso de produtos que auxiliem na manutenção do ciclo de renovação celular que ocorre na epiderme.

No caso das picadas de insetos, a pele reage tanto pelo resultado da injeção das substâncias ativas como pela sensibilização trazida pela injeção de antígenos. A reação, que é normalmente relacionada a uma reação alérgica, frequentemente está associada à presença de parasitas que podem causar doenças (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002). O combate a esse agente agressor tem como uma das principais frentes o uso sistemático de repelentes contra insetos (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013; RODRIGUEZ et al., 2015).

Já a radiação solar pode provocar danos a pele de diferentes maneiras sendo os principais agentes desses efeitos danosos as variações na faixa das radiações UVA, UVB ultravioleta C (UVC) (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002). Essas radiações podem levar ao aparecimento de tumores malignos na pele, queimaduras solares, aceleração do envelhecimento da pele, etc. Para a proteção contra raios UVA e UVB é aconselhável o uso de filtros solares de mecanismo físico (fabricados a partir de óxidos metálicos) ou protetores solares elaborados a partir de substâncias denominadas filtros solares de mecanismo químico, capazes de absorver os raios UVA e UVB, responsáveis por grande parte dos danos à saúde

em potencial trazidos pelos raios solares (BAUMANN, 2008; DUTRA et al., 2004; HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002).

Assim como para outras doenças e ameaças à saúde da pele, tanto no caso dos potenciais danos causados por picadas de insetos como aqueles causados pela incidência de radiação solar, beneficiam-se do fato da pele ser um órgão exposto o que possibilita a aplicação tópica de medicamento destinados a efetivar o tratamento pretendido (BERTH - JONES, 2016).

1.2 Produtos de uso tópico para tratamentos localizados na pele

Diversas condições que afetam a pele podem ser tratadas de forma efetiva por medicamentos de uso tópico (BERTH - JONES, 2016). A determinação das características do medicamento a ser utilizado depende, fundamentalmente, do efeito pretendido e da condição da pele no momento da aplicação.

A avaliação sobre o efeito pretendido considera aspectos relacionados à composição do produto a ser aplicado, a dosagem necessária a ser aplicada e a área sobre a qual o produto será aplicado (BERTH - JONES, 2016; WIECHERS, 2007). Já a condição da pele no momento da aplicação é o direcionador para a definição sobre o veículo de aplicação dos produtos a serem utilizados (BERTH - JONES, 2016).

Neste trabalho abordaram-se os repelentes contra insetos e protetores solares. O primeiro tipo de produto foi estudado em duas apresentações distintas: *spray* e creme. O protetor solar foi estudado apenas na forma de creme.

As apresentações em creme caracterizam-se por serem emulsões semissólidas contendo óleos e água. Cremes do tipo água/óleo são imiscíveis em água, tornando-os difíceis de serem lavados, mas, por outro lado, conferindo resistência ao suor e a contatos ocasionais com a água (BERTH - JONES, 2016).

As apresentações em *spray* tratam-se, de fato, de loções que se caracterizam por serem soluções do princípio ativo com solventes como água, álcool, etc. (BERTH - JONES, 2016).

A seguir serão explicadas, em maior detalhe, as características dos repelentes de insetos e protetores solares. Na explicação serão apresentadas figuras contendo as estruturas moleculares de agentes ativos utilizados nestes produtos. Estas estruturas moleculares são livremente disponíveis a partir do website da *Royal Chemical Society* (RSC) em

<http://www.chemspider.com>. Estes princípios ativos também serão descritos a partir de nomes de uso comum e das nomenclaturas conforme a *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Compostos químicos naturalmente presentes no corpo humano como as proteínas fenilalanina, tirosina, actina, etc. serão apresentadas por nomes comumente apresentados na literatura especializada.

1.2.1 Repelentes de insetos

Repelentes de insetos são produtos de uso tópico que trazem proteção contra uma diversidade de artrópodes através de substâncias químicas que induzem estes artrópodes a evitarem a fonte destas substâncias voláteis (LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013). Estes animais sentem-se atraídos pelos humanos como fonte de alimento a partir de estímulos visuais e olfativos. Sabe-se que pessoas trajando roupas escuras são mais atraentes aos artrópodes (LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013) e substâncias como o ácido lático e o dióxido de carbono expelidos pelos seres humanos durante seu metabolismo natural tem a capacidade de atrair estes animais (GOUGE, 2011; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013).

De forma geral, os repelentes agem a partir da formação de uma barreira de gases formada pela volatilização dos princípios ativos identificados nos repelentes. Esta barreira usualmente estende-se por alguns centímetros da pele e é formada logo em seguida a aplicação do repelente. Isso acaba requerendo que o produto seja aplicado uniformemente nas áreas descobertas da pele (LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013). Desta forma, a eficácia destes produtos depende da temperatura de ebulição do princípio ativo, da temperatura do ar, unidade e velocidade do vento do ambiente (LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013). Observa-se que conforme o produto perde eficácia, inicialmente os artrópodes começam a vencer a barreira de gás formada pelo repelente para, quando encerra-se a eficácia do produto, começarem a picar o indivíduo (LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013).

1.2.1.1 Perigos à saúde trazidos por insetos e outros artrópodes e mecanismos de repelência aos insetos

Artrópodes são os vetores de diversas doenças infecciosas como a malária, dengue, febre Chikungunya, etc. A utilização de repelentes de insetos pode evitar de forma efetiva a aproximação destes animais e disseminação de doenças associadas a eles (KATZ; MILLER;

HEBERT, 2008; STEEN; CARBONARO; SCHWARTZ, 2004). Além de serem potenciais vetores de doenças, as picadas dos insetos causam danos à pele além da possibilidade de causar reações alérgicas como a urticária papular (MOREIRA; ROSMANINHO; SILVA, 2014; STEEN; CARBONARO; SCHWARTZ, 2004). A Tabela 1 resume as doenças associadas a picadas de artrópodes. Outra potencial ameaça trazida pelas picadas de artrópodes é a instalação de agentes patológicos que aproveitam-se da quebra da barreira natural fornecida pela pele (BAUMANN, 2008) e possibilitando a instalação de diversos tipos de bactérias e vírus no organismo (STEEN; CARBONARO; SCHWARTZ, 2004).

Tabela 1: Relação de doenças associadas com picadas de artrópodes (STEEN; CARBONARO; SCHWARTZ, 2004)

Artrópodes		Exemplos de doenças associadas
Insetos	Piolho	Tifo, febre das trincheiras, febre recorrente
	Pulga*	Peste bubônica, tifo e tungíase (bicho-de-pé)
	Percevejos*	Pápulas purulentas, transmissão do vírus da hepatite B (HBV)
	Moscas e mosquitos*	Miíase cutânea, malária, febre amarela, dengue, encefalite viral, oncocercose, lepra, doença do sono, febre do Nilo
	Abelhas, vespas e formigas	Reações locais, anafilaxia
	Insetos <i>Reduviidae</i>	Doença de Chagas, reações papulobulosas, anafilaxia
Aracnídeos	Aranhas	Necrose, paralisia
	Escorpiões	Danos locais ao tecido, neurotoxinas, colapso cardiorrespiratório
	Carrapatos	Formação de granuloma, Doença de Lyme, febre maculosa, paralisia por carrapatos, febre do carrapato do Colorado, babesiose, erliquiose, febre Q, tularemia
	Ácaros*	Dermatite com hipersensibilidade da pele, sarna, possível participação na rosácea
Outros	Centopeias e diplópodes	Danos locais ao tecido

(*) comumente causam urticária papular

Existem diversas teorias a respeito dos mecanismos de repelência que os repelentes de insetos têm sobre os artrópodes de maneira geral, mas um grande número de autores aponta como causa da aversão dos insetos às regiões protegidas, uma reação dos sensores

olfativos e gustativos aos princípios ativos volatilizados dos repelentes (KATZ; MILLER; HEBERT, 2008; NAUCKE et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2015). Uma das teorias sugere que os repelentes mascaram ou impedem a ação atrativa causada pelos alvos dos mosquitos (DICKENS; BOHBOT, 2013). Isso seria suportado por resultados de estudos que indicam uma diminuição da sensibilidade ao ácido láctico nos sensores olfativos de artrópodes estudados (DICKENS; BOHBOT, 2013). Esta hipótese é criticada por Syed et al. que indica a ocorrência de estudos que identificaram que nestes casos, de fato, houve a alteração da proporção de agentes de atração com a introdução de DEET no experimento (SYED, 2014). Outra teoria afirma que os repelentes acionariam um receptor olfativo específico que promoveria o comportamento de repulsa do artrópode (DICKENS; BOHBOT, 2013). Esta proposta é suportada por Syed et al. (SYED, 2014). Dickens e Bohbot apresentam um experimento realizado com o *Aedes aegypti* em que é mostrada a diferença da resposta de sensores gustativos a diversas substâncias e a diversos repelentes (DEET, Icaridina e IR3535, etc.) indicando que os repelentes foram identificados a partir de uma estrutura diferente da utilizada para outras substâncias (DICKENS; BOHBOT, 2013). Destaca-se que a fêmea do *A. aegypti* é uma das espécies mais utilizadas nos protocolos de teste adotados para determinação da eficácia dos repelentes de insetos (BARNARD, 2005).

1.2.1.2 Principais princípios ativos para repelentes de insetos

Os seguintes princípios ativos para repelentes de insetos são utilizados em estudos comparativos identificados na literatura especializada (ANTWI; SHAMA; PETERSON, 2008; BEEVER, 2006; CARROLL et al., 2010; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013). A nomenclatura utilizada segue a INCI seguida por uma denominação de uso comum entre parênteses. Nas seções a seguir, quando cada um dos princípios ativos for detalhado, será apresentada também a nomenclatura conforme IUPAC.

- diethyl toluamide (DEET);
- ethyl butylacetylaminopropionate (*Insect Repellent IR 3535*);
- hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxylate (icaridina).

Estudos comparando a eficácia dos princípios ativos mostrou que para carrapatos, os três princípios ativos conseguiram manter sua ação repelente por pelo menos 12 h (CARROLL et al., 2010). Um estudo realizado por Lupi et al., realizado com diversas espécies de mosquito, mostrou que o DEET, o IR 3535 e a Icaridina proporcionaram na média um tempo proteção equivalente (LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013).

O DEET (nomenclatura INCI: diethyl toluamide, nomenclatura IUPAC: N,N-diethyl-3-methylbenzamide) é o princípio ativo mais usado e considerado com mais amplo alcance e eficácia dentre outros princípios ativos de repelentes de insetos (BEEVER, 2006; CARROLL et al., 2010). A cada ano estima-se que 1/3 da população dos EUA utilize o DEET para proteção contra picadas de artrópodes (US EPA, 2017). A Figura 2 mostra a estrutura molecular do DEET.



Figura 2: Estrutura da molécula de DEET (RSC, 2015a)

O DEET pode ser utilizado em diversas formas como cremes, *sprays* e materiais impregnados com concentrações variando de 5 a 99%. Desde o seu desenvolvimento pelo exército dos EUA em 1946, o DEET tem sido reconhecido como um produto eficaz e seguro (US EPA, 2017). A US EPA, que é responsável pela regulamentação desses produtos, e motivados por críticas a respeito do uso do DEET, realizou avaliações sobre os riscos do DEET à saúde nos anos de 2008 e 2014, mas não identificou preocupações relevantes quanto ao uso deste princípio ativo (US EPA, 2017).

Apesar de contar com um histórico de anos de uso considerado seguro pelos órgãos reguladores (RIBAS; CARREÑO, 2010; US EPA, 2017), estudo conduzido por Antwi et al. têm apontado que o uso continuado do DEET pode provocar contaminação do organismo maneira considerada inaceitável (ANTWI; SHAMA; PETERSON, 2008), mas os casos reportados de contaminação consideram casos agudos, e que normalmente estão associados ao uso inadequado do produto, incluindo sua ingestão (KATZ; MILLER; HEBERT, 2008; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013).

Em estudos para a determinação da eficácia de repelentes, considerando o histórico de uso seguro e sua eficácia, o DEET é considerado o padrão para repelentes de insetos, sendo utilizado para a comparação de resultados (BEEVER, 2006; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013; NAUCKE et al., 2007). Esta predominância motivou que o estudo aqui descrito adotasse esse princípio ativo como representante dos repelentes de insetos.

O IR 3535 (nomenclatura INCI: ethyl butylacetylaminopropionate, nomenclatura IUPAC: ethyl 3-[acetyl(butyl)amino]propanoate) foi desenvolvido na década de 1970 e é estruturalmente baseado no aminoácido β -alanina (NAUCKE et al., 2007). Tem sido utilizado na Europa desde a década de 1980 com grande sucesso. É um componente incolor e quase inodoro que tem mostrado eficácia comparável ao DEET e icaridina (CARROLL et al., 2010; KATZ; MILLER; HEBERT, 2008; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013). A Figura 3 mostra a estrutura molecular do IR 3535.

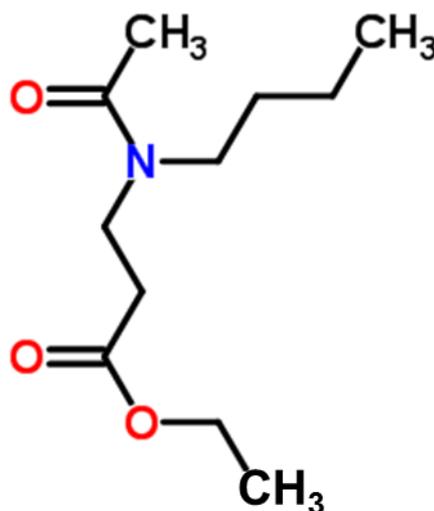


Figura 3: Estrutura da molécula do IR 3535 (RSC, 2015b)

Estudos realizados para a avaliação de princípios ativos indicou que o IR 3535 é um produto seguro para o uso humano. O estudo investigou diversas formas de intoxicação através de experiências com animais e considerou que a maior parte do produto acaba sendo rapidamente eliminado pela urina, sem causar efeitos de acumulação no médio prazo. O relatório alerta apenas que a exposição deste produto aos olhos causa irritação (EUROPEAN CHEMICAL AGENCY, 2014).

A icaridina (nomenclatura INCI: hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxylate, nomenclatura IUPAC: 2-(2-hydroxyethyl)-1-piperidinecarboxylic acid 1-methylpropyl ester), também conhecida como picaridina, é um composto sintetizado inicialmente na década de 1980, e que é reconhecida pela sua capacidade de repelir insetos, carrapatos e ácaros (GERVAIS, J. A et al., 2009).

A icaridina foi elaborada para parecer-se com o composto natural piperina, encontrado no grupo de plantas destinados a produção de pimenta-do-reino (GERVAIS, J. A

et al., 2009). A icaridina é usada na Europa e Austrália há anos. No Brasil há registro de produtos que usam a icaridina como princípio ativo desde 2005 (ANVISA, 2005). A Figura 4 mostra a estrutura molecular da icaridina.

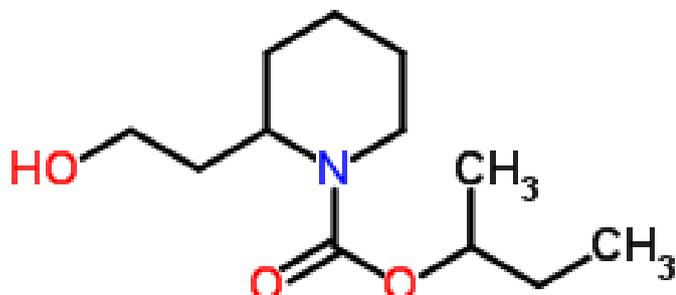


Figura 4: Estrutura da molécula de icaridina (RSC, 2015c)

A icaridina foi considerada como tendo um grau de toxicidade baixo considerando o contato com a pele, ingestão por via oral e inalação do produto mas apresentando alguma reação de irritação associado ao contato com olhos e mucosa bucal (US EPA, 2005). Antwi et al. realizou um estudo em que compara a toxicidade da icaridina (referida como *picaridin*) e do DEET em que conclui que ambos os produtos, mesmo colocados em superdosagens em contato com voluntários, não excederam os níveis de segurança estabelecidos pela agência canadense de vigilância sanitária (ANTWI; SHAMA; PETERSON, 2008).

1.2.1.3 Críticas aos protocolos de teste para a verificação da eficácia de repelentes de insetos

Metodologias para testes de repelentes de insetos normalmente envolvem bioensaios contando com a exposição de voluntários humanos a diversos artrópodes em ambientes controlados ou não (BARNARD, 2005; LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013). Barnard fez uma revisão dos principais protocolos de teste em uso atualmente (BARNARD, 2005).

O primeiro protocolo trazido por Barnard, é definido pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM) através da norma ASTM E951-94 (BARNARD, 2005). Uma proposta alternativa a esta foi realizada por Klun e Debboun (KLUN; DEBBOUN, 2000). Neste experimento, receptáculos contendo mosquitos *A. aegypti* fêmeas [somente mosquitos fêmeas são hematófagos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994)], que podem ser substituído por outras espécies, são colocados sobre o braço de voluntários (o módulo de Klun e Debboun é preferencialmente utilizado nas pernas) e são realizadas medições de tempo relativas a

quantidade e instante em que os insetos pousam sobre a pele e quando picam. Barnard levanta críticas sobre a possibilidade de confusão na observação dos resultados devido a efeitos de borda conforme descritos por Southwood e Henderson *apud* (BARNARD, 2005) e também pela dificuldade em comparar-se os efeitos dos repelentes em pessoas diferentes dado que existe grande variação no comportamento de voluntário para voluntário (BARNARD, 2005).

Outro protocolo avaliado é o recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (OMS, 2009). Neste método, largamente utilizado, uma proteção (como uma luva de borracha, por exemplo) é colocada de forma a manter uma área determinada da pele exposta. Sobre esta área são aplicadas soluções do princípio ativo repelente ou DEET (utilizado como controle positivo) ou também etanol (controle negativo). O braço com o tratamento é introduzido em uma gaiola com número determinado de mosquitos, preferencialmente *A. aegypti* fêmeas e o número de mosquitos que picam o braço em um intervalo de 5 minutos é registrado busca-se, assim, neste método, determinar o tempo até a primeira picada confirmada (correspondente ao instante em que o indivíduo é picado pela segunda vez) e calcular o tempo de proteção completa. Este protocolo é criticado, pois ao calcular o tempo de proteção completa observa-se o extremo superior da tolerância aos repelentes ao invés de uma resposta média (BARNARD, 2005). Curtis *apud* Barnard (BARNARD, 2005) também critica a confusão feita entre variação da atividade do repelente com a taxa de volatilização de repelente da pele.

1.2.2 Protetores solares

Protetores solares são produtos desenvolvidos para minimizar a incidência da radiação solar na pele, protegendo as células viáveis da pele contra os efeitos potencialmente nocivos da radiação solar como queimaduras de sol e principalmente câncer de pele (SCHALKA; REIS, 2011). Estes efeitos nocivos da radiação solar são predominantemente causados pela faixa espectral correspondente ao ultravioleta nas faixas UVA, correspondentes a comprimentos de onda de 320 a 400 nm e UVB, correspondendo a faixa de 290 e 320 nm (DUTRA et al., 2004). Há ainda a faixa de radiação UVC que, apesar do potencial carcinogênico, não é discutida uma vez que esta é filtrada pela atmosfera antes de chegar até o solo (DUTRA et al., 2004).

Protetores solares funcionam a partir de mecanismos de reflexão da radiação solar através de princípios ativos de ação física, principalmente formados por óxidos metálicos, e

pela absorção da radiação ultravioleta através de princípios ativos denominados filtros solares de ação química (SCHALKA; REIS, 2011).

Diversos autores apontam que o uso correto de protetores solares como meio de proteger a pele da agressão causada pela radiação solar é um meio seguro para evitar os riscos associados a essa radiação (BAUMANN, 2008; BERTH - JONES, 2016). Também é destacado que, idealmente, os protetores solares devem garantir uma cobertura adequada, que proteja a pele da radiação ultravioleta, mas que também seja cosmeticamente aceitável e agradável ao uso (BERTH - JONES, 2016). Também deve promover uma proteção durável, considerando o uso padrão que envolve atividades físicas com o contato com água ou com atividades esportivas (pelo suor) ou mesmo através da natação (BERTH - JONES, 2016).

1.2.2.1 Riscos à saúde provocados pela radiação solar e mecanismos de proteção dos protetores solares

A exposição à radiação ultravioleta proveniente do sol é causa direta de câncer de pele, além de contribuir para o envelhecimento precoce da pele, formação de rugas e pigmentação irregular (BAUMANN, 2008; HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002). A ação da luz sobre a pele varia conforme a frequência de radiação UV a qual a pele é exposta, A Tabela 2 traz a relação entre os riscos à saúde causados pela radiação e a faixa do espectro UV associada a esse risco.

Tabela 2: Relação entre os riscos a saúde da pele e frequência de radiação UV associada (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002)

Risco a saúde da pele	Radiação associada
Queimadura	UVB
Alteração da pigmentação	UVA e UVB
Câncer de pele	UVA, UVB e UVC*
Envelhecimento da pele	UVA e UVB

(*) não incide sobre a superfície da Terra com intensidade relevante

Os protetores solares podem ser classificados em duas categorias: protetores físicos e protetores químicos (BERTH - JONES, 2016; SCHALKA; REIS, 2011). Apesar de existir essa classificação, os fabricantes buscam desenvolver produtos que sejam cosmeticamente

aceitáveis e agradáveis ao uso, o que acaba levando ao desenvolvimento de soluções que conjuguem princípios ativos de ambas as categorias supracitadas (BERTH - JONES, 2016).

Os princípios ativos caracterizados como de ação física são, basicamente, produtos baseados em óxidos metálicos que realizam a fotoproteção através de um mecanismo de reflexão da radiação UV principalmente (SCHALKKA; REIS, 2011). Pela sua ação simples e eficaz esse tipo de protetor foi muito utilizado no passado mas, devido ao seu aspecto quando aplicado a pele (esbranquiçado), houve a tendência de preferir-se a utilização de protetores solares químicos (MORE, 2007). Com o advento de filtros solares micronizados de ação física, que são praticamente invisíveis quando aplicados, esse tipo de princípio ativo voltou a ser utilizado em conjunto com filtros solares de ação química (MORE, 2007).

Os filtros solares de ação física contendo óxidos metálicos micronizados podem ser erroneamente considerados como inertes na pele uma vez que não haveriam reações no nível químico (WOLF et al., 2003). No entanto, o mecanismo de funcionamento destes protetores solares de ação física envolve também a excitação dos óxidos metálicos em níveis energéticos mais altos e subsequente liberação da energia na forma de ondas de comprimento mais longo (MORE, 2007), o que poderia justificar algumas das críticas feitas aos filtros solares de forma geral; mas, de fato, estes óxidos acabam não sendo absorvidos pela pele e, dessa maneira não passam pelo estrato córneo, sendo por esse motivo, considerados seguros (WOLF et al., 2003).

Os filtros solares de ação química funcionam a partir da reação entre a molécula do princípio ativo químico e o fóton incidente, que é absorvido pela molécula e que passa a um estado excitado. Quando esta molécula retorna ao seu estado fundamental, a energia absorvida é liberada na forma de uma onda de comprimento mais longo, tanto na forma de fluorescência como na forma de calor (SCHALKKA; REIS, 2011). Há autores que, no entanto, veem com preocupação esse mecanismo uma vez que essa mecânica é suscetível a geração de radicais livres potencialmente prejudiciais à pele (WOLF et al., 2003).

1.2.2.2 Princípios ativos para proteção contra radiação solar

Protetores solares utilizam princípios ativos que agem por mecanismos físicos e químicos para realizar a proteção contra a radiação solar UVA ou UVB. A ANVISA aprovou até o momento 16 substâncias como filtros solares disponíveis para uso como fotoprotetores (SCHALKKA; REIS, 2011). Nesta seção serão comentados os princípios ativos presentes nos produtos estudados. A nomenclatura utilizada segue a nomenclatura INCI seguida por uma

denominação de uso mais comum (caso a nomenclatura INCI não seja a de uso mais comum) entre parênteses:

- ethylhexyl methoxycinnamate (octinoxate);
- benzophenone-3;
- octocrylene;
- butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzone).

Deve-se considerar ainda que, de forma geral, os estudos realizados indicam que os filtros químicos, em graus variados, são absorvidos pela pele, circulando no organismo pela corrente sanguínea, causando diferentes reações sistêmicas, e que têm a característica de acumular-se no organismo a partir de sua lipofilicidade (RUSZKIEWICZ et al., 2017).

O octinoxate (nomenclatura INCI: ethylhexyl methoxycinnamate, nomenclatura IUPAC: (*RS*)-2-ethylhexyl (*2E*)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-enoate), é parte de uma família de filtros solares denominadas como cinamatos (BAUMANN, 2008). É uma molécula orgânica capaz de absorver radiação solar na faixa UVB (BERTH - JONES, 2016) e é caracterizada pela baixa solubilidade em água, o que acaba colaborando para sua utilização em protetores solares com propriedade de resistência a água (BAUMANN, 2008). A Figura 5 mostra a estrutura molecular do octinoxate.

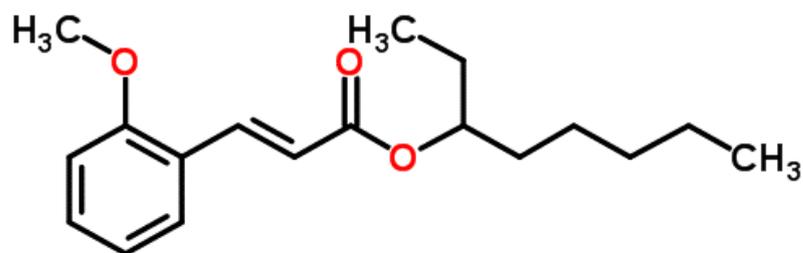


Figura 5: Estrutura da molécula de octinoxate (RSC, 2015d)

Diversos estudos indicam que esse princípio ativo interage com o sistema endócrino, produzindo efeitos disruptivos em hormônios nos sistemas reprodutivo e nervoso (RUSZKIEWICZ et al., 2017).

O benzophenone-3 (nomenclatura INCI: benzophenone-3, nomenclatura IUPAC: (2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-phenylmethanone), também conhecido como BP-3 ou oxybenzone, é parte da família de filtro solares denominada benzofenonas (BAUMANN,

2008). É um filtro solar de amplo espectro pois age tanto na faixa UVA como UVB (BERTH - JONES, 2016). É considerado como um dos melhores filtros UVA, especialmente para comprimentos de onda mais curtos (BAUMANN, 2008). A Figura 6 mostra a estrutura molecular do benzophenone-3.

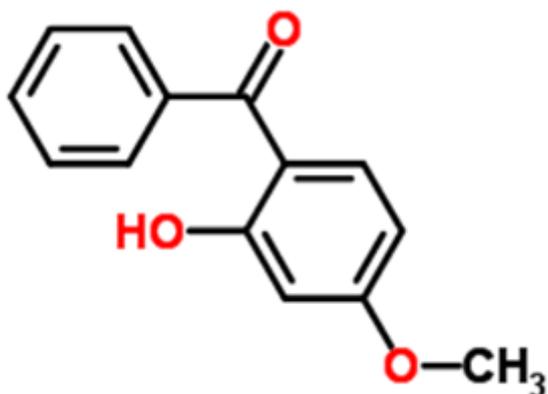


Figura 6: Estrutura da molécula de benzophenone-3 (RSC, 2015e)

Estudos realizados a partir de observações clínicas em humanos indicam que o benzophenone-3 é um princípio ativo que facilmente é absorvido pelo organismo, sendo que o uso com repelentes de insetos baseados em DEET aumenta a sua penetração. Uma vez absorvido, esse princípio ativo vai para a corrente sanguínea (RUSZKIEWICZ et al., 2017). Estudos com animais, especialmente peixes, indicam que este princípio ativo pode agir no nível dos hormônios que agem no sistema nervoso (RUSZKIEWICZ et al., 2017). Existem casos comprovados de dermatite de contato provocadas pelo benzophenone-3, não sendo este princípio ativo recomendado para uso em crianças (BAUMANN, 2008).

O octocrylene (nomenclatura INCI: octocrylene, nomenclatura IUPAC: 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenyl-2-propenoate) é um princípio ativo, parte da família dos cinamatos (RUSZKIEWICZ et al., 2017) que está presente em protetores solares. Sua ação como filtro é na faixa UVB (BERTH - JONES, 2016) e, como outros representantes desta família, caracterizada por ser hidrofóbica também é utilizada em formulações com característica de resistência a água (BAUMANN, 2008). A Figura 7 mostra a estrutura molecular do octocrylene.

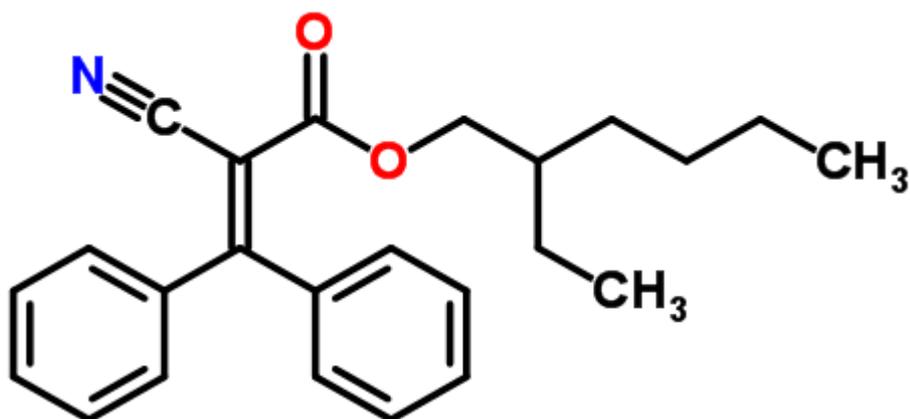


Figura 7: Estrutura da molécula de octocrylene (RSC, 2015f)

O octocrylene é considerado um princípio ativo de eficácia limitada e usualmente combinado com outros princípios ativos. Os estudos encontrados não foram capazes de indicar reações adversas ao uso do octocrylene em humanos, mas apontaram para acumulação sistêmica em animais (RUSZKIEWICZ et al., 2017). Estudos relacionados a reações alérgicas do produto indicaram que os casos reportados na realidade estavam associados a outros princípios ativos utilizados em conjunto nas formulações disponíveis, sendo citado que a substância acaba agindo como agente fotoestabilizador do avobenzone que é um dos melhores agentes para proteção contra raios UVA disponíveis no mercado (DE GROOT; ROBERTS, 2014).

O avobenzone (nomenclatura INCI: butyl methoxydibenzoylmethane, nomenclatura IUPAC: 1-(4-methoxyphenyl)-3-(4-*tert*-butylphenyl)propane-1,3-dione), é atualmente um dos filtros solares UVA mais utilizados no mercado (BAUMANN, 2008; BERTH - JONES, 2016). Sua comercialização no início foi caracterizada por problemas de fotoestabilidade, mas a partir da combinação com outras substâncias como o octocrylene, esta característica foi melhorada (BAUMANN, 2008; DE GROOT; ROBERTS, 2014). A Figura 8 mostra a estrutura molecular do avobenzone.

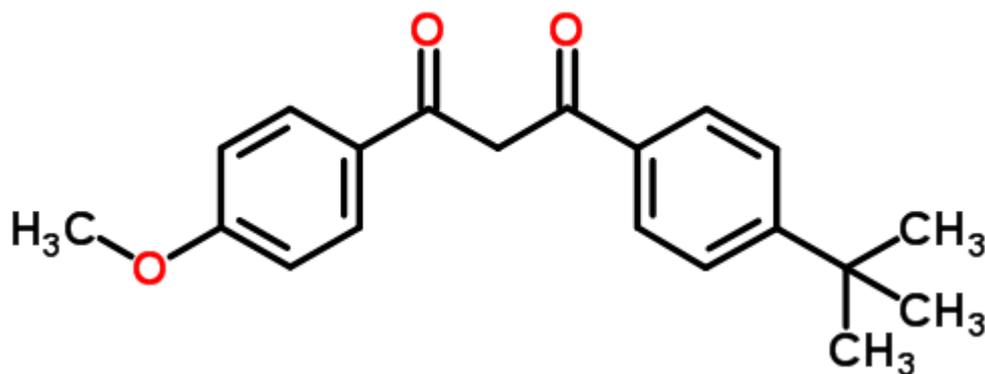


Figura 8: Estrutura da molécula de avobenzona (RSC, 2015g)

Estudos criticaram a fotoinstabilidade do avobenzona indicando que a exposição ao sol promoveria a produção de compostos benzílicos e arilglioxais que estão associados a potencial ação fotoalérgica, além do avobenzona perder até 60% das suas propriedades fotoprotetivas (GILBERT et al., 2013).

1.2.2.3 Meios para medir-se o grau de proteção contra a radiação solar: fator de proteção solar (FPS) e fator de proteção UVA (UVAPF)

O FPS pode ser definido como o valor numérico da razão entre a dose eritematosa mínima (DEM) da pele protegida por um protetor solar em teste, considerando uma cobertura de 2,0 mg/cm² e a DEM da pele não protegida (SCHALKA; REIS, 2011). Esta definição é expressa pela equação a seguir:

$$FPS = \frac{DEM_{pele\ protegida}}{DEM_{pele\ não\ protegida}}$$

Os protocolos para determinação do FPS foram inicialmente desenvolvidos pela FDA (EUA em 1978) sendo acompanhados por outros países como a Alemanha, que, a partir desta base, elaboraram métodos próprios (SCHALKA; REIS, 2011).

Em 2003, foi proposto o *International Sun Protection Factor Test Method* (ISPF), por representantes da Europa, Japão e África do Sul, baseado em metodologia europeia desenvolvida pela COLIPA (associação europeia de indústrias cosméticas) (MODDARESI, 2017). Atualmente a metodologia norte-americana (US FDA) e internacional (ISPF, mas comumente referenciada como COLIPA) são consideradas o padrão para determinação do FPS (SCHALKA; REIS, 2011). Os métodos apresentam diferenças metodológicas mas que,

de modo geral, retornam resultados semelhantes e de significado equivalente (SCHALKA; REIS, 2011).

Em linhas gerais, a metodologia retém a essência do primeiro padrão de 1978, no qual um grupo de voluntários com peles de fototipo entre I e III (FITZPATRICK, 1988) recebe doses incrementais de radiação UV emitida por uma fonte artificial, em áreas protegidas com o protetor solar em teste ($2,0 \text{ mg/cm}^2$ de produto) e áreas sem protetor (controle) (SCHALKA; REIS, 2011). A Figura 9 ilustra as etapas do teste para determinação do FPS a partir da avaliação da DEM.

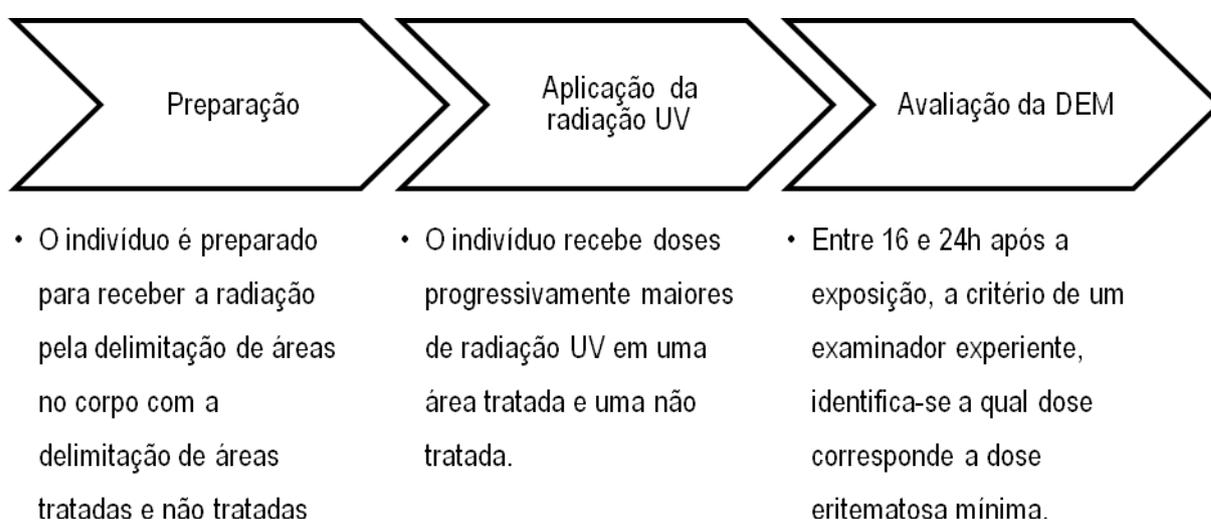


Figura 9: Esquema mostrando o fluxo de atividades utilizados na avaliação da DEM

A metodologia para determinação do FPS adotada pelo US FDA e COLIPA conforme apresentado na seção anterior não é capaz de determinar a proteção contra os raios UVA dada por estes produtos (ZASTROW et al., 2004).

A primeira metodologia empregada para determinar a ação dos raios UVA foi a PPD, desenvolvida pela indústria japonesa e adaptada pela autoridade francesa de vigilância sanitária (MODDARESI, 2017). Este protocolo era similar ao protocolo para determinação do FPS mas buscava identificar a dose mínima para a produção de pigmentação persistente, resultado da ação dos raios UVA (BAUMANN, 2008).

Atualmente há duas normas da *International Organization for Standardization* (ISO) referentes ao teste de protetores solares: a EN ISO 24444:2010, relacionada ao teste *in vivo* do FPS e que substituiu a norma desenvolvida pela COLIPA, e a EN ISO 24442:2011, que

substituiu a norma adotada pela autoridade francesa e traz a metodologia atual para determinação do PPD (MODDARESI, 2017).

1.2.2.4 Críticas aos métodos aplicados à medição da proteção solar

Sobre esta metodologia, Shalka e Reis fazem críticas sobre a quantidade de protetor solar utilizada no teste, considerada excessiva tomando em conta o padrão de utilização da população em geral e a dificuldade de verificar-se a DEM com repetibilidade (SCHALKKA; REIS, 2011). Zastrow et al. complementa a crítica ao destacar que a metodologia empregada para determinação do FPS não traz informação sobre a proteção contra a radiação ultravioleta na faixa UVA (ZASTROW et al., 2004).

Como complemento às críticas da metodologia em si, o próprio valor do FPS é passível de questionamento. Wolf et al. destaca que a diferença entre um produto com FPS 30 e outro com FPS 40, em termos da capacidade de bloquear radiação ultravioleta, é da ordem de apenas 1% (WOLF et al., 2003). Na mesma linha, Shalka e Reis coloca que o FPS apenas indica proteção contra queimaduras, não sendo possível fazer qualquer afirmação acerca da proteção efetiva que este produz com respeito a, por exemplo, câncer de pele (SCHALKKA; REIS, 2011).

Sobre a determinação do fator de proteção UVAFP também são formuladas críticas. Rezende et al. levanta que na determinação do UVAFP a partir do PPD procura-se avaliar um efeito (PPD) em que se necessita de 18 a 24 h de exposição à radiação, enquanto que para o aparecimento da DEM esse tempo é de 2 a 4 h (REZENDE et al., 2014). Isso faz com que a potência de radiação UVA utilizada no teste seja aumentada o que acaba sendo uma distorção do método com respeito a situação que se pretende simular. É neste sentido que diversos autores propõem e apontam que no futuro a avaliação de eficácia para proteção solar deve ser realizada *in vitro* (REZENDE et al., 2014).

Na indústria, o controle de qualidade dos protetores solares utiliza técnicas variadas e concentra-se na identificação dos princípios ativos e dos aditivos utilizados nos produtos. São exemplos de técnicas em uso: espectroscopia de massa (GROSS, 2014), espectroscopia no infravermelho próximo (LUYPAERT; MASSART; VANDER HEYDEN, 2007) e determinação eletroanalítica de substâncias (JÚNIOR et al., 2011).

1.3 Espectroscopia Raman

1.3.1 Efeito Raman

Em 1928, pesquisadores da Índia e da Rússia, entre eles C. V. Raman (que acabaria sendo homenageado pela denominação do efeito descrito), trouxeram o conhecimento de que, a partir da incidência de um feixe de luz monocromática em um material, poderia ocorrer espalhamento de dois tipos:

- Espalhamento de natureza elástica: neste caso o fóton espalhado tem frequência correspondente a frequência do feixe de luz incidente, conhecido como espalhamento Rayleigh;
- Espalhamento de natureza inelástica: neste caso o fóton espalhado tem frequência diferente da frequência do feixe de luz incidente.

Este efeito é conhecido como efeito Raman, e o espalhamento resultante corresponde ao espalhamento Raman (HANLON et al., 2000; JAMES J. BOHNING; T. N. MISRA; M. CHOUDHURY, 1998).

O espalhamento de natureza inelástica tem sua frequência determinada a partir da interação entre a fonte luminosa e o meio sobre o qual incide o raio luminoso. É possível observar que a diferença da frequência da radiação espalhada, modificada após a incidência da luz, é dependente do material do meio sobre o qual incidiu a radiação luminosa (SMITH; DENT, 2013). Assim, diferentemente do espalhamento Rayleigh, no espalhamento Raman esta interação entre a fonte luminosa e o meio produz informação sobre a estrutura molecular, conseqüentemente a composição, deste meio. Esta informação sobre a estrutura molecular pode ser captada como um espectro, que fornece uma “impressão digital” do material em análise (HANLON et al., 2000; SMITH; DENT, 2013). A Figura 10 compara a ação dos espalhamentos Rayleigh e Raman em função da radiação incidente na molécula e ilustra como o espalhamento Raman é expresso no espectro Raman.

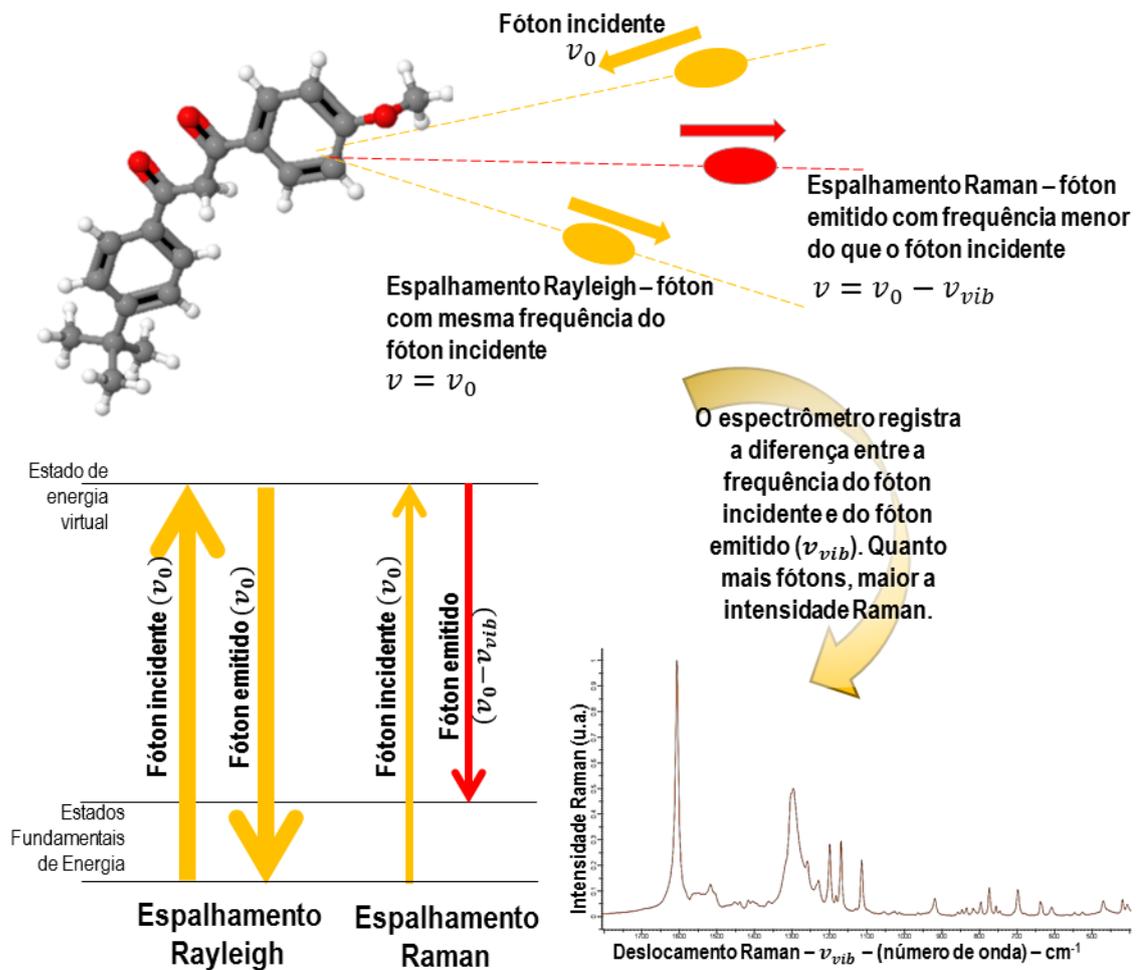


Figura 10: Figura esquemática mostrando o efeito Raman e como o espalhamento Raman repercute no espectro coletado; no esquema as setas ascendentes que vão do estado de energia fundamental ao estado de energia virtual correspondem à energia absorvida pela incidência do fóton e as setas descendentes correspondem à liberação de energia decorrente da emissão do fóton espalhado

As interações, entre a luz incidente e o material que produzem o efeito Raman, têm como resultado um espalhamento cuja frequência é função da composição estrutural da molécula. Assim, quando o feixe de luz monocromática do laser interage com o material, este produzirá uma diversidade de bandas com picos correspondentes aos níveis de energia vibracional que o material, pela sua estrutura molecular, possui, e que, em conjunto, formam o espectro Raman. Assim, um espectro Raman é a representação da intensidade da radiação espalhada Raman (em unidades arbitrárias – u.a.) em relação ao deslocamento Raman, ou à diferença da energia da vibração molecular (em cm^{-1}) com relação à frequência da luz incidente (SMITH; DENT, 2013).

Como já dito, o espectro Raman é como uma “impressão digital” da molécula analisada. Pelo espectro Raman identificam-se:

- diferenças nas proporções entre elementos de uma molécula;
- diferenças nas estruturas moleculares espaciais;
- diferenças entre fases cristalinas.

Devido a isso, o espectro vibracional Raman é único para cada material. Esta representação permite visualizar bandas espectrais (denominadas bandas Raman) centradas nas frequências Raman características de cada material. Em um espectro Raman a informação é principalmente sobre a posição de cada uma das bandas que identificam inequivocamente o material em análise (HANLON et al., 2000).

1.3.2 Aplicação da espectroscopia Raman a materiais orgânicos

A espectroscopia Raman encontra seu uso em áreas tão diversas como biomedicina, ciências ambientais, geologia, exploração espacial, arqueologia e arte, entre muitas outras (CIOBOTĂ et al., 2014; JAMES J. BOHNING; T. N. MISRA; M. CHOUDHURY, 1998; KUSIĆ et al., 2014; SMITH; DENT, 2013; VANDENABEELE; EDWARDS; MOENS, 2007; VASILIU et al., 2014).

Para a análise necessária ao presente trabalho, ou seja, a identificação de diferentes agentes químicos na pele, a espectroscopia Raman faz uso da discriminação realizada entre os diferentes materiais quanto à sua estrutura química (SMITH; DENT, 2013).

Normalmente, a identificação de um material pela espectroscopia Raman baseia-se na comparação do espectro Raman com um conjunto de espectros Raman de referência previamente armazenados. Essa metodologia, embora seja simples e intuitiva, pode ser um processo longo e pode ter implícito o raciocínio subjetivo baseado na experiência do analista (SMITH; DENT, 2013). Além disso, pode ser uma tarefa trabalhosa, que requer um observador experiente, que, em sua experiência e conhecimento, realize a comparação e, portanto, a identificação.

1.3.3 Pré-processamento do espectro Raman

1.3.3.1 Remoção de *outliers*

A identificação de pontos do espectro que podem ser *outliers*, isto é, pontos destacados do espectro porém originados de erros de leitura do equipamento, como por exemplo a incidência de raios cósmicos, é uma etapa fundamental para a obtenção de um espectro fiel à realidade. Para alcançar este objetivo, são necessários meios, não somente para identificá-los, mas também eliminá-los. Pontos marginais, com erros sistemáticos grandes, podem ser diretamente eliminadas, mas, aqueles em que o erro é aleatório podem ser retidos durante o ajuste do espectro.

A identificação de um *outlier* pode envolver aspectos subjetivos de julgamento uma vez que não existem definições matemáticas rígidas que indiquem se um ponto pertence ou não aos dados (LASCH, 2012). Na maior parte das vezes os pontos mais extremos são *outliers*, mas é preciso ter atenção para que não sejam eliminados os pontos que realmente pertencem à amostra, tais como picos bem intensos e de largura de banda bem estreita.

Como uma regra geral, toma-se cada valor de deslocamento Raman de um conjunto de espectros como um vetor com as intensidades de todos espectros em estudo. Para cada um destes vetores, a intensidade Raman do *outlier* corresponderá a um valor que difere em mais do que três vezes o desvio padrão da média das intensidades dos respectivos deslocamentos Raman.

1.3.3.2 Correção da linha de base

A espectroscopia Raman aplicada em tecidos e materiais orgânicos tem como desafio a fluorescência inerentemente produzida por diversas moléculas biológicas. Esta fluorescência pode ter intensidade diversas ordens de grandeza maior que o fraco sinal do espalhamento Raman. Uma estratégia para a redução da fluorescência de fundo (*background*) é o uso de excitação Raman na região do infravermelho próximo.

Devido à grande quantidade de dados envolvidos na coleta de espectros Raman, é necessária a adoção de um algoritmo de correção de linha de base automatizado (linha de base esta decorrente da fluorescência). Neste trabalho, a correção de linha de base foi realizada a partir do ajuste do espectro por um polinômio de ordem “n” (LIEBER; MAHADEVAN-JANSEN, 2003). Para cada espectro, o procedimento a seguir é aplicado, sendo o espectro

Raman caracterizado por uma função $y \rightarrow$ intensidade do sinal coletado pelo espectrômetro e $x \rightarrow$ deslocamento Raman:

- elimina-se a região do espectro com informação não útil (faixa espectral útil: entre 400 e 1800 cm^{-1});
- ajusta um polinômio de ordem definida (“n”) ao espectro ($y = f(x)$, sendo $f(x)$ a função polinomial de ordem “n”);
- calcula o valor da intensidade do polinômio (valor de y estimado pelo polinômio) para cada valor de deslocamento Raman (x);
- subtrai o valor de y do polinômio do valor de y do espectro.

O espectro corrigido pela linha de base é obtido a partir da subtração a do polinômio resultante do espectro a ser corrigido. A ordem utilizada para o polinômio é um parâmetro definido empiricamente para que ocorra um bom ajuste visual do espectro. A correção por ajuste do espectro a um polinômio tem como vantagens a retenção dos contornos espectrais Raman, evitando a perda de informação dada pelos contornos que não chegam a caracterizar-se como picos (linhas larga que em geral decorrem de emissão fluorescente), e a retenção da proporção entre os valores de intensidade dos picos presentes no espectro original (LIEBER; MAHADEVAN-JANSEN, 2003).

1.3.3.3 Normalização

A normalização é um método de pré-processamento no qual os valores são escalonados para a manutenção da consistência entre espectros tomados em diferentes condições experimentais (tempo de coleta, fluorescência de *background*, potência do laser, amostras, etc.). Frequentemente é utilizada como um dos passos do pré-processamento para uma biblioteca de identificação qualitativa (BOCKLITZ et al., 2011).

Espectros padrões de elementos com diferentes concentrações ou composições podem ser gerados para confirmar a posição dos picos Raman, bem como sua intensidade em avaliações quantitativas. A altura do pico pode ser usada para determinar a concentração de substâncias, dado que a concentração do material é proporcional à intensidade do pico Raman relacionado a este material (THE EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE, 2016).

Existem diversos métodos de normalização. A seguir são apresentados dois dos mais utilizados: normalização por máximo (pico de maior intensidade) e normalização por área sob

a curva. Para o método de normalização pelo pico de maior intensidade, o valor de intensidade máxima de cada espectro é identificado e então cada ponto do espectro é dividido por esse valor máximo, conforme a equação a seguir:

$$NY_i = \frac{y_i}{\max(\vec{y})}$$

onde NY_i é a intensidade Raman normalizada para o ponto i , y_i , é a intensidade Raman para o ponto i e $\max(\vec{y})$ é o valor máximo considerando todas as intensidades Raman do espectro.

Na normalização pela área sob a curva (também conhecida como normalização *L¹-norm*), primeiramente é feita a centralização dos dados pela média, e em seguida, o escalonamento das intensidades do espectro é feito de modo que a soma dos valores absolutos seja igual a 1 (LASCH, 2012). Isso pode ser expresso conforme a equação abaixo:

$$NY_i = \frac{y_i}{\sum \vec{y}}$$

onde NY_i é a intensidade Raman normalizada para o ponto i , y_i , é a intensidade Raman para o ponto i e $\sum \vec{y}$ é a soma das intensidades Raman do espectro.

1.3.4 Potencial da espectroscopia Raman como método de avaliação de produtos de uso tópico

O uso de voluntários humanos para a avaliação de cosméticos de uso tópico é problemático pelas questões éticas tratadas por Sardenberg (SARDENBERG, 1999) e pelas dificuldades que este tipo de estudo acaba impondo. Estas dificuldades podem ser resumidas como:

- as variações existentes entre os voluntários, que resultam em dificuldades como a repetibilidade dos resultados;
- dificuldade em reproduzir as situações de uso comum em laboratório.

Como consequência, estas dificuldades podem implicar em um teste que sofre críticas por não ser suficientemente representativo. Como exemplo destas críticas pode ser citada a determinação do FPS pela determinação do DEM *in vivo*, na qual os resultados da

metodologia, conforme criticado por alguns autores citados neste estudo (SCHALKA; REIS, 2011; WOLF et al., 2003), tem pontos de crítica sobre a validade da aplicação dos seus resultados. Rezende et al. (REZENDE et al., 2014) coloca que, no sentido de evitar estas dificuldades, existe a tendência de que a determinação dos fatores de proteção solar (UVA e UVB) passem a ser realizados a partir de testes *in vitro*, tendo sido propostas novas metodologias para avaliação da eficácia de protetores solares *in vitro* (DUTRA et al., 2004; ZASTROW et al., 2004). Também já foi desenvolvida uma norma que aborda a realização de testes *in vitro* para determinação do UVAFP (EN ISO 24443:2012).

A espectroscopia Raman, com suas características de avaliação *in vivo* de maneira rápida (HANLON et al., 2000), pode ser útil no sentido de associar-se às técnicas em uso pela indústria para determinar a eficácia dos princípios ativos presentes nas formulações em teste. Isso pode acontecer pela avaliação da contínua disponibilidade das moléculas em estudo nas formulações aplicadas à pele. Esta abordagem seria útil não somente para protetores solares e repelentes de insetos, mas também outros produtos cosméticos ou farmacêuticos como hidratantes, antibióticos de ação tópica, etc. Uma proposta de como isso poderia acontecer pode ser observada no esquema apresentado na Figura 11.

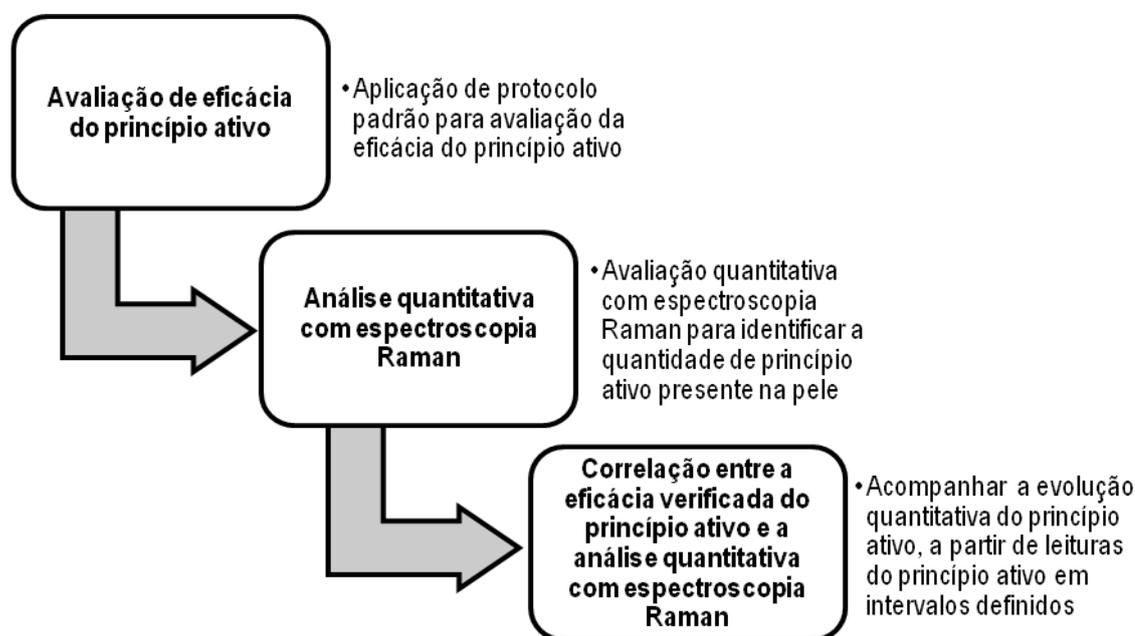


Figura 11: Esquema mostrando como a espectroscopia Raman poderia ser agregada na avaliação de produtos de uso tópico

A capacidade de avaliação quantitativa da espectroscopia Raman pode ser utilizada para medir a quantidade de princípio ativo presente na pele em um determinado momento e,

passado algum tempo, medir novamente a quantidade do princípio ativo e fazer uma correlação com a manutenção da sua eficácia.

CAPÍTULO 2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Sujeitos de pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi (Processo no. CAEE 69573917.9.0000.5492) conforme a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 2012). Os voluntários que concordaram em participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Participaram da pesquisa 15 voluntários (6 homens e 9 mulheres) para aplicação das formulações de repelentes e 14 voluntários (7 homens e 7 mulheres) para a aplicação das formulações de protetores solares. Estas pessoas apresentavam fototipo variando entre I e IV conforme a escala de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988), Tabela 3). Os critérios de inclusão foram: voluntários sadios, com idade entre 18 e 60 anos, sem lesões de pele, benignas ou malignas, e a ausência de reações alérgicas conhecidas a componentes dos produtos após anamnese. Os critérios de exclusão foram reações alérgicas aos produtos durante a realização do experimento e sensibilidade dolorosa à potência do laser.

Tabela 3: Escala de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988)

Fototipo	Descrição	Efeito
I	Pele clara	Sempre queima e nunca bronzeia
II	Pele clara	Sempre queima e bronzeia muito pouco
III	Pele morena clara	Queima (moderadamente) e bronzeia (moderadamente)
IV	Pele morena moderada	Queima pouco e sempre bronzeia
V	Pele morena escura	Queima raramente e sempre bronzeia
VI	Pele negra	Nunca queima já é totalmente pigmentada

2.2 Amostras

Foram utilizados no estudo repelentes de insetos comercialmente disponíveis, nas apresentações *spray* e creme (identificado como SPR e CR) e protetores solares de duas marcas comercialmente disponíveis (identificados com o CEN e SD), ambos com FPS 15 e

30. Os repelentes de insetos, utilizados no estudo possuíam composição química conforme Tabela 4 e os protetores solares conforme Tabela 5.

Tabela 4: Componentes dos repelentes de insetos considerados no estudo conforme informações do rótulo

Repelente – componentes**	Presença na fórmula	
	SPR	CR
DEET*	Sim (6,65%)	Sim (7,125%)
Aqua	Não	Sim
Polyacrylic acid	Não	Sim
Stearate-2	Não	Sim
Stearyl alcohol glyceryl stearate	Não	Sim
PEG-100 stearate	Não	Sim
Methylparaben	Não	Sim
Triethanolamine	Não	Sim
Parfum	Sim	Sim
<i>Aloe barbadensis</i> flower extract	Sim	Sim
Benzyl salicylate	Sim	Sim
Coumarin	Sim	Sim
Hydroxycitronellal	Sim	Sim
Limonene	Sim	Sim
Linalool	Sim	Sim
Butylphenyl methylpropional	Sim	Sim
Alcohol benzyl methylpropional	Não	Sim

(*) princípio ativo do produto

(**) os componentes indicados têm nomenclatura conforme a INCI

Tabela 5: Componentes dos protetores solares considerados no estudo conforme informações do rótulo

Protetor Solar – componentes**	Presença na fórmula ***	
	Marca CEN (FPS 15 e 30)	Marca SD (FPS 15 e 30)
Ethylhexyl methoxycinnamate*	Sim	Não
Benzophenone-3*	Sim	Não
Octocrylene*	Sim	Sim
Ethylhexyl triazone*	Não	Sim

Protetor Solar – componentes**	Presença na fórmula ***	
	Marca CEN (FPS 15 e 30)	Marca SD (FPS 15 e 30)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine*	Sim	Sim
Aqua	Sim	Sim
Titanium dioxide	Sim	Sim
Phenethyl benzoate	Sim	Não
Isocetyl stearyl stearate	Sim	Não
Glyceryl stearate	Sim	Não
Laureth-23	Sim	Não
Diisopropyl adipate	Sim	Não
Propylene glycol	Sim	Não
VP/Eicosene copolymer	Sim	Não
Cyclomethicone	Sim	Não
Trilaureth-4 phosphate	Sim	Não
Sodium polyacrylate	Sim	Não
Decarboxy carnosine HCl	Sim	Não
Laureth-2	Sim	Não
DMDM hydantoin	Sim	Não
Methylparaben	Sim	Não
Dimethicone	Sim	Sim
Tocopherol	Sim	Não
Iodopropynyl butylcarbamate	Sim	Não
Parfum	Sim	Sim
<i>Daucus carota</i> seed oil	Sim	Não
Disodium EDTA	Sim	Sim
2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol	Sim	Não
Hexyl cinnamal	Sim	Não
d-limonene	Sim	Não
Linalool	Sim	Não
C12-15 alkyl benzoate	Não	Sim
Butylene glycol	Não	Sim
Butyl methoxydibenzoylmethane*	Não	Sim
Potassium cetyl phosphate	Não	Sim
Triaccontanyl PVP	Não	Sim

Protetor Solar – componentes**	Presença na fórmula ***	
	Marca CEN (FPS 15 e 30)	Marca SD (FPS 15 e 30)
Aluminum starch octenylsuccinate	Não	Sim
Silica	Não	Sim
Benzyl alcohol	Não	Sim
Phenoxyethanol	Não	Sim
Triethanolamine	Não	Sim
Cetyl palmitate	Não	Sim
Tribehenin	Não	Sim
Stearyl alcohol	Não	Sim
Caprylyl methicone	Não	Sim
Carbomer	Não	Sim
Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	Não	Sim
Tocopheryl acetate	Não	Sim

(*) princípio ativo do produto

(**) os componentes indicados têm nomenclatura conforme a INCI

(***)A regulamentação da ANVISA sobre rotulagem de protetores solares não obriga ao fabricante a quantificar os princípios ativos (ANVISA, 2012)

2.3 Aplicação dos produtos

Inicialmente, tanto para a aplicação do repelente de insetos como para a aplicação do protetor solar, os locais em que ocorreria a aplicação foram higienizados com o auxílio de um tecido embebido em álcool 96 °GL para a remoção de contaminantes químicos e microbiológicos.

Para a aplicação dos repelentes de insetos, o indivíduo foi considerado em posição anatômica (BETTS et al., 2013), os produtos foram aplicados topicamente na região ântero-medial dos antebraços de cada indivíduo. A aplicação ocorreu em 2 marcações circulares com 25 mm de diâmetro, identificados conforme mostra a Figura 12 e uma terceira marcação que não recebeu produto (região de controle, identificada como CTR). O repelente de insetos em *spray* foi aplicado na região do antebraço direito de modo a evitar contaminação com as outras regiões e o repelente de insetos em creme foi aplicado na região localizada no antebraço esquerdo. A aplicação do repelente de insetos em *spray* foi feita diretamente na pele do indivíduo, através de uma única borrifada a uma distância de 15 cm da superfície da pele e

a aplicação do repelente de insetos em creme foi feita inicialmente medindo-se uma quantidade padronizada (10 mg) com auxílio de uma microespátula, e espalhando-se o produto pela área com esta mesma microespátula. No estudo foram usadas quantidades compatíveis com as instruções contidas nos rótulos dos produtos utilizados uma vez que as metodologias de teste recomendadas pela ANVISA não são baseadas na avaliação dos produtos, mas do princípio ativo diluído em etanol (OMS, 2009).

Os protetores solares, também considerando a posição anatômica, foram aplicados topicamente na região ântero-medial do antebraço direito de cada indivíduo. A aplicação ocorreu em 4 marcações circulares com 25 mm de diâmetro, identificados conforme mostra a Figura 12, e uma quinta marcação não recebeu produto (região de controle, identificada como CT). Nas regiões 1 e 2 foram aplicados os protetores solares da marca CEN com FPS 15 e 30, respectivamente, nas regiões 3 e 4 foram aplicados os protetores da marca SD com FPS 15 e 30, respectivamente. Nas regiões em que houve aplicação dos produtos, foi administrada com auxílio de uma microespátula uma quantidade padronizada e compatível com a recomendação da ANVISA para testes relacionados a determinação do FPS, que corresponde a uma cobertura de $2,0 \text{ mg/cm}^2$ (COLIPA; CTFA; JCIA, 2006), obtida através da aplicação de aproximadamente 10 mg de protetor solar.

A aplicação nestes locais procurou facilitar a descontaminação do local e evitar a presença de pelos que pudessem dificultar as leituras. Considerando que os produtos agem preferencialmente sobre o estrato córneo da pele, não é esperada diferença significativa em resultados tomados em outras porções do braço.

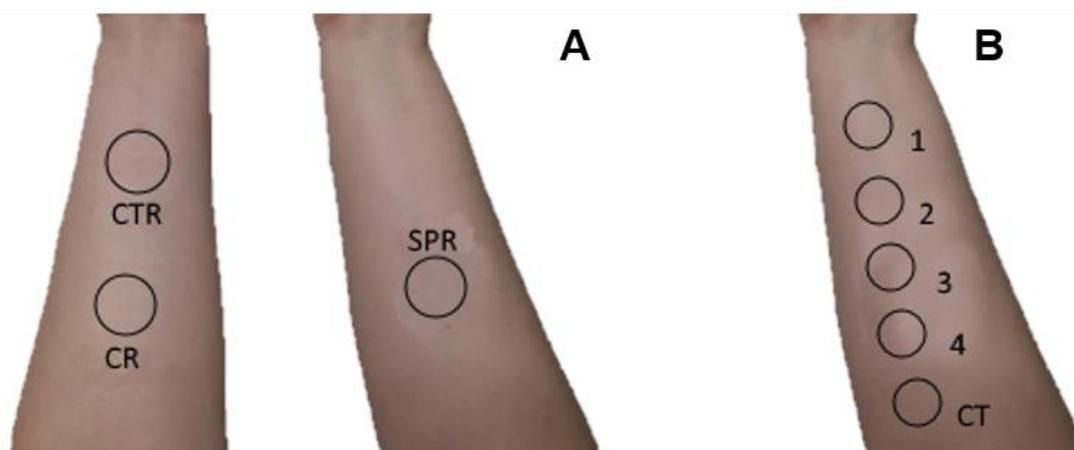


Figura 12: Marcações no antebraço dos voluntários para a aplicação dos produtos: A) aplicação dos repelentes e B) aplicação dos protetores solares

Ambos os produtos foram aplicados na pele dos voluntários, aguardando-se pelo menos 30 minutos antes da realização da coleta dos espectros Raman.

2.4 Obtenção dos espectros Raman

Primeiramente foram obtidos os espectros Raman dos produtos conforme comercialmente distribuídos, aplicando-se uma pequena porção diretamente do frasco sobre um porta-amostra em alumínio. Estes espectros foram identificados como: grupos REF_SPR e REF_CR para os repelentes *spray* e creme, e grupos REF_CEN15, REF_CEN30, REF_SD15 e REF_SD30 para os protetores solares das marcas CEN e SD, respectivamente, com FPS 15 e 30. Em seguida, foram obtidos os espectros referentes aos locais em que houve aplicação dos produtos na pele e das regiões de controle. Estes espectros foram agrupados nas respectivas regiões conforme a Tabela 6.

Foram obtidos espectros Raman em cada região utilizando um espectrômetro Raman dispersivo (modelo Dimension P-1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA), com cabo de fibras ópticas Raman *probe* (modelo Vector Probe, Lambda Solutions Inc., MA, EUA) mostrado na Figura 13. O espectrômetro utiliza um laser de diodo multimodo estabilizado, sintonizado em 830 nm, com potência máxima de 350 mW. A ponta do Raman *probe* foi colocado em contato com a pele, no momento da coleta dos dados, sendo utilizada uma ponteira cônica de alumínio a fim de padronizar a distância focal entre o *probe* e a pele. O uso do Raman *probe* permite repetibilidade da geometria de excitação e coleta do espectro. O ajuste do equipamento e metodologia para coleta seguiram detalhes adotados por Silveira et al. (SILVEIRA et al., 2015). Em cada região foram obtidos 3 espectros, sendo utilizado o tempo de leitura de 20 s (2s, 10 acumulações) e potência do laser de 250 mW na extremidade do *probe*.

Tabela 6: Regiões de aplicação dos produtos, número de coletas espectrais e nomenclatura dos agrupamentos na pele dos voluntários

Região de Aplicação	Número de coletas	Grupo
Repelente de Insetos	<i>Spray</i>	42
	creme	39
	CT	43
Protetor Solar	1	42
	2	37
	3	33
	4	30
	CT	42

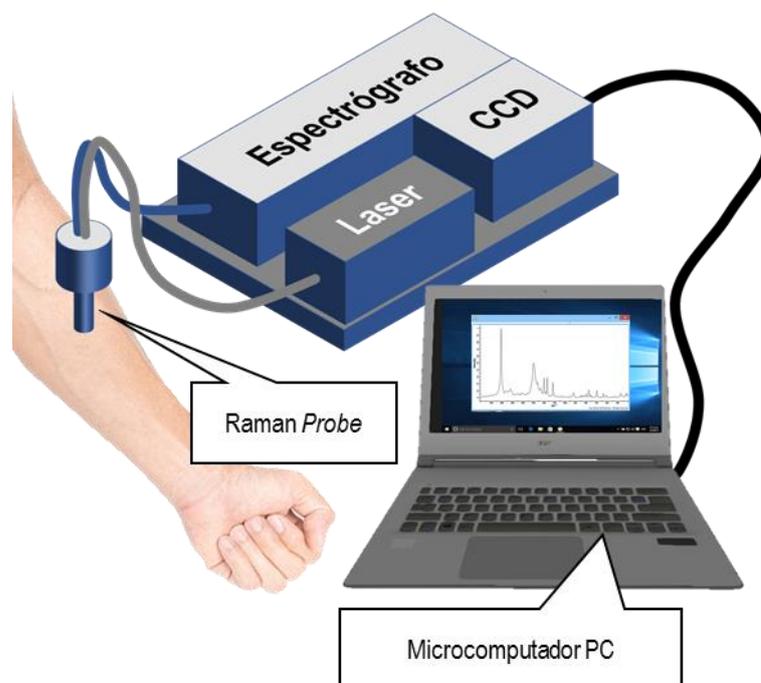


Figura 13: Diagrama esquemático do sistema Raman dispersivo que foi utilizado na coleta dos dados espectrais

A luz espalhada pela amostra é coletada pelo *probe*, dispersada pelo espectrógrafo e direcionada ao detector tipo câmera CCD (*charge-coupled device*) (câmera CCD *back thinned, deep-depletion*, 1340×100 pixels, refrigerada por elemento Peltier) com temperatura de trabalho de -75 °C. O elemento dispersor de luz, integrado ao espectrômetro, possui resolução de 4 cm⁻¹ na faixa espectral útil compreendida entre 400 e 1800 cm⁻¹.

A aquisição e o armazenamento dos espectros são realizados por um microcomputador PC utilizando o software RamanSoft (Lambda Solutions, Inc., MA, EUA), que controla o tempo de exposição do detector e o número de aquisições por amostra, e o armazenamento dos espectros para posterior análise e interpretação. O tempo de exposição para a obtenção dos espectros foi de 2 s e 10 acumulações.

A calibração do espectrômetro foi verificada por comparação das bandas Raman principais do naftaleno, que possui picos na região espectral de 500 a 1700 cm^{-1} . A calibração da resposta espectral (calibração em intensidade) foi realizada pelo fornecedor do equipamento e consiste na coleta do espectro de uma lâmpada de filamento de tungstênio com espectro rastreado pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

2.5 Pré-processamento dos espectros e análise estatística

Os espectros Raman provenientes dos produtos aplicados sobre o porta amostra e sobre a pele foram pré-processados em conjunto e da mesma maneira conforme detalhado por Silveira et al. (SILVEIRA et al., 2015). Primeiramente foram retirados os raios cósmicos a partir da identificação de pontos com alta intensidade e que não são característicos de picos, foi feita a retirada da fluorescência de fundo (*background*) a partir do ajuste e subtração de um polinômio de ordem 7 à linha de base de cada espectro, e foi feita a normalização de cada espectro pela área sob a curva (*1-norm*). Após o pré-processamento, foi calculado o espectro médio de cada um dos grupos considerados.

Com o auxílio da literatura Raman de compostos químicos, foram identificados picos correspondentes aos espectros Raman dos princípios ativos discriminados nos rótulos dos repelentes e protetores solares (Tabela 4 e Tabela 5 respectivamente) nos espectros dos produtos não aplicados a pele. Foi então realizada a identificação destes picos nos espectros Raman da pele, nos respectivos grupos de repelentes e protetores. Estes picos foram submetidos à análise estatística a fim de verificar a significância da presença dos produtos sobre a pele comparativamente às regiões de controle. A análise estatística considerada foi o teste ANOVA (análise de variância).

Primeiramente, realizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar se as intensidades dos picos dos princípios ativos nos espectros da pele com os produtos eram compatíveis com uma distribuição normal. Verificada esta condição, foi aplicado o teste ANOVA pareado com pós-teste de Tukey-Kramer para obtenção da significância estatística, considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$) como valor limite para a rejeição da

hipótese nula (WEAVER et al., 2017). A hipótese considerada é de que a aplicação do produto sobre a pele resulta em um espectro com picos que apresentam diferença significativa na intensidade em comparação a um espectro obtido na pele sem o produto.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão organizados de modo a reproduzir a ordem pela qual os dados foram produzidos conforme a metodologia apresentada. Inicialmente são apresentados os espectros referentes aos produtos aplicados sobre o porta amostra seguido de uma tabela mostrando o relacionamento entre os princípios ativos das fórmulas, identificados nas Tabela 4 e 5, e os picos identificados pela pesquisa na literatura Raman, seguido de uma avaliação sobre se é possível identificar os picos relacionados nos espectros dos produtos. Em seguida são apresentados os espectros da pele com os produtos aplicados e da pele sem produto (controle), com o destaque dos picos dos princípios ativos identificados na literatura. Finalmente são apresentados gráficos da média e desvio padrão das intensidades dos picos dos princípios ativos da pele e a identificação da diferença estatisticamente significativa entre os picos da pele e aqueles das regiões de controle.

3.1 Observações sobre os espectros dos repelentes de insetos e protetores solares

Durante a preparação do trabalho, a partir dos espectros obtidos dos repelentes de insetos e protetores solares, tanto na forma aplicada somente sobre porta amostra de alumínio como aplicado sobre a pele e da pele sem tratamento (controle), foram gerados dados que resultaram do pré-processamento explicitado no capítulo de Materiais e Métodos e explicados no capítulo de Revisão Bibliográfica. A partir destes dados intermediários do pré-processamento dos espectros foi possível a produção de figuras que representam os espectros nos pontos respectivos de pré-processamento. Estas figuras são interessantes no sentido de ilustrar melhor como o espectro bruto, coletado a partir do espectrômetro Raman, é transformado através das etapas de pré-processamento até o resultado conforme utilizado no trabalho.

Inicialmente apresenta-se na Figura 14 e na Figura 15 os espectros brutos, conforme coletados dos espectrômetros, dos repelentes de insetos. Estes espectros caracterizam-se por ter uma linha de base desalinhada com o eixo horizontal. Isso deve-se a diferença de intensidade dos picos Raman associados a fluorescência gerada pela leitura do espectrômetro Raman como referenciado na seção 1.3.3.2. Observa-se que na Figura 15, comparada com a Figura 14, este efeito é mais intenso. Esta diferença é produzida pela fluorescência característica da pele, presente nos espectros representados na Figura 15, mas claramente mostrado pelo espectro correspondente à pele sem aplicação de produto (controle), linha CTR.

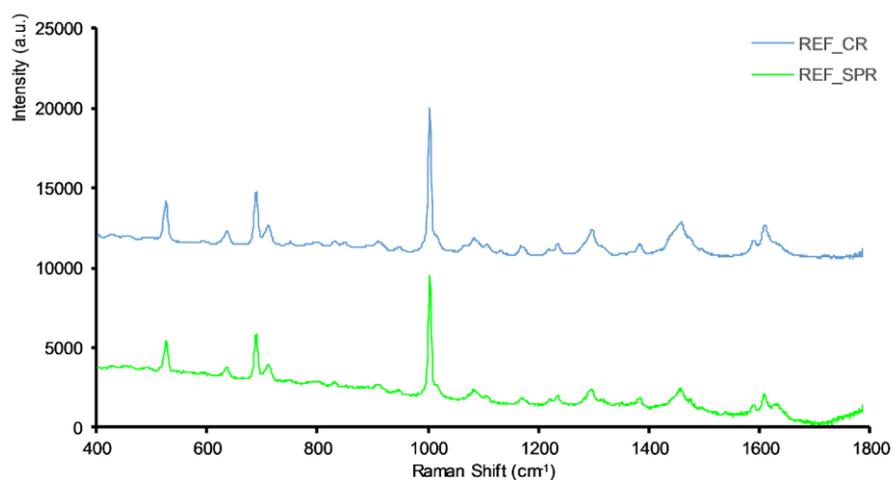


Figura 14: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_SPR - *spray* e REF_CR - *creme*) – espectros sem pré-processamento

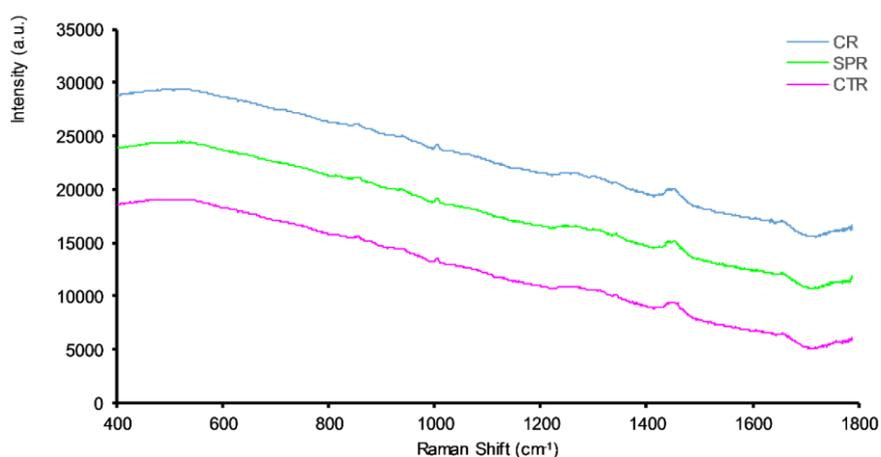


Figura 15: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (SPR - *spray* e CR - *creme*) e da pele sem produto (CTR - controle) – espectros sem pré-processamento

As Figura 16 e Figura 17 representam o espectro dos repelentes de insetos, aplicados sobre o porta amostra de alumínio e aplicados sobre a pele, respectivamente, com a correção da linha de base mas sem a normalização da intensidade. Nesse ponto é possível que os espectros representados em ambas as figuras já encontram-se alinhadas com o eixo horizontal.

A normalização realizada ajuda a suavizar o sinal do espectro facilitando a identificação dos picos, mas diminui a diferença entre as intensidades das substâncias em análise. Assim, ao observar-se o espectro não-normalizado, especialmente o espectro dos repelentes de insetos aplicados sobre o porta amostra, é possível identificar claramente a diferença de intensidade entre os picos indicados para o princípio ativo DEET entre os espectros REF_CR e REF_SPR. Essa diferença é resultado da diferença de concentração do princípio ativo entre as formulações creme (REF_CR) e *spray* (REF_SPR), conforme observado na Tabela 4.

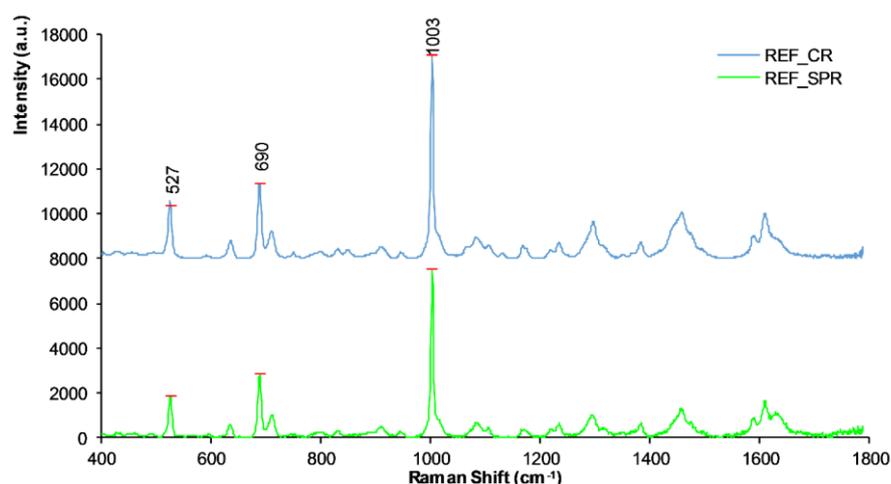


Figura 16: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_SPR - *spray* e REF_CR - creme) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados

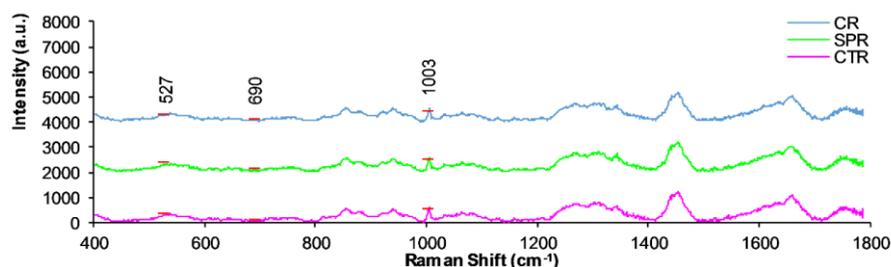


Figura 17: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (SPR - *spray* e CR - creme) e da pele sem produto (CTR - controle) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados

Com respeito aos protetores solares, de modo similar, apresenta-se na Figura 18 e na Figura 19 os espectros brutos dos protetores solares conforme coletados dos espectrômetros. De forma similar aos repelentes, os espectros caracterizam-se por ter uma linha de base desalinhada com o eixo horizontal devendo-se a isso, da mesma maneira, a diferença de intensidade dos picos Raman associados à fluorescência gerada pela leitura do espectrômetro Raman como referenciado na seção 1.3.3.2. Assim como no caso dos repelentes, na Figura 19, comparada com na Figura 18, este efeito é mais intenso. Como já explicado, a diferença é produzida pela fluorescência característica da pele, explicitada claramente na Figura 18 em que é mostrado o espectro correspondente a pele sem aplicação de produto (controle), linha CTR.

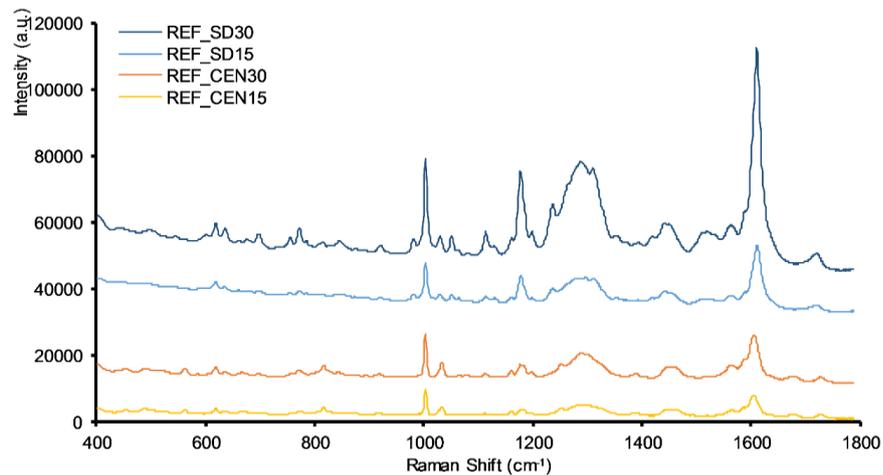


Figura 18: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_CEN15-Marca CEN FPS 15, REF_SD15-Marca CEN FPS 30, REF_SD15-Marca SD FPS 15 e REF_SD30-Marca SD FPS30) – espectros sem pré-processamento

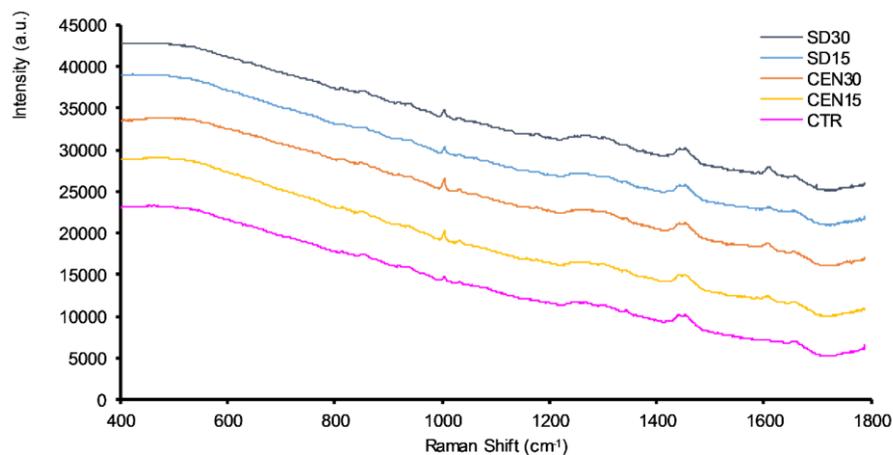


Figura 19: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (CEN15-Marca CEN FPS 15, SD15-Marca CEN FPS 30, SD15-Marca SD FPS15 e SD30-Marca SD FPS30) e da pele sem produto (CTR-controle) – espectros sem pré-processamento

A Figura 20 e a Figura 21 representam o espectro dos protetores solares, aplicados sobre o porta amostra de alumínio e aplicados sobre a pele, respectivamente, com a correção da linha de base mas sem a normalização da intensidade. Nesse ponto é possível que os espectros representados em ambas as figuras já encontram-se alinhadas com o eixo horizontal.

Como explicado para o caso dos repelentes de insetos, a normalização suaviza o sinal do espectro e diminui a diferença entre as intensidades das substâncias em análise. Assim, especialmente para o espectro dos protetores solares aplicados sobre o porta amostra, é possível identificar claramente a diferença de intensidade entre os picos observáveis entre os espectros. Essa diferença é resultado da diferença de concentração dos princípios ativos presentes entre as formulações das marcas SD e CEN. Enquanto para os produtos SD FPS 15 (REF_SD15) e SD FPS 30 (REF_SD30) o espectro apresenta picos com geometria similar, observa-se que os picos de REF_SD30 são mais intensos que os picos de REF_SD15. De maneira similar, para a marca CEN FPS 15 e 30 (REF_CEN15 e REF_CEN30, respectivamente) o espectro tem geometria similar mas picos mais intensos.

Apesar dos rótulos não apresentarem a proporção de cada agente ativo presente nos produtos, o aumento dos fatores de proteção solar são obtidos pelo aumento da concentração dos princípios ativos (WOLF et al., 2003). A partir disso, pode-se constatar que, de fato, para um aumento de 15 pontos no FPS (aumento de 100%), os picos aumentam sua intensidade em até 270% (pico em 1288 cm^{-1}) para a marca SD e 134% (pico em 1605 cm^{-1}).

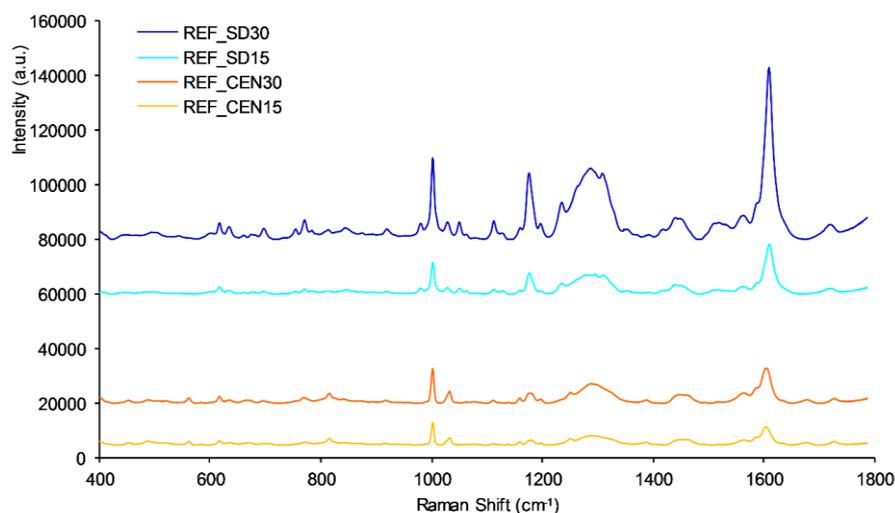


Figura 20: Média dos espectros Raman dos produtos, aplicados sobre o porta amostras de alumínio (REF_CEN15-Marca CEN FPS 15, REF_SD15-Marca CEN FPS 30, REF_SD15-Marca SD FPS15 e REF_SD30-Marca SD FPS30) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados

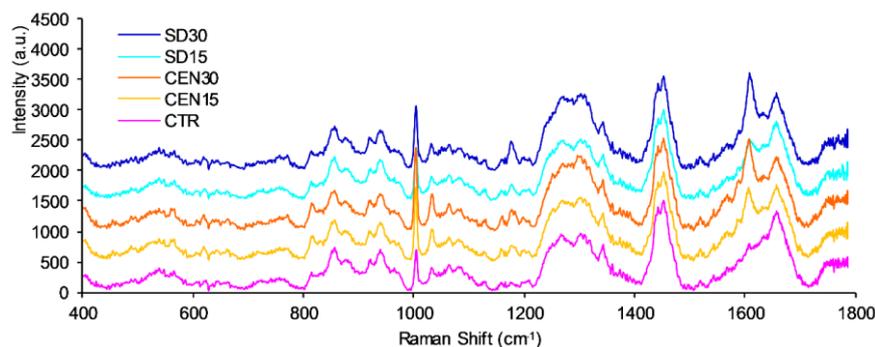


Figura 21: Média dos espectros Raman adquiridos dos produtos aplicados na pele (CEN15-Marca CEN FPS 15, SD15-Marca CEN FPS 30, SD15-Marca SD FPS15 e SD30-Marca SD FPS30) e da pele sem produto (CTR-controle) – espectros com remoção da fluorescência de fundo, não normalizados

3.2 Repelentes de insetos

3.2.1 Espectros Raman dos produtos não aplicados a pele e picos mais significativos

A Figura 22 apresenta os espectros Raman dos repelentes em formulações creme e *spray* sobre o porta amostra (grupos de espectros CR e SPR), onde destacam-se os picos em 526, 690, 1003, 1295, 1458 e 1608 cm^{-1} nas duas formulações. A Tabela 7 relaciona o princípio ativo indicado no rótulo do produto, os picos Raman identificados na literatura, e a indicação se estes picos estão presentes nos espectros das formulações. Pode ser observado que estes picos correspondem ao princípio ativo DEET presente na formulação dos repelentes.

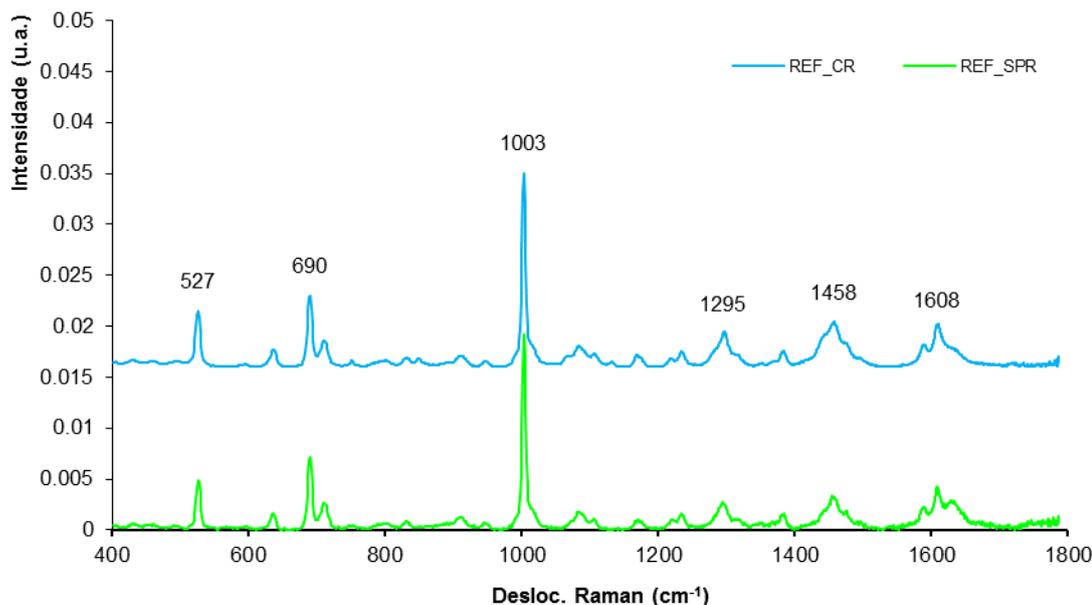


Figura 22: Espectros Raman dos repelentes nas formulações creme (REF_CR) e *spray* (REF_SPR). Os picos indicados representam o princípio ativo DEET

Tabela 7: Picos Raman característicos do princípio ativo nas amostras dos repelentes creme e *spray* conforme identificados em literatura

Princípio ativo (*)	Presença no rótulo		Picos Raman característicos (cm ⁻¹)	
	SPR	CR	Da literatura	Da Figura 22
DEET	Sim	Sim	524, 690, 1003, 1297, 1460 e 1606	526, 690, 1003, 1295, 1458 e 1608
			(BÓRIO; FERNANDES; SILVEIRA JR., 2016)	

Na Figura 23 são apresentados os espectros Raman médios de pele com repelente nas apresentações *spray* (SPR) e creme (CR) e de pele sem aplicação de repelente (CTR). Os picos Raman indicados na Figura 23A são os principais do princípio ativo DEET. Nas Figuras 23B, 23C e 23D estão destacados os picos em 527, 690 e 1003 cm⁻¹, que evidenciam sobreposição entre os picos Raman da pele e do DEET. Em 527 cm⁻¹ há a sobreposição com o pico em torno de 540 cm⁻¹ da pele normal, atribuído à vibração de estiramento da ponte dissulfeto S-S em proteínas da pele (actina, colágeno e elastina) (SILVEIRA JR. et al., 2012), em 609 cm⁻¹ o pico do DEET está em um “vale” entre picos da pele em 640 e 720 cm⁻¹, também atribuídos a proteínas (C-C *twisting* da fenilalanina e tirosina e C-S *stretching* das proteínas, respectivamente, com contribuição da vibração C-N da colina de fosfolipídios para

o pico em 720 cm^{-1}) (SILVEIRA JR. et al., 2012), e em 1003 cm^{-1} há sobreposição com o pico atribuído a proteínas em 1004 cm^{-1} (vibração do anel aromático da fenilalanina e tirosina).

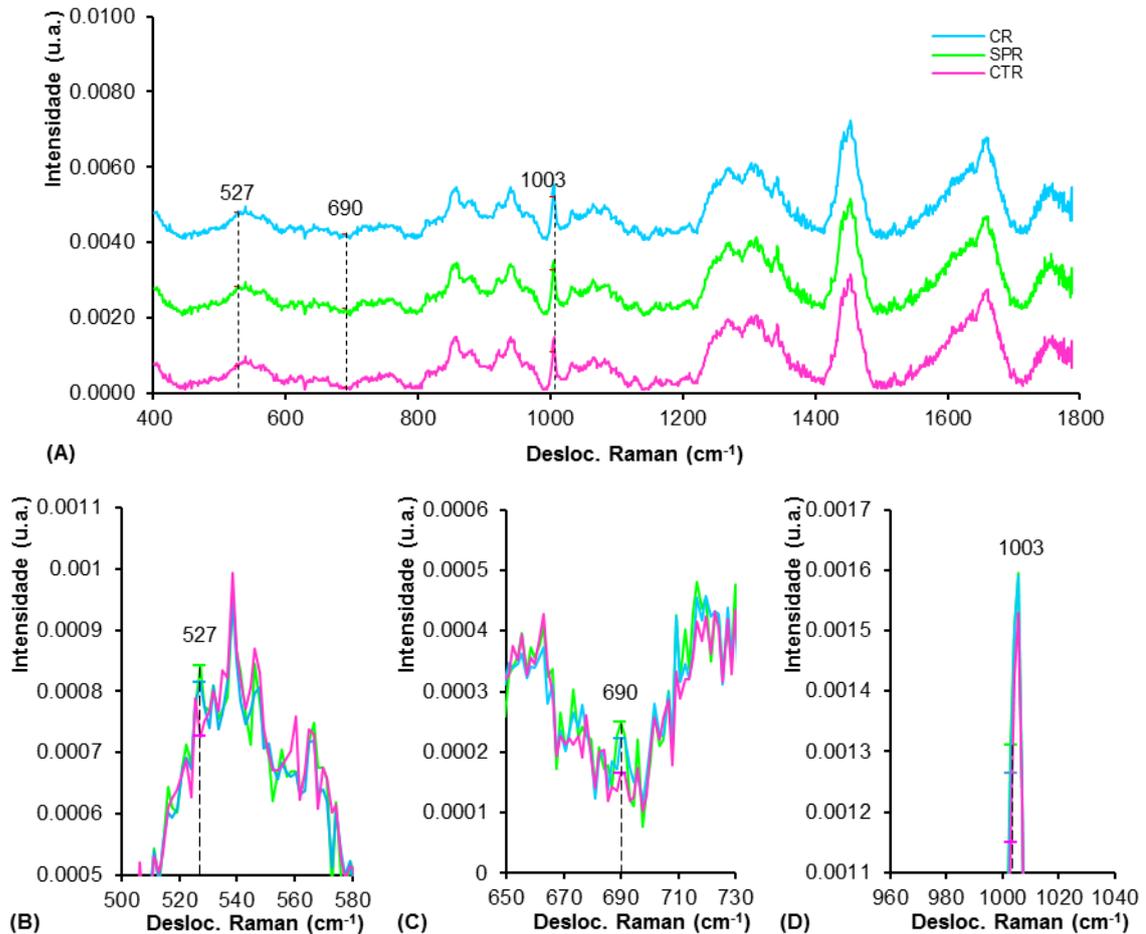


Figura 23: A) Espectros Raman médios de pele com repelente nas apresentações *spray* (SPR) e creme (CR) e de pele sem aplicação de repelente (CTR-controle); B), C) e D) apresentam plotagem dos picos em 527, 690 e 1003 cm^{-1} , respectivamente, com ampliação que permite observar a sobreposição dos espectros referentes a SPR, CR e CTR nos picos comuns à pele e a diferença na intensidade dos picos referentes ao DEET

3.2.2 Análise estatística dos picos dos repelentes identificados na pele

A Figura 24 apresenta a média e o desvio padrão das intensidades dos picos Raman do DEET encontrados no espectro da pele nos 3 grupos da Figura 23. O teste de Tukey-Kramer identificou significância estatística dos grupos com aplicação dos repelentes relativa ao grupo controle conforme também mostrado na Figura 24. Em função da diferença

significativa, principalmente dos picos em 527 cm^{-1} e 1003 cm^{-1} , é possível afirmar que estes picos indicaram a presença do DEET na pele dos voluntários.

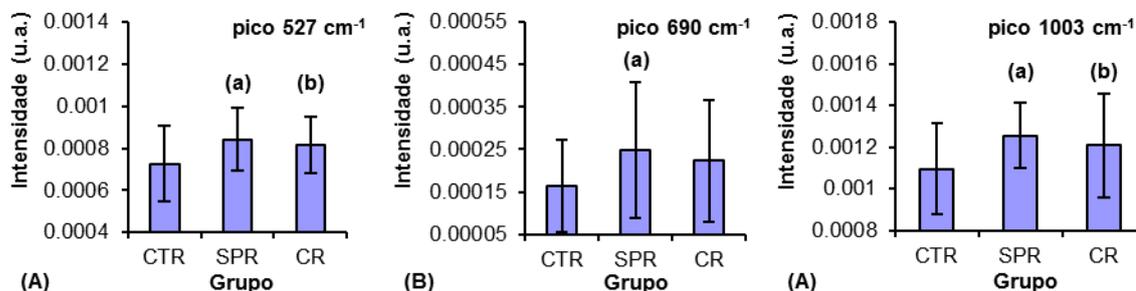


Figura 24: Plotagem das intensidades médias e desvios padrão dos picos Raman do princípio ativo DEET encontrados nos espectros da pele. As letras (a) e (b) indicam significância estatística dos grupos SPR vs CTR (a) e CR vs CTR (b) pelo teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$)

Na região dos picos em 527 cm^{-1} e 1003 cm^{-1} (Figura 23 B e D, respectivamente), onde há a sobreposição dos picos da pele [540 e 1004 cm^{-1} – proteínas (ponte dissulfeto e fenilalanina/tirosina)] com o do DEET, a aplicação do teste estatístico pareado é importante devido à esta sobreposição, haja vista que a região de controle é no mesmo indivíduo e que testes pareados são capazes de identificar diferenças estatísticas entre os valores das intensidades dos picos quando os indivíduos são os mesmos antes e depois da aplicação dos produtos, o que torna possível a associação destes picos ao princípio ativo dos produtos.

3.3 Protetores solares

3.3.1 Espectros Raman dos produtos não aplicados à pele e picos mais significativos

A Figura 25 apresenta os espectros Raman dos protetores solares dos grupos CEN15, CEN30, SD15 e SD30 colocados em porta amostra, que apresentaram picos em: 1003 , 1177 , 1288 , 1310 , 1564 , 1605 e 1611 cm^{-1} . A correspondência entre os picos e princípios ativos identificados nos produtos testados está indicada na Tabela 8. Observa-se que os produtos, apesar de apresentarem picos nas mesmas posições, diferem quanto à intensidade dos picos. A diferença é relacionada à concentração dos diferentes compostos químicos correspondentes aos picos e indica a diferença da composição entre os produtos, tanto com relação às marcas quanto com relação ao FPS.

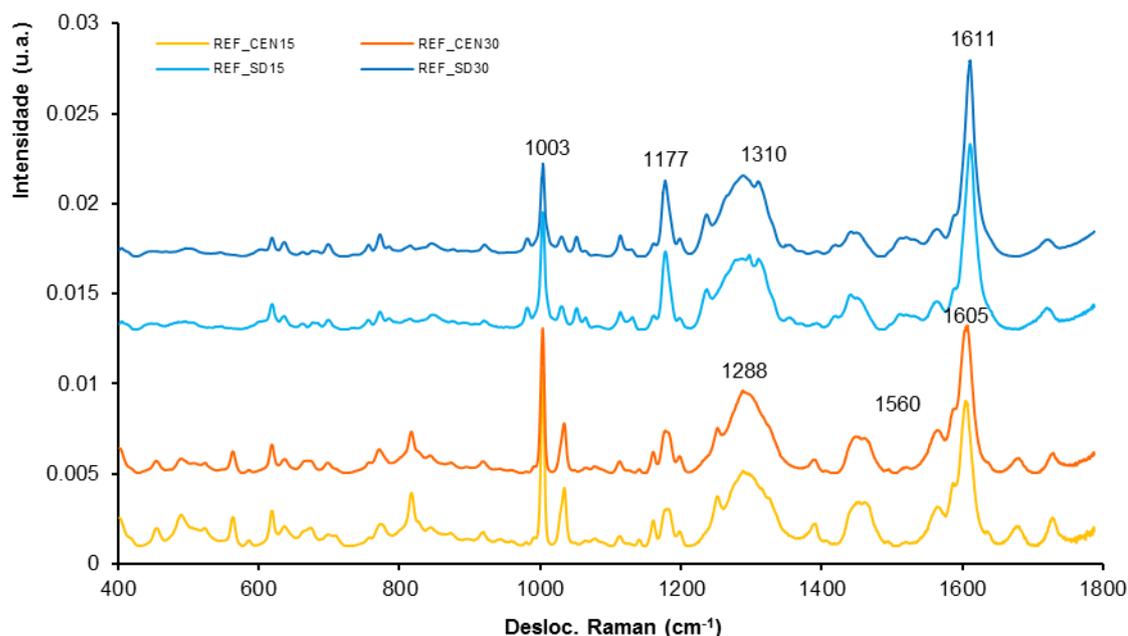


Figura 25: Espectros Raman dos protetores solares nos grupos CEN15, CEN30, SD15 e SD30. Os picos marcados representam os picos identificados nos produtos aplicados em porta amostra de alumínio. A identificação dos picos faz relação aos princípios ativos indicados na Tabela 8

Tabela 8: Picos Raman característicos de princípios ativos de protetores solares conforme identificados na literatura

Princípio ativo	Presença no rótulo			Picos Raman Característicos (cm ⁻¹)	
	CEN15	SD15	SD30	Da literatura	Da Figura 25
Octinoxate	Sim	Não		1170 e 1613 (SOHN; BUEHLER; IMANIDIS, 2016)	1177 e 1605
Benzophenone-3	Sim	Não		1000 e 1280 (BIO-RAD LABORATORIES, INC., 2013)	1003 e 1288
Octocrylene	Sim	Sim		1560 (BEYERE; YARASI; LOPPNOW, 2003)	1564
Bemotrizinol	Sim	Sim		*	-
Ethylhexyl triazone	Não	Sim		*	-

Princípio ativo	Presença no rótulo		Picos Raman Característicos (cm ⁻¹)	
	CEN15 CEN30	SD15 SD30	Da literatura	Da Figura 25
Avobenzone	Não	Sim	1605 (BIO-RAD LABORATORIES, INC., 2012)	1611

(*) não foi possível obter o espectro da substância na literatura

Na Figura 26A são apresentados os espectros Raman médios dos grupos com aplicação dos protetores solares na pele: CTR, CEN15, CEN30, SD15 e SD30. Os picos Raman evidenciados nesta figura, em 1003, 1177, 1288 e 1611 cm⁻¹, são aqueles identificados nos protetores solares e que correspondem aos dos princípios ativos relacionados na Tabela 8. Nas Figura 26B, 18C, 18D e 18E são observados detalhes dos picos de interesse, respectivamente. Os espectros apresentados na Figura 26A não apresenta uma indicação clara de pico em 1564 cm⁻¹, relacionado ao octocrylene, como ocorreu nos espectros do produto não aplicados a pele. A Figura 26F mostra que nesta região há uma sobreposição do espectro da pele, possivelmente associada à presença dos picos relacionados a ácidos nucleicos e hemoglobina presentes na pele (SILVEIRA JR. et al., 2012), além da proximidade com o pico de 1611 cm⁻¹, de grande intensidade, que é associado à fenilalanina (SILVEIRA JR. et al., 2012), o que prejudica a identificação deste pico e sua utilização como referência para a identificação deste princípio ativo. Em relação ao pico em 1003 cm⁻¹, há a sobreposição deste com o pico atribuído a proteínas em 1004 cm⁻¹ (vibração do anel aromático da fenilalanina e tirosina), como ocorreu com o repelente.

O Apêndice A apresenta uma avaliação considerando os dados dos picos não normalizados dos espectros dos protetores solares, aplicados sobre o porta amostra de alumínio, em que são feitas considerações a respeito da diferença de intensidade Raman comparada com a diferença de FPS entre os protetores solares de mesma marca. No caso da marca CEN, a maior diferença de intensidade foi registrada para o pico 1288 cm⁻¹ (aumento da intensidade Raman: 270%) que, conforme a Tabela 8, corresponde ao princípio ativo benzophenone-3. Para a marca SD, a maior diferença de intensidade registrada entre os protetores solares de FPS 15 e 30 foi no pico 1605 cm⁻¹ (aumento da intensidade Raman: 134%) que, conforme a Tabela 8, corresponde ao princípio ativo avobenzone.

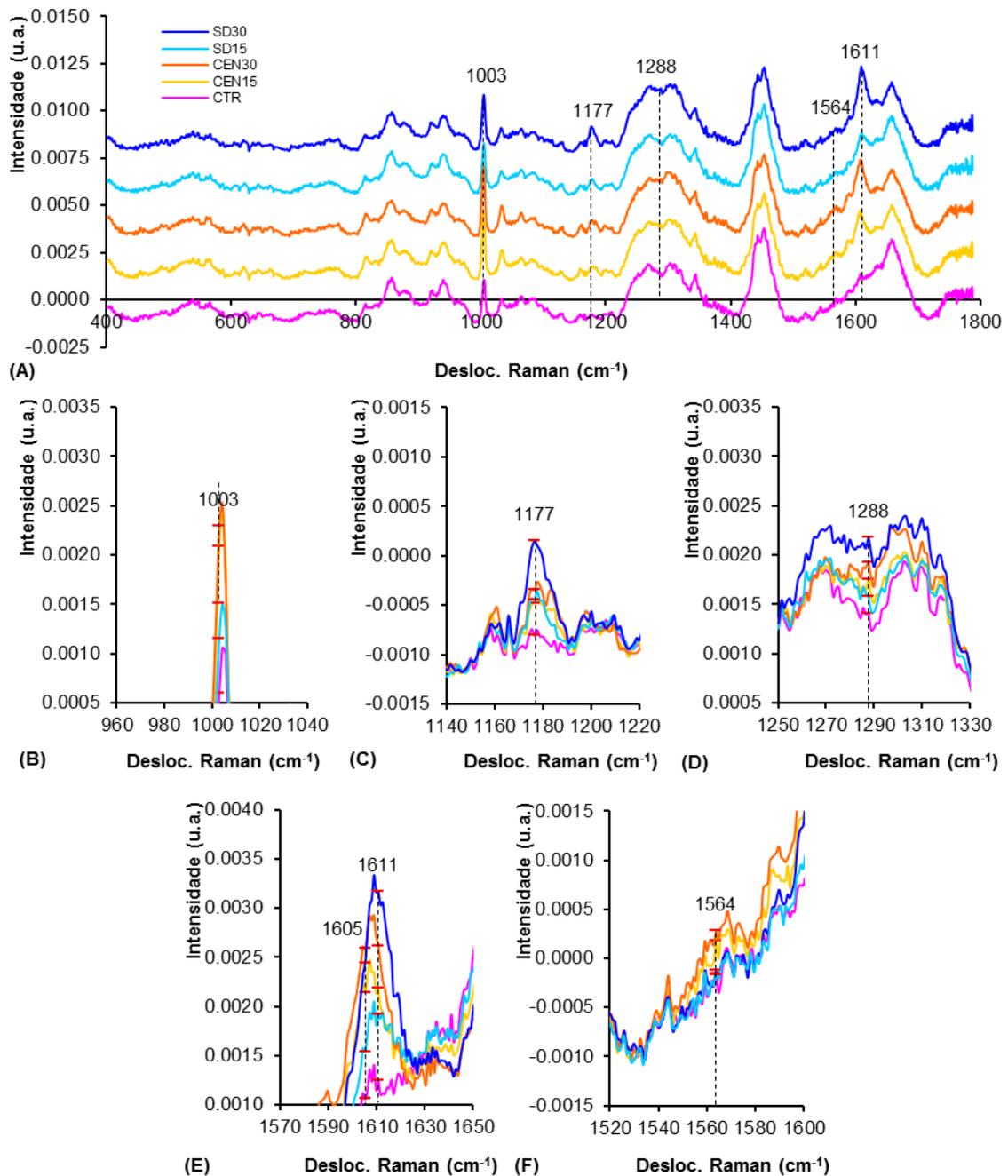


Figura 26: A) Espectros Raman médios dos grupos CTR, CEN15, CEN30, SD15 e SD30; B), C), D), E) e F) apresentam plotagem dos picos em 1003, 1177, 1288, 1611 e 1564 cm⁻¹, respectivamente, com ampliação que permite observar a sobreposição dos espectros referentes a CTR, CEN15, CEN30, SD15 e SD30

3.3.2 Análise estatística dos picos dos protetores solares identificados na pele

A Figura 27 apresenta a média e desvio padrão das intensidades dos picos Raman dos protetores solares no espectro da pele nas quatro formulações destacadas na Figura 26. O teste de Tukey-Kramer identificou significância estatística dos grupos com aplicação dos

protetores comparados ao grupo controle conforme também mostrado na Figura 26. Dada a diferença significativa, principalmente nos picos em 1003, 1177, 1288 e 1611 cm^{-1} , é possível afirmar que estes picos indicaram a presença dos princípios ativos, correspondentes à Tabela 8 dos protetores na pele dos voluntários.

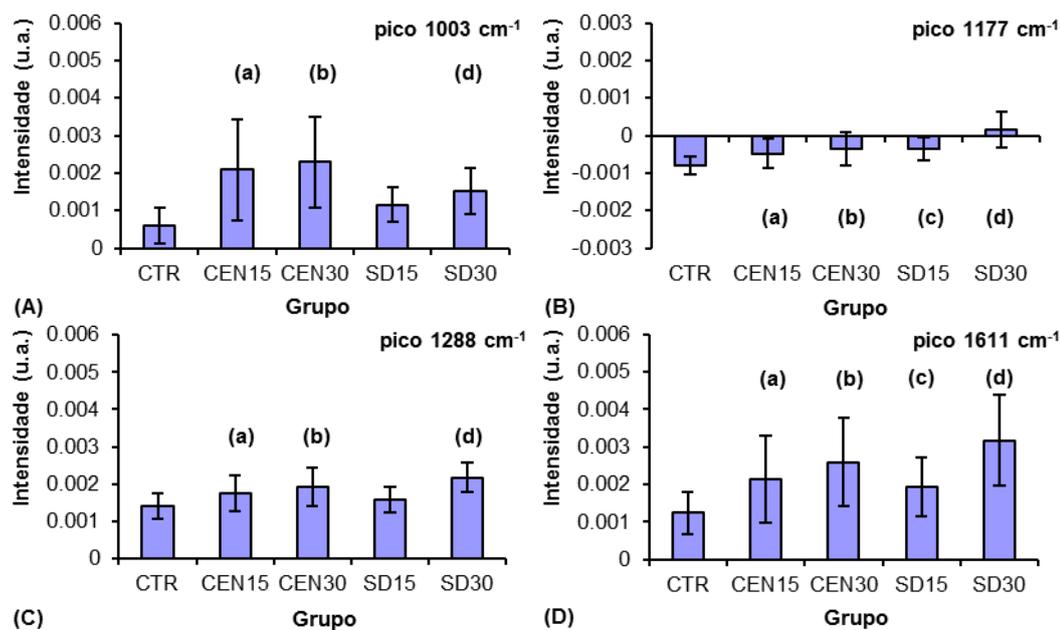


Figura 27: Plotagem das intensidades médias e desvios padrão dos picos Raman dos princípios ativos dos protetores solares encontrados nos espectros da pele. As letras (a), (b), (c) e (d) indicam significância estatística dos grupos CEN15 vs CTR (a), CEN30 vs CTR (b), SD15 vs CTR (c) e SD30 vs CTR (d) pelo teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$)

3.4 Identificação pela técnica Raman dos princípios ativos na pele

A utilização dos picos em 527 e 1003 cm^{-1} , ambos do princípio ativo DEET, para identificar a presença do repelente, desperta interesse pois o primeiro não está sobreposto a picos Raman da pele, enquanto que o segundo, mesmo estando sobreposto, possui posição (*Raman shift*) diferente do que é encontrado na pele, atribuído à vibração do anel aromático (fenilalanina e tirosina) em 1004 cm^{-1} . Mesmo sobrepostos, a diferença de intensidade entre os picos do DEET e do anel aromático das proteínas da pele permitem uma diferenciação para o SPR e CR vs CTR. Os demais picos do DEET não apresentam significância devido à sobreposição destes com os picos da pele.

Uma aplicação interessante é a detecção de eventuais degradações do DEET sob luz solar, uma vez que estudo realizado por Bório et al. (BÓRIO; FERNANDES; SILVEIRA JR., 2016) mostrou que os picos em 527 e 1003 cm^{-1} são instáveis quando o repelente é irradiado

por luz ultravioleta (UVA e UVB) por 8 h, o que poderia potencialmente reduzir sua eficácia após exposição solar prolongada. O estudo pode também ser aplicado na avaliação da quantidade necessária de produto para promover o efeito repelente desejado, pois o espectro Raman pode detectar quantitativamente a presença do princípio ativo através da intensidade do pico.

A avaliação dos protetores solares indicou que a espectroscopia Raman foi capaz de identificar a diferença na composição dos produtos em teste. Os picos em 1003 e 1177 cm^{-1} apresentaram diferença estatisticamente significativa para as comparações entre o controle (CTR) e os grupos CN15, CN30, SD15 e SD30, enquanto que os picos 1177 e 1288 cm^{-1} apresentaram diferença estatisticamente significativa na comparação com o controle para os grupos CEN15, CEN30 e SD30. De acordo com a Tabela 8, os picos 1177 e 1288 cm^{-1} podem ser associados a octinoxate e a benzophenone-3 que são princípios ativos presentes nos protetores solares da marca CEN mas não presentes na marca SD. Observa-se também que a diferença na intensidade dos picos entre os grupos é indicativo da diferença da quantidade do princípio ativo em cada produto. Por exemplo, o pico em 1003 cm^{-1} , associado a benzophenone-3, apresenta intensidade maior para os espectros da marca CEN, enquanto para a marca SD a intensidade é reduzida. Isso indica que este pico corresponde ao princípio ativo presente no primeiro produto, mas não no outro. Essa observação é possível pela capacidade quantitativa da análise pela espectroscopia Raman. Considerando a composição de cada protetor solar indicada na Tabela 8 e os picos encontrados nos espectros de cada formulação, a presença dos picos em 1003, 1288 e 1611 cm^{-1} nos protetores da marca CEN, e o pico em 1605 cm^{-1} para os protetores da marca SD, constituem-se em marcadores da presença destes produtos na pele.

A espectroscopia Raman traz informações quantitativas relacionadas ao material analisado e que podem ser úteis aos fabricantes, podendo impactar no controle de qualidade do processo produtivo. Como a proporção dos princípios ativos e excipientes é conhecida, é possível observar, em nível quantitativo, a presença de cada um dos princípios ativos na pele após um protocolo de aplicação, ou mesmo realizando ensaio de degradação em função de condições ambientais ou situações simuladas de uso.

Os resultados apresentados mostraram picos que podem ser utilizados como indicadores da presença dos produtos estudados na pele. A espectroscopia Raman, como técnica não invasiva e que pode ser aplicada *in situ* e *in vivo*, não provoca alteração no material em estudo, mostra-se como meio versátil e rápido para a identificação destes produtos na pele.

Com estas características é possível vislumbrar a aplicação da espectroscopia Raman como um coadjuvante no processo de determinação de eficácia de protetores solares e repelentes de insetos. É possível elaborar um contexto em que, como parte do protocolo de testes de protetores solares e repelentes, verifique-se que os princípios ativos presentes na pele, com o tempo, mantêm-se presentes. Outra possibilidade, em protetores solares ou repelentes de insetos, seria a verificação e eficácia de um produto a partir da confirmação da sua presença na pele a partir de uma leitura com o espectrômetro Raman da leitura da pele tratada.

A partir dos resultados foi possível concluir que os procedimentos adotados durante o trabalho para a aquisição, coleta e análise dos espectros, constituem-se em metodologia que pode ser adotada para a avaliação de produtos que, como protetores solares e repelentes, sejam de uso tópico cuja eficácia dependa da presença dos princípios ativos na pele.

Destaca-se que existe espaço para o desenvolvimento de outros trabalhos. Um dos caminhos a serem trilhados está relacionado aos princípios ativos cujos picos não foram localizados na literatura, sendo oportunidades abertas não somente a própria caracterização deles por espectroscopia Raman como também a identificação de seus picos nos produtos testados neste estudo. Outro campo aberto é o desenvolvimento de metodologia que faça a associação entre as metodologias de verificação de eficácia em produtos de uso tópico, como protetores solares e repelentes de insetos, e a verificação quantitativa utilizando-se a espectroscopia Raman.

3.5 Aplicações *in vivo* e no controle de qualidade de identificação de substâncias pela espectroscopia Raman

O trabalho de Chrit et al. (CHRIT et al., 2007) fez uma investigação sobre o efeito do polímero pMPC (nomenclatura INCI: methacryloyloxethyl phosphorylcholine, nomenclatura IUPAC: 2-methacryloyloxethyl phosphorylcholine), um princípio ativo de hidratação que age sobre o estrato córneo da pele, utilizando espectroscopia Raman confocal. Neste trabalho foi possível verificar como, com o uso da espectroscopia Raman, foi possível estabelecer uma relação entre a ação do princípio ativo e o aumento do nível de hidratação da pele pela relação observada entre o pico associado ao OH (água) e o pico relacionado ao CH₃ (proteína). Desta relação, os autores avaliaram o impacto do efeito de hidratação quando foi agregado o ácido hialurônico (nomenclatura INCI: hyaluronic acid) com o uso do pMPC. Os autores concluíram que a espectroscopia Raman é uma maneira efetiva de identificar a ação do

princípio ativo e seu efeito da hidratação na pele, o que pode ajudar no desenvolvimento de novos produtos.

O trabalho de Mélot et al. (MÉLOT et al., 2009) investigou, com o auxílio da espectroscopia Raman confocal, como o uso de melhoradores de penetração na pele como o propilenoglicol (nomenclatura INCI: propylene glycol, nomenclatura IUPAC: propane-1,2-diol) e o triglicéride de ácido cáprico/caprílico (nomenclatura INCI: caprylic/capric triglyceride, nomenclatura IUPAC: decanoic acid, ester with 1,2,3-propanetriol octanoate; glycerides, mixed) agiram de forma a promover, com maior eficiência, o transporte de retinol até camadas da pele abaixo do estrato córneo. No trabalho foi mostrado como, a partir da evolução da concentração do retinol observado pela a variação da intensidade de picos identificados pela espectroscopia Raman relacionado a este composto, foi afetada a penetração a partir da associação do uso dos melhoradores de penetração dedicados a facilitar a passagem do retinol pelo estrato córneo. O trabalho concluiu que a espectroscopia Raman é uma técnica comprovadamente efetiva para identificar a eficácia de formulações projetadas para auxiliar no transporte de moléculas através da pele.

O trabalho de Tippavajhala et al. (TIPPAVAJHALA; MENDES; MARTIN, 2018) investigou a penetração de protetores solares na pele a partir da espectroscopia Raman confocal. No trabalho foi observado que, num período de teste de 2 h, a ação do protetor solar foi restrita ao estrato córneo da pele, sendo desta forma possível concluir que os protetores solares são produtos que podem ser considerados seguros. A conclusão do trabalho também observou que a espectroscopia Raman mostrou-se como meio efetivo e simples de verificar a questão levantada no estudo.

Os trabalhos relacionados nos parágrafos anteriores têm como ponto comum a constatação de que a espectroscopia Raman é um meio eficaz para identificar a efetiva ação de substâncias com ação tópica, da mesma maneira que os resultados do presente trabalho apontam para a mesma conclusão. Nos casos aqui descritos, foi possível estabelecer, a partir do conhecimento prévio da ação de uma substância (agentes hidratantes para o primeiro estudo, substâncias promotoras do transporte do retinol pela pele no segundo estudo e ação de repelentes de insetos e protetores solares no presente estudo), uma pesquisa em que a eficácia do produto foi verificada a partir da identificação de picos dos produtos em estudo na pele.

Outro campo explorado na literatura tratou de verificar a existência de picos relacionados a determinados produto. O trabalho de Jentzsch et al. (JENTZSCH; RAMOS; CIOBOTĂ, 2015) faz uma avaliação da espectroscopia Raman aplicada na identificação de óleos essenciais, muito utilizados na indústria cosmética em formulações de produtos tópicos,

e aponta para a eficácia desta técnica para a realização de verificações pelo controle de qualidade de fabricantes destes produtos. De maneira similar, Davis et al. (DAVIS; KEMPER; LEWIS, 2007) indicam que, apesar de resistências iniciais na indústria farmacêutica para adoção de técnicas de espectroscopia vibracional em função do receio de que órgãos reguladores não viessem a aceitar a adoção delas técnicas, a espectroscopia Raman vem encontrando espaço para aplicação com sucesso com ferramenta analítica de controle processo.

CONCLUSÃO

Esta pesquisa apresentou uma metodologia baseada na espectroscopia Raman para a determinação da presença de repelentes de insetos e protetores solares aplicados na pele de voluntários, o que possibilitou a observação dos picos relacionados aos princípios ativos dos produtos em teste, utilizando-se as intensidades dos picos dos princípios ativos de cada produto, e a identificação dos picos referentes a estes princípios ativos pela pesquisa dos espectros dos compostos químicos na literatura especializada. Através de análise estatística (ANOVA e teste de Tukey-Kramer, $p < 0,05$), foi possível estabelecer a existência de uma diferença estatisticamente significativa dos picos em 527 e 1003 cm^{-1} (relacionados ao DEET) para o repelente de insetos, e 1003 e 1288 cm^{-1} (relacionado ao benzophenone-3) para os protetores solares das duas marcas, e 1177 e 1611 cm^{-1} (relacionado ao octinoxate) para a marca de protetor solar CEN e 1605 cm^{-1} (relacionado ao avobenzone) para a marca de protetor solar SD, quando comparada a pele tratada com os produtos comparativamente com a pele não tratada (controle), o que é indicativo da presença destes produtos na pele dos voluntários. Os picos dos princípios ativos em 1003 cm^{-1} estão na mesma posição do picos da pele em 1004 cm^{-1} (atribuído à fenilalanina), e mesmo assim foi possível a diferenciação estatística da pele tratada da não tratada. Com relação aos protetores solares, foi possível identificar a diferença na intensidade dos picos dos ingredientes ativos, sugerindo diferentes concentrações, sendo maior para os protetores solares com FPS 30, principalmente os princípios ativos benzophenone-3 para o protetor solar da marca CEN e avobenzone para o protetor da marca SD. Este resultado sugere que a diferença do FPS pode ser determinada pelos picos Raman.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTWI, F. B.; SHAMA, L. M.; PETERSON, R. K. D. Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 31–36, 1 jun. 2008.

ANVISA. **Consultas - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/cosmeticos/regularizados/q/?nomeProduto=REPELENTE>>. Acesso em: 21 maio. 2018.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 30 de 01/06/2012**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3134554/%281%29RDC_30_2012_.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2017.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 19 de 10/04/2013**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_19_2013_.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2017.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 07 de 10/02/2015**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867685/RDC_07_2015_.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2017.

BARNARD, D. R. Biological assay methods for mosquito repellents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. sp1, p. 12–16, 2005.

BAUMANN, L. S. **Cosmetic Dermatology: Principles and Practice, Second Edition: Principles & Practice**. New York, EUA: McGraw Hill Professional, 2008.

BEEVER, R. Mosquito repellent effectiveness: a placebo controlled trial comparing 95% DEET, Avon Skin So Soft, and a “special mixture.” **BC Med. J**, v. 48, p. 226–231, 2006.

BERTH - JONES, J. Principles of Topical Therapy. In: **Rook’s Textbook of Dermatology, Ninth Edition**. Atlanta, EUA: American Cancer Society, 2016. p. 1–51.

BETTS, J. G. et al. **Anatomy & Physiology**. Houston, TX: OpenStax College, Rice University, 2013.

BEYERE, L.; YARASI, S.; LOPPNOW, G. R. Solvent effects on sunscreen active ingredients using Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 34, n. 10, p. 743–750, 1 out. 2003.

BIO-RAD LABORATORIES, INC. **Avobenzone - Raman spectrum - SpectraBase**. Disponível em: <<https://spectrabase.com/spectrum/3qBbIR27qHz>>. Acesso em: 11 set. 2017.

BIO-RAD LABORATORIES, INC. **2-hydroxy-4-methoxybenzophenone - Raman spectrum - SpectraBase**. Disponível em: <<https://spectrabase.com/spectrum/KcBsA9CTigM>>. Acesso em: 11 set. 2017.

BOCKLITZ, T. et al. How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models? **Analytica Chimica Acta**, v. 704, n. 1–2, p. 47–56, 17 out. 2011.

BÓRIO, V. G.; FERNANDES, A. U.; SILVEIRA JR., L. **UV photostability of insect repellents evaluated through Raman spectroscopy**. Proc. of SPIE Vol I. *Anais...*2016

CARROLL, J. et al. Formulations of deet, picaridin, and IR3535 applied to skin repel nymphs of the lone star tick (Acari: Ixodidae) for 12 hours. **Journal of medical entomology**, v. 47, n. 4, p. 699–704, 2010.

CHRIT, L. et al. In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: Assessment of a new moisturizing agent, pMPC. **Biopolymers**, v. 85, n. 4, p. 359–369, 1 mar. 2007.

CIOBOTĂ, V. et al. Raman investigations of Upper Cretaceous phosphorite and black shale from Safaga District, Red Sea, Egypt. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 42–47, 24 jan. 2014.

COLIPA; CTFA; JCIA. **International sun protection factor (SPF) test method**. Brussels: COLIPA, 2006.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução No. 466, de 12 de dezembro de 2012**. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [s.l.] SciELO - Editora FIOCRUZ, 1994.

DAVIS, K. L.; KEMPER, M. S.; LEWIS, I. R. Raman Spectroscopy for Monitoring Real-Time Processes in the Pharmaceutical Industry. In: **Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy**. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2007. p. 117–162.

DE GROOT, A. C.; ROBERTS, D. W. Contact and photocontact allergy to octocrylene: a review. **Contact Dermatitis**, v. 70, n. 4, p. 193–204, abr. 2014.

DICKENS, J. C.; BOHBOT, J. D. Mini review: Mode of action of mosquito repellents. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Special Issue: Advances in Vector and Urban Pest Management and Resistance. v. 106, n. 3, p. 149–155, 1 jul. 2013.

DUTRA, E. A. et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 381–385, 2004.

EUROPEAN CHEMICAL AGENCY. **Ethyl butylacetylaminopropionate - Product-type 19 - (insect repellent)**. Disponível em: <http://dissemination.echa.europa.eu/Biocides/ActiveSubstances/1320-19/1320-19_Assessment_Report.pdf>. Acesso em: 21 maio. 2018.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869–871, 1 jun. 1988.

GERVAIS, J. A et al. **Picaridin General Fact Sheet**. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/PicaridinGen.html#whatis>>. Acesso em: 21 maio. 2018.

GILBERT, E. et al. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 3, p. 208–219, 1 jun. 2013.

GOUGE, D. **Insect Repellents** University of Arizona, , 26 ago. 2011.

GROSS, J. H. Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 1, p. 63–80, 1 jan. 2014.

HANLON, E. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in medicine and biology**, v. 45, n. 2, p. R1, 2000.

HUNTER, J. A. A.; SAVIN, J. A.; DAHL, M. V. **Clinical dermatology**. 3rd ed ed. Malden: Blackwell Science, 2002.

JAMES J. BOHNING; T. N. MISRA; M. CHOUDHURY. **C.V. Raman The Raman Effect - Landmark** American Chemical Society, , 1998. Disponível em: <<https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/ramaneffect.html>> . Acesso em: 5 abr. 2018

JENTZSCH, P. V.; RAMOS, L. A.; CIOBOTĂ, V. Handheld Raman spectroscopy for the distinction of essential oils used in the cosmetics industry. **Cosmetics**, v. 2, n. 2, p. 162–176, 27 maio 2015.

JÚNIOR, J. B. G. et al. Electroanalytical determination of the sunscreen agent octocrylene in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 1, p. 91–96, 8 set. 2011.

KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 865–871, 2008.

KLUN, J. A.; DEBBOUN, M. A new module for quantitative evaluation of repellent efficacy using human subjects. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 177–181, jan. 2000.

KUSIĆ, D. et al. Identification of water pathogens by Raman microspectroscopy. **Water Research**, v. 48, p. 179–189, 1 jan. 2014.

LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. 23 mar. 2012.

LIEBER, C. A.; MAHADEVAN-JANSEN, A. Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 57, n. 11, p. 1363–1367, nov. 2003.

LUPI, E.; HATZ, C.; SCHLAGENHAUF, P. The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. – a literature review. **Travel medicine and infectious disease**, v. 11, n. 6, p. 374–411, 2013.

LUYPAERT, J.; MASSART, D. L.; VANDER HEYDEN, Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 865–883, 15 maio 2007.

MÉLOT, M. et al. Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 138, n. 1, p. 32–39, 19 ago. 2009.

MODDARESI, M. **EU SPF Regulations: A Historical Review of Sunscreen Product Testing**. Disponível em: <<https://knowledge.ulprospector.com/6913/pcc-eu-spf-regulations-historical-review-sunscreen-product-testing/>>. Acesso em: 27 maio. 2018.

MORE, B. D. Physical sunscreens: On the comeback trail. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 73, n. 2, p. 80, 3 jan. 2007.

MOREIRA, A.; ROSMANINHO, I.; SILVA, J. P. M. DA. Urticária papular: Revisão da literatura. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 22, n. 4, p. 279–287, dez. 2014.

NAUCKE, T. J. et al. Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535® and Picaridin against *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 101, n. 1, p. 169, 1 jun. 2007.

OMS. **Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin**. Disponível em: <http://www.who.int/whopes/resources/who_htm_ntd_whopes_2009.4/en/>. Acesso em: 5 fev. 2018.

REZENDE, S. G. et al. METHODS USED IN EVALUATION OF THE SUN PROTECTION FACTOR OF SUNSCREENS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 2, p. 18, 30 jun. 2014.

RIBAS, J.; CARREÑO, A. M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 1, p. 33–38, fev. 2010.

RODRIGUEZ, S. D. et al. The efficacy of some commercially available insect repellents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 140, 2015.

RSC. **DEET** | **C₁₂H₁₇NO** | **ChemSpider**. Disponível em: <<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4133.html>>. Acesso em: 21 maio. 2018a.

RSC. **65GQA237EH** | **C₁₁H₂₁NO₃** | **ChemSpider**. Disponível em: <<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.94028.html>>. Acesso em: 21 maio. 2018b.

RSC. **Icaridin** | **C₁₂H₂₃NO₃** | **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.111359.html>>. Acesso em: 21 maio. 2018c.

RSC. **ethylhexyl methoxycinnamate** | **C₁₈H₂₆O₃** | **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21377419.html?rid=adfdf853-8363-4c54-a68b-c029448b88a0>>. Acesso em: 23 maio. 2018d.

RSC. **oxybenzone** | **C₁₄H₁₂O₃** | **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4471.html?rid=dc2860c1-0af3-4324-a231-3815bbc1dad0>>. Acesso em: 23 maio. 2018e.

RSC. **octocrylene** | **C₂₄H₂₇NO₂** | **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21165.html?rid=73409ee6-ca33-49b7-ae8b-ce0f26ff7a23>>. Acesso em: 23 maio. 2018f.

RSC. **Avobenzone** | **C₂₀H₂₂O₃** | **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.46261.html>>. Acesso em: 23 maio. 2018g.

RUSZKIEWICZ, J. A. et al. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 245–259, 1 jan. 2017.

SARDENBERG, T. A ética da pesquisa em seres humanos e a publicação de artigos científicos. **Jornal de Pneumologia**, v. 25, n. 2, p. iii–iv, abr. 1999.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. DOS. Sun protection factor: meaning and controversies. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507–515, jun. 2011.

SILVEIRA, F. L. et al. Discrimination of non - melanoma skin lesions from non - tumor human skin tissues in vivo using Raman spectroscopy and multivariate statistics. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, n. 1, p. 6–16, 21 jan. 2015.

SILVEIRA JR., L. et al. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 7, p. 077003, jul. 2012.

SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman spectroscopy: a practical approach**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

SOHN, M.; BUEHLER, T.; IMANIDIS, G. Repartition of oil miscible and water soluble UV filters in an applied sunscreen film determined by confocal Raman microspectroscopy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 861–871, 6 jul. 2016.

STEEN, C. J.; CARBONARO, P. A.; SCHWARTZ, R. A. Arthropods in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 6, p. 819–842, quiz 842–844, jun. 2004.

SYED, Z. How Repellents Work: Neurophysiological and Behavioral Analyses. In: DEBBOUN, M.; FRANCES, S.; STRICKMAN, D. (Eds.). . **Insect Repellents Handbook, Second Edition**. Flórida, EUA: CRC Press, 2014. p. 43–52.

THE EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE. **European Pharmacopoeia**. 8.7 ed. Strasbourg: The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2016.

TIPPAVAJHALA, V. K.; MENDES, T. DE O.; MARTIN, A. A. <Emphasis Type="Italic">In Vivo</Emphasis> Human Skin Penetration Study of Sunscreens by Confocal Raman Spectroscopy. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 753–760, 1 fev. 2018.

TREVISAN MARCELLO G.; POPPI RONEI J. Química Analítica de Processos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1065–1071, 1 jan. 2006.

US EPA. **Picaridin - New Pesticide Fact Sheet**. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-070705_01-May-05.pdf>. Acesso em: 21 maio. 2018.

US EPA. **Product performance test guidelines. OPPTS 810.3700**. Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100LBO3.PDF?Dockey=P100LBO3.PDF>>. Acesso em: 21 maio. 2018.

US EPA. **DEET**. Overviews and Factsheets. Disponível em: <<https://www.epa.gov/insect-repellents/deet>>. Acesso em: 21 maio. 2018.

US FDA. **Sunscreen drug products for over-the-counter human use: final monograph**. Disponível em: <<https://www.federalregister.gov/documents/1999/05/21/99-12853/sunscreen-drug-products-for-over-the-counter-human-use-final-monograph>>. Acesso em: 7 ago. 2017.

VANDENABEELE, P.; EDWARDS, H. G. M.; MOENS, L. A Decade of Raman Spectroscopy in Art and Archaeology. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 3, p. 675–686, 1 mar. 2007.

VASILIU, S. et al. Insights into the Mechanism of Polymer Coating Self-Healing Using Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 68, n. 5, p. 541–548, 1 maio 2014.

WEAVER, K. F. et al. **An introduction to statistical analysis in research: with applications in the biological and life sciences**. New York, EUA: John Wiley & Sons, 2017.

WIECHERS, J. W. Influence of Formulation Design on the Clinical Performance of Topically Applied Formulations. In: WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. (Eds.). **Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches**. Flórida, EUA: CRC Press, 2007. p. 325–337.

WOLF, R. et al. Sunscreens--the ultimate cosmetic. **Acta dermatovenerologica Croatica: ADC**, v. 11, n. 3, p. 158–162, 2003.

ZASTROW, L. et al. Integrated sun protection factor: a new sun protection factor based on free radicals generated by UV Irradiation. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 17, n. 5, p. 219–231, 2004.