



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

VALQUÍRIA RODRIGUES PEREIRA

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por
CLAE para quantificação de ácido vanílico em emulsão
cosmética**

Araraquara, SP

2022

VALQUÍRIA RODRIGUES PEREIRA

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por
CLAE para quantificação de ácido vanílico em emulsão
cosmética**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Coorientador.(a): Dr.(a). Caroline Magnani Spagnol

Araraquara, SP

2022

P436d Pereira, Valquíria Rodrigues.
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido vanílico em emulsão cosmética / Valquíria Rodrigues Pereira. – Araraquara: [S.n.], 2022.
41 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Farmácia Bioquímica.

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.
Coorientadora: Caroline Magnani Spagnol.

1. Ácido vanílico. 2. CLAE. 3. Validação de métodos analíticos. 4. Emulsão cosmética. I. Corrêa, Marcos Antonio, orient. II. Spagnol, Caroline Magnani, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso a todos os docentes e funcionários dos departamentos de Cosmetologia e Controle de Qualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família pelo apoio e incentivo. À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, por permanecerem sempre presentes nesta caminhada iluminada, oferecendo-me suporte, força e sabedoria para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Agradeço ao João Pedro pelo amor, companheirismo e paciência.

Agradeço à República Éter na Mente, em especial, à Garry, Feiju, Gospel, Skyy, Torade, Malvada, Alfa e Pós pela irmandade e acolhimento a mim proporcionados durante todo este ciclo.

Agradeço a Deus e ao meu Anjo da Guarda, por me abençoarem a cada dia e oferecerem a benção do ingresso ao ensino superior.

RESUMO

O ácido vanílico (AV), ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, também conhecido como ácido 4-hidroxi-m-anísico, é um composto fenólico derivado do ácido diidroxibenzoico. É usado como flavorizante, além de ser empregado como intermediário na produção de vanilina. Apresenta como ligantes do anel aromático um grupo carboxílico, além de uma metoxila e de uma hidroxila nas posições 3 e 4, respectivamente. Possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas, com potencial uso em formulações cosméticas. No entanto, não existem metodologias validadas para quantificação do AV nos compêndios oficiais. O processo de validação de métodos analíticos compromete-se em avaliar a relação entre os resultados experimentais e as propostas de análise do método, ou seja, tem como objetivo demonstrar que o método analítico é adequado ao seu propósito. Este estudo apresenta como finalidade o desenvolvimento e a validação da metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação de ácido vanílico em emulsão cosmética. Para tal, foi desenvolvido um sistema emulsionado óleo em água (O/A) para incorporação do ativo e, para quantificá-lo nesta emulsão, foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE baseado nos princípios da química analítica verde. Os parâmetros analisados são linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A validação foi conduzida de acordo com os guias do ICH, AOAC e ANVISA.

Palavras-chave: Ácido vanílico, CLAE, Validação de métodos analíticos, Emulsão cosmética.

ABSTRACT

Vanillic acid (VA), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, also known as 4-hydroxy-m-anisic acid, is a phenolic compound derived from dihydroxybenzoic acid. It is used as a flavoring agent, besides being used as an intermediate in the production of vanillin. It has as ligands of the aromatic ring a carboxylic group, in addition to a methoxy and a hydroxyl in the 3 and 4 positions, respectively. It has antioxidant and antimicrobial properties, with potential use in cosmetic formulations. However, there are no validated methodologies for AV quantification in official compendia. The process of validation of analytical methods undertakes to evaluate the relationship between the experimental results and the proposals of analysis of the method, that is, it aims to demonstrate that the analytical method is adequate for its purpose. The study objective is to develop and validate the analytical methodology by High Performance Liquid Chromatography for the quantification of vanillic acid in cosmetic emulsion. For this, an oil-in-water (O/W) emulsion system has been developed for incorporation of the active substance and, to quantify it in this emulsion, an analytical method was developed and validated by HPLC based on the principles of green analytical chemistry. The analyzed parameters are linearity, specificity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification and robustness. Validation was conducted in accordance with the ICH, AOAC and ANVISA guides.

Key words: vanillic acid, HPLC, validation of analytical methods, cosmetic emulsion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do ácido vanílico.....	15
Figura 2 -	Cromatograma obtido por CLAE no teste 1, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 30:70; vazão 1,0 mL.min ⁻¹ ; comprimento de onda 260 nm e coluna C ₁₈ / 250 x 4 mm / 5 µm.....	26
Figura 3 -	Cromatograma obtido por CLAE no teste 2, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 30:70; água acidificada com ácido fórmico 0,1%; vazão 1,0 mL.min ⁻¹ ; comprimento de onda 260 nm e coluna C ₁₈ / 250 x 4 mm / 5 µm.....	27
Figura 4 -	Cromatograma obtido por CLAE no teste 3, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 30:70; água e amostra acidificadas com ácido fórmico 0,1%; vazão 1,0 mL.min ⁻¹ ; comprimento de onda 260 nm e coluna C ₁₈ / 250 x 4 mm / 5 µm.....	27
Figura 5 -	Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de 100 µg.mL ⁻¹ diluídas na fase móvel, utilizando coluna Eclipse Plus C ₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 µm, Agilent); vazão 1 mL.min ⁻¹ ; detecção a 260 nm.....	29
Figura 6 -	Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico (100 µg.mL ⁻¹), em HCl 0,001 M, a 80°C.....	29
Figura 7 -	Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico (100 µg.mL ⁻¹), em NaOH 0,001 M, a 80°C.....	30
Figura 8 -	Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico (100 µg.mL ⁻¹ em água, a 80°C.....	30

Figura 9 -	Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em luz ultravioleta.....	30
Figura 10 -	Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em H_2O_2 a 80°C.....	31
Figura 11	Curva analítica do ácido vanílico obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel.....	34
Figura 12 -	Cromatograma do ácido vanílico em concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obtidas por CLAE a 260 nm.....	34
Figura 13 -	Gráfico de Resíduos.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual das emulsões.....	19
Tabela 2 - Condições cromatográficas testadas para validação do método analítico.....	21
Tabela 3 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do método CLAE.....	23
Tabela 4 - Valores obtidos a partir do teste de recuperação do ácido vanílico na emulsão por meio de CLAE.....	31
Tabela 5 - Valores obtidos a partir do teste de repetibilidade do ácido vanílico..	32
Tabela 6 - Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do ácido vanílico por CLAE.....	32
Tabela 7 - Valores das áreas referentes ao pico de ácido vanílico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico.....	33
Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) para os valores da curva analítica.....	35
Tabela 9 - Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de ácido vanílico.....	36

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES	18
3.2. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO	19
3.3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO	21
3.3.1. ESPECIFICIDADE.....	21
3.3.2. EXATIDÃO	21
3.3.3. PRECISÃO.....	22
3.3.4. LINEARIDADE	22
3.3.5. LIMITE DE DETECÇÃO	23
3.3.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	23
3.3.7. ROBUSTEZ.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO	25
4.2. ESPECIFICIDADE.....	27
4.3. EXATIDÃO	30
4.4. PRECISÃO	31
4.5. LINEARIDADE.....	31
4.6. LIMITE DE DETECÇÃO	34
4.7. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	34
4.8. ROBUSTEZ.....	34
5. CONCLUSÃO.....	35

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS37

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - os produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2015).

No que diz respeito à economia mundial, a indústria cosmética consiste em um de seus principais segmentos. Atualmente, o Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial de consumo de cosméticos e dessa maneira aproxima-se de líderes mundiais, como Estados Unidos, China e Japão. Dentre os fatores a esse crescimento, está a cultura da beleza, o envelhecimento da população e o aumento do poder de compra da classe C brasileira (ABIHPEC, 2022).

Em 2001, o Brasil foi classificado como o terceiro maior consumidor mundial de produtos cosméticos. Ao mesmo tempo, matérias primas de diferentes origens e purezas sofreram acréscimo no mercado. Desta maneira, aumentou-se a possibilidade de aparecimento de reações adversas a algum produto. Portanto, os fabricantes devem garantir ao usuário segurança e eficácia sob as condições de uso orientadas, ou sob condições razoavelmente previsíveis de uso (BRASIL, 2005). Além disso, ensaios biológicos que garantam a qualidade de produtos cosméticos tornam-se cada vez mais importantes devido ao crescimento do consumo neste setor (CORRÊA et al., 2012).

Dentre os fatores ao crescimento do consumo de cosméticos no Brasil está o envelhecimento. Caracteriza-se como um processo natural causado pelo declínio das funções fisiológicas, desencadeado por alterações moleculares e celulares, acelerado por moléculas instáveis e reativas conhecidas como radicais livres, aliado à perda da capacidade do organismo de se recuperar dessas agressões (FRIES; FRASSON, 2010). Um radical livre é qualquer espécie capaz de existir de forma independente e que contém um ou mais elétrons não pareados (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 2000).

A fim de combater os radicais livres, o organismo possui diferentes sistemas de defesa antioxidantes, porém, ao ocorrer desequilíbrio na defesa antioxidante, há um incremento no número de radicais livres, processo conhecido como estresse oxidativo. A pele está sujeita a esse processo e com o passar do tempo tornam-se visíveis mudanças em seu aspecto, como o aparecimento de rugas, aspereza, falta de pigmentação e flacidez. A formação de radicais livres é inevitável e sua eliminação total é impossível, visto que são oriundos de processos metabólicos essenciais à vida. O embasamento científico possibilitou à indústria cosmética o desenvolvimento de vários ativos cosméticos empregados em novos produtos, especialmente contendo antioxidantes, com os quais é possível retardar os efeitos cutâneos dos radicais livres (FRIES; FRASSON, 2010).

O aumento da expectativa de vida seguido do aumento da população ativa com idade mais avançada cuja atenção é mais voltada à aparência proporcionou maior destaque à temática do envelhecimento. Desta forma, os estudos nesta área tornaram-se intensos a fim de contribuir à melhoria da qualidade de vida da população durante o envelhecimento. Neste sentido, a procura de novos compostos para prevenir e atenuar todo este processo tem sido uma das prioridades na investigação e desenvolvimento de novos cosméticos, sendo os antioxidantes, renovadores celulares, *prolifting*, antimetaloproteinases de matriz, repositores de silício e neurocosméticos as classes mais utilizadas em formulações (PARRINHA, 2014).

Os produtos antissinais propõem o combate, controle ou postergação do envelhecimento cutâneo, agindo contra os radicais livres por meio da ação antioxidante, principalmente. O desenvolvimento científico possibilitou à indústria cosmética a descoberta de novos ativos, conseqüentemente, a comercialização dos produtos antissinais (BAUMANN, 2004).

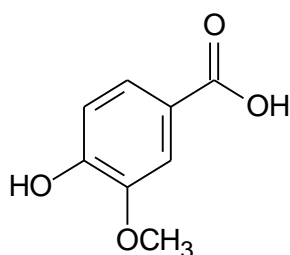
Além do envelhecimento, outro fator ao crescimento do consumo de cosméticos no Brasil é a cultura da beleza. Mercado por praias e temperaturas elevadas durante quase todo o ano, o ambiente brasileiro favorece o desnudamento e assim a centralidade que a aparência física assume na vida cotidiana é muito mais evidente. Uma cultura de enorme investimento na forma física é construída a partir da crença de que o corpo é um capital, além da profunda insatisfação com a própria

aparência. Este corpo capital pode explicar o fato do mercado de cosméticos no Brasil ser o terceiro do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos e Japão. O crescimento da indústria de beleza no Brasil é cada vez maior, especialmente com a entrada da classe C com no mercado consumidor (GOLDENBERG, 2011)

No que diz respeito ao processo de envelhecimento da população, aos radicais livres e às substâncias antioxidantes, os compostos fenólicos são de extrema importância e podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados), sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004). Os ácidos fenólicos conferem atividade antioxidante, garantida pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula (SOARES, 2002), a qual deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características possuem papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA et al., 2007).

O ácido vanílico (AV) é um exemplo de ácido fenólico do tipo ácido benzoico, cuja estrutura química está representada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura do ácido vanílico



Fonte: CASTOR, 2013

O AV (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico), também conhecido como ácido 4-hidroxi-m-anísico, é um composto derivado do ácido diidroxibenzoico. É usado como flavorizante, além de ser empregado como intermediário na produção de vanilina.

A hidroxila presente no AV confere uma atividade antioxidante (SOARES, 2002). Estudos realizados por Castor (2013) mostraram a efetividade do AV como antioxidante, quando comparado à vanilina e apocinina. Também, resultados de estudos envolvendo a ação do AV em comunidades bacterianas revelaram que o AV alterou a composição e diminuiu as comunidades de *Pseudomonas* e *Bacillus* ssp. da rizosfera do pepino, evidenciando o potencial de ação antimicrobiana desse ácido (ZHOU; WU, 2018).

Considerando a importância dos cosméticos no cenário atual e tendo em vista que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros, torna-se cada vez mais reconhecida e exigida a necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade.

A validação de um método corresponde a uma maneira de garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis, é um processo contínuo que se inicia no planejamento da estratégia analítica e estende-se ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado e, desse modo, pode ser utilizado para registro de novos produtos, sendo que todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica.

Algumas técnicas de separação vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (CE) (RIBANI et al., 2004).

Este trabalho objetiva desenvolver e validar a metodologia analítica por CLAE. Esta técnica consiste em um foco à indústria farmacêutica, uma vez que possibilita a separação de espécies não voláteis e termicamente instáveis, além de ser utilizada tanto para fins qualitativos como quantitativos (TONHI et al., 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica adequada à separação de espécies iônicas e macromoléculas, uma vez que utiliza partículas diminutas as quais garantem a alta eficiência (DEGANI et al., 1998). Necessita da utilização de um cromatógrafo composto por bomba e coluna cromatográfica que

suportem altas pressões, estas necessárias à eluição da fase móvel, detector e registrador (DEGANI et al., 1998; PERES, 2002).

Visto que a técnica de separação em questão emprega elevadas pressões, as partículas da fase estacionária passam por processo de “miniaturização”, ou seja, podem possuir redução de diâmetro (aproximadamente 5,0 μm). Este processo promove aumento da área superficial da coluna cromatográfica e conseqüentemente gera uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Além disso, torna-se possível o uso de colunas menores e volumes de amostras menores, reduzindo-se o gasto relacionado à fase móvel (FRANCO, 2015).

Na CLAE, a fase estacionária deve apresentar compatibilidade ao detector, demonstrando polaridade adequada e que garanta a separação dos componentes da amostra. A fase móvel deve corresponder a um solvente que apresente a capacidade de dissolver a amostra sem promover interação química com esta. A coluna cromatográfica deve ser formada de material inerte e resistente às altas pressões empregadas na técnica. Os detectores devem possuir ampla faixa de aplicação, sendo que os mais comuns são os espectrais (PERES, 2002).

A separação promovida pela CLAE é baseada na interação entre a amostra, fase estacionária e móvel, podendo ocorrer por adsorção, partição, exclusão molecular ou troca iônica. Para tal, a fase móvel deve mover-se pela coluna, a qual contém a fase estacionária. Nesta técnica, podem ser empregados tanto detectores de ultravioleta (mais comuns) como de fluorescência, de índice de refração ou eletroquímicos (DEGANI et al., 1998).

O presente trabalho utiliza um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (FR) (CLAE-FR). Este sistema apresenta uma fase móvel de maior polaridade e uma fase estacionária de menor polaridade. Há também a modalidade em fase normal, na qual as polaridades são invertidas. O sistema de CLAE-FR é empregado neste estudo uma vez que apresenta vantagens, como o uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo (etanol e água); fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Estes dois tipos de modalidades são também aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI et al., 2002).

A sílica tem sido o material preferível à constituição das fases estacionárias para CLAE-FR, já que apresenta características vantajosas, como a estabilidade mecânica às altas pressões; é um tipo de material passível de modificações; que possui vasta descrição na literatura e diversidade de tamanho de partículas, formas e tamanhos de poros incluída no mercado (TONHI et al., 2002).

Por outro lado, a escolha da sílica como material à preparação das fases estacionárias possui aspectos negativos. Um deles corresponde a não homogeneidade de superfície, esta formada por diferentes tipos de grupos silanóis, assim afetando o mecanismo de retenção. O outro corresponde ao fato desses grupos reagirem com fases móveis tanto ácidas como básicas, gerando dissolução e conseqüentemente perda da fase estacionária, gerando desestruturação da estrutura da coluna cromatográfica (TONHI et al., 2002).

Além disso, em meio aos resultados negativos do acelerado crescimento industrial e populacional, a responsabilidade com o meio ambiente torna-se inevitável (RODRIGUES et al., 2010). Sendo assim, é importante o desenvolvimento de um novo comportamento químico em prol da geração da menor quantidade de resíduos e substâncias tóxicas (SILVA et al., 2016).

Nessa perspectiva, uma nova maneira de direcionar as análises químicas surge a partir da década de 90. Designada *Green Chemistry*, ou química verde, esta nova prática objetiva desenvolver e aplicar produtos e processos químicos de maneira a reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (RODRIGUES et al., 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) requer o uso de solventes ao processo de separação, o que torna prática menos verde (FRANCO, 2015). Visto que o presente trabalho objetiva desenvolver e validar metodologia analítica por meio de tal técnica, torna-se necessário a substituição de solventes tóxicos por solventes “verdes”. Estes solventes caracterizam-se por serem obtidos por meio de processos renováveis, além de garantirem segurança tanto ao meio ambiente como à saúde do analista (LESELLIER; WEST, 2015).

Sendo assim, é possível praticar a CLAE garantindo responsabilidade com o meio ambiente por meio do uso de solventes “verdes”, como água e etanol. Diante da análise das condições cromatográficas, também pode ser possível tornar o processo como um todo mais “verde”. Por exemplo, pela utilização de fluidos

supercríticos, redução na taxa de fluxo da fase e no uso de solventes orgânicos, e pelo aumento na produtividade da separação cromatográfica (FRANCO, 2015).

Diante do exposto, conclui-se que o setor de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos tem mostrado grande expansão no mercado mundial e é considerado um bom foco de investimento. Além disso, muitos ativos naturais pesquisados ultimamente são compostos instáveis, podendo sofrer reações que levam à diminuição ou perda de eficácia e até mesmo a degradação do produto. Por isso, novas tecnologias vêm sendo propostas para melhorar o desempenho dos produtos cosméticos e sua aceitação pelo consumidor (DAUDT et al., 2013).

Neste cenário, os estudos das propriedades antienvhecimento das substâncias ativas vêm despertando muito interesse de pesquisadores, considerando o aumento da expectativa de tempo de vida observado nas últimas décadas e a busca da qualidade de vida durante o processo de envelhecimento (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística, 2004; SCOTTI et al., 2007).

Visto que o AV apresenta propriedades importantes e é pouco utilizado em preparações cosméticas, este estudo visa desenvolver e validar a metodologia analítica por CLAE para sua quantificação em emulsão cosmética.

2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar a metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido vanílico em emulsão cosmética priorizando a prática da química verde.

Objetivos específicos:

- Desenvolver uma emulsão cosmética tipo O/A contendo ácido vanílico;
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação de ácido vanílico por CLAE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Foram desenvolvidas emulsões óleo em água (O/A) contendo ácido vanílico em diferentes concentrações. Os constituintes das emulsões inicialmente propostas para este estudo, expostos na Tabela 1, foram devidamente pesados em balança semi-analítica em recipientes apropriados. As emulsões foram preparadas por

mistura direta da fase aquosa aquecida a 70-80°C, vertida sobre a fase oleosa a 60-70°C, sob agitação manual e mecânica até completa homogeneização (PRISTA, 1996; CORREA, 1997). As emulsões foram armazenadas em frasco opaco de dupla face, hermeticamente fechados, ao abrigo da luz e do calor. O controle foi feito através de formulação placebo (Tabela 1). Foi selecionada para continuidade dos testes a emulsão que apresentou viscosidade adequada, homogeneidade e ausência de separação de fases ou coalescência.

Tabela 1 - Composição percentual das emulsões

INCI name	F1	F2	F3	F4	Placebo
Cetearyl Alcohol	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Ceteareth 20	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glyceryl Stearate	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ethylhexyl Stearate	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Glycerin	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Phenoxyethanol	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Disodium EDTA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Vanillic acid	0,04	0,06	0,08	0,10	-
Water q.s.p.	100	100	100	100	100

3.2. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003). É um processo dinâmico e constante que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal e continua da fase de experimentos e transferência do método.

Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidência objetiva de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido. As características de desempenho investigadas no processo de validação, a fim de demonstrar o desempenho do método são: Especificidade; Exatidão; Precisão;

Limite de detecção; Limite de quantificação; Linearidade e Robustez (BARROS, 2002).

Foram testadas algumas condições cromatográficas com o objetivo de identificar a que permitirá a quantificação confiável do fármaco, redução da assimetria do pico, redução de danos à coluna cromatográfica, além de diminuir a geração de resíduos.

O equipamento Waters® foi utilizado, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i com detector UV Waters 248 e coluna Eclipse Plus C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 µm, Agilent).

A tabela 2 apresenta as condições que foram testadas na cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 2 - Condições cromatográficas testadas para validação do método analítico

Teste	Proporção de Fase Móvel (Etanol:Água)	Água Acidificada	Vazão (mL/min)	Comprimento de onda (nm)	Coluna
1	30:70	-	1,0	260	C ₁₈ / 250 x 4 mm / 5 µm
2	30:70	Ácido fórmico 0,1%	1,0	260	C ₁₈ / 250 x 4 mm / 5 µm
3	30:70	Ácido fórmico 0,1%	1,0	260	C ₁₈ / 250 x 4 mm / 5 µm

Foram realizados os seguintes cálculos:

- Estimativa do volume morto:

$$\frac{1}{2} \text{volume} = \frac{\pi \cdot (r)^2 \cdot \text{comprimento da coluna}}{2}$$

$$\text{Volume morto} = \frac{\left(\frac{\frac{1}{2} \text{volume morto}}{1000} \right)}{\text{vazão}}$$

- Fator de capacidade:

$$K = \frac{T_r - T_o}{T_o}$$

- Fator de alargamento:

$$T = \frac{(a + b)}{2a}$$

- Número de pratos:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{V_e}{W \frac{1}{2}} \right)^2$$

No qual: $W \frac{1}{2}$: largura do pico na metade da altura deste

V_e : tempo de retenção em cm/minuto

3.3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO

3.3.1. ESPECIFICIDADE

O termo especificidade define a capacidade do método em detectar o analito de interesse quando o mesmo está sob condições de estresse, o que torna possível a presença de produtos de degradação.

A realização desta análise deu-se pelo preparo da solução padrão de ácido vanílico $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em balão de 100 mL, posteriormente dividida em 5 frascos-shot, cada um contendo 15 mL da solução padrão, e o volume completado para 25 mL com: (1) solução de ácido clorídrico 0,001 M; (2) Solução de hidróxido de sódio 0,001 M; (3) solução oxidativa contendo peróxido de hidrogênio 3%; (4 e 5) água, sendo que (4) foi exposto a luz ultravioleta (254 nm) e que todos ficaram expostos à água a 80°C , exceto (4), a 25°C . O período de exposição de todos os frascos correspondeu a oito horas, o que tornou possível a análise de picos de degradação.

3.3.2. EXATIDÃO

A exatidão é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico. O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para seu estudo, sendo que reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO, 2003).

Desta maneira, este ensaio foi realizado por meio de triplicatas, adicionando três níveis de concentrações de solução de ácido vanílico às amostras, em relação à

concentração de trabalho: 80 (R1); 100 (R2) e 120% (R3), nas respectivas concentrações: 48; 60 e 72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para cada nível de concentração, a porcentagem de recuperação foi calculada. Assim, tornou-se possível avaliar a exatidão do método ao determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do método CLAE

Soluções	Volume adicionado de emulsão base (μL)	Volume adicionado de padrão (μL)	Concentração final teórica ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recuperação
R1	1000	2400	48	80%
R2	1000	3000	60	100%
R3	1000	3600	72	120%
P	-	3000	60	100%

3.3.3. PRECISÃO

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Usualmente, é expressa como o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas (BRITO, 2003). Neste estudo, a precisão foi avaliada por meio da repetibilidade, sendo que sete réplicas da solução de ácido vanílico na concentração de 60,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista, e o desvio padrão relativo (DPR) entre as respectivas análises calculado.

3.3.4. LINEARIDADE

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito em uma faixa analítica especificada (BRITO, 2003).

Para avaliação da linearidade, foram preparadas, em triplicata, cinco soluções padrão de ácido vanílico em diferentes concentrações: Padrão 1: 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Padrão 2: 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Padrão 3: 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Padrão 4: 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Padrão 5: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Foi verificada a relação linear entre os resultados por meio do coeficiente de variação em relação ao fator de resposta de cada concentração.

3.3.5. LIMITE DE DETECÇÃO

É a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (BRITO, 2003). O limite de detecção (LD) do ácido vanílico pode ser determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva analítica, conforme a equação apresentada abaixo:

$$LD = \frac{DPa \cdot 3,3}{IC}$$

Na qual:

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC: inclinação da curva analítica.

3.3.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (BRITO, 2003). O LQ do ácido vanílico pode ser determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva analítica, conforme a equação apresentada abaixo:

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{IC}$$

Em que:

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC: inclinação da curva analítica.

3.3.7. ROBUSTEZ

A robustez de um método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros analíticos do

método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal (BRITO, 2003). Por meio deste tipo de avaliação, constata-se as precauções que devem ser incluídas no procedimento para controlar o processo. Sendo assim, o parâmetro que apresenta maior variação nas medições deve ser controlado e monitorado durante as análises de rotina (BRASIL, 2003).

Neste estudo, a robustez foi avaliada por meio de modificações nas condições cromatográficas previamente estabelecidas. Injetou-se em CLAE o padrão 60 µg/mL, alterando-se as variáveis:

- Comprimento de onda: 259 nm; 260 nm e 261 nm.
- Vazão da fase móvel: 0,98 mL.min⁻¹; 1,00 mL.min⁻¹ e 1,02 mL.min⁻¹.
- Proporção da fase móvel: etanol e água 25:75; 30:70 e 35:65.
- Volume de injeção: 18 µL; 20 µL e 22 µL.
- Fabricante do etanol: JT Baker® e Scharlau®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos desenvolvidos foram comparados por análise estatística utilizando a análise de variância (ANOVA) disponível no programa Excel (MS Office), com um nível de significância de 95%. Na validação dos métodos, foram utilizados critérios de aceitação segundo o ICH e a RDC 166, de 25 de julho de 2017.

Na linearidade, foram consideradas satisfatórias as curvas analíticas que demonstraram um coeficiente de correlação superior a 0,999. Além disso, as curvas analíticas foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA), disponível no programa Excel (MS Office). No teste de hipótese da significância da regressão, a hipótese nula (H₀) considerou o coeficiente angular $b \neq 0$ e a hipótese alternativa (H₁), $b = 0$. Se o valor de F calculado for maior do que F tabelado, a hipótese nula é rejeitada e a alternativa aceita, evidenciando a linearidade no intervalo estudado, isto é, a reta passa próxima à origem. Caso contrário, indica que o método está sujeito a erros sistemáticos. A especificidade foi verificada pela ausência de resposta do placebo no método empregado e pela detecção do analito em condições de estresse.

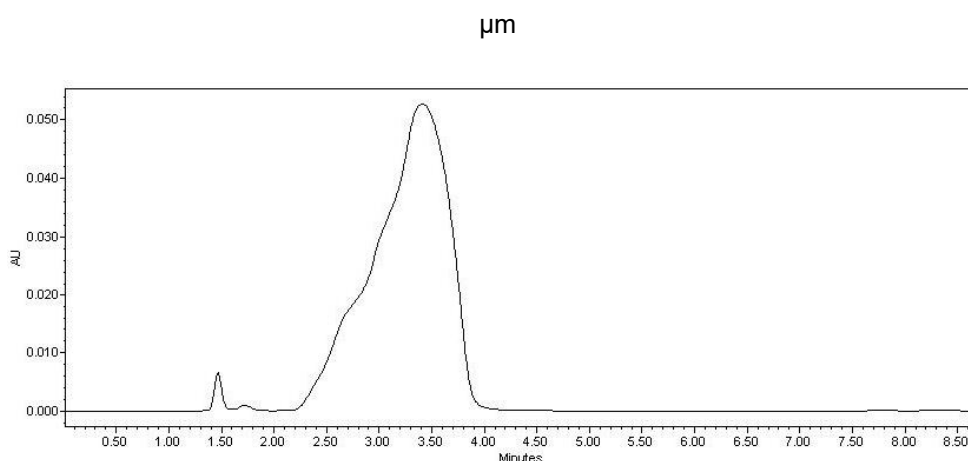
A precisão dos métodos foi considerada adequada quando foram obtidas estimativas de desvio padrão relativo entre as determinações inferiores a 2% (USP, 2008). Na exatidão, valores entre 98,0% e 102,0% foram considerados adequados (MARQUES; BROW, 2002). A robustez foi avaliada pela influência das variações nos resultados finais. Este teste permite ordenar a influência das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma das variações.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados para observar se as análises foram conduzidas em concentrações acima desses valores. Na concentração correspondente ao limite de quantificação, foram feitos testes de precisão e recuperação, os quais devem produzir valores aceitáveis (estimativo de desvio padrão relativo inferiores a 2% e recuperação entre 98,0% e 102,0%).

4.1. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO

No teste 1, apresentado na Tabela 2, é possível observar, por meio da Figura 2, a obtenção de um pico largo; assimétrico e que apresentou fronting (parte anterior do pico demonstra-se mais larga).

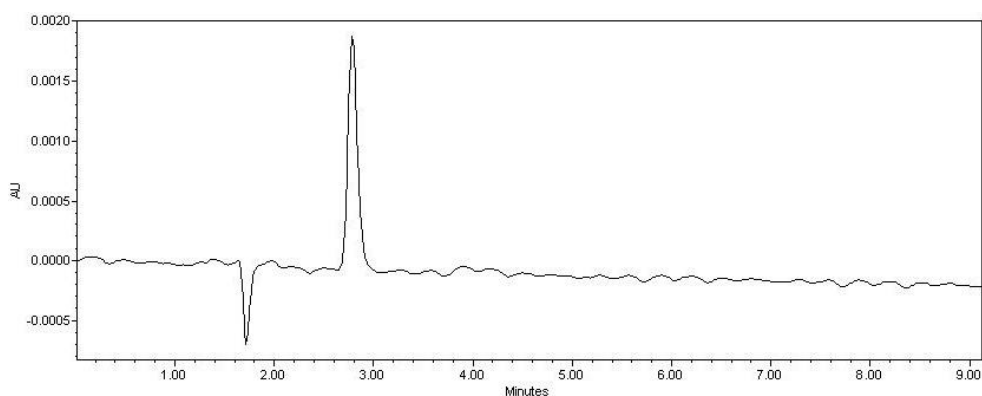
Figura 2 - Cromatograma obtido por CLAE no teste 1, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 30:70; vazão 1,0 mL.min⁻¹; comprimento de onda 260 nm e coluna C₁₈ /250 x 4 mm/5



Tendo em vista que substâncias ionizáveis tendem a apresentar picos com caudas, uma possível solução para tal seria otimizar o sistema, para que assim apenas uma das formas estivesse presente. Dessa maneira, no teste 2, a fase móvel (água) foi acidificada com ácido fórmico 0,1%. É possível observar, por meio da

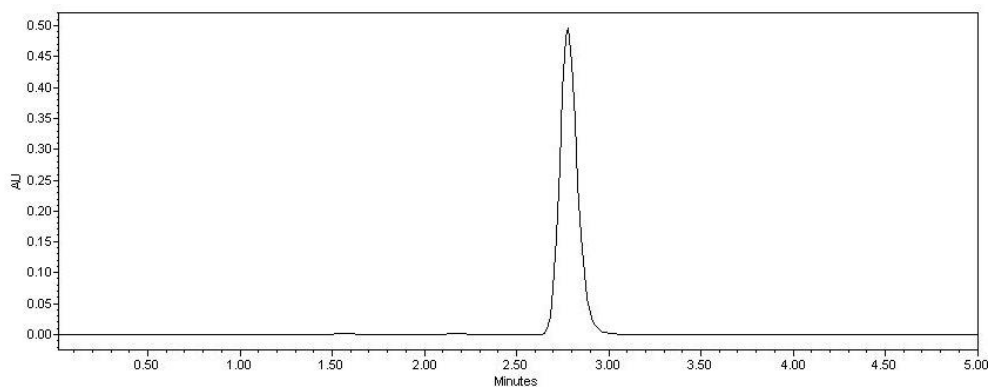
Figura 3, que tal alteração não foi eficiente e o resultado cromatográfico ainda se demonstrou insatisfatório, já que a linha de base apresentou irregularidades.

Figura 3 - Cromatograma obtido por CLAE no teste 2, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 30:70; água acidificada com ácido fórmico 0,1%; vazão 1,0 mL.min⁻¹; comprimento de onda 260 nm e coluna C₁₈ / 250 x 4 mm / 5 μm



Visando melhorar as características cromatográficas observadas anteriormente, no teste 3 a solução estoque da amostra também foi acidificada com ácido fórmico 0,1%. Por meio da Figura 4, é possível observar a obtenção de um pico que apresenta parâmetros de conformidade com um sistema cromatográfico adequado.

Figura 4. Cromatograma obtido por CLAE no teste 3, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 30:70; água e amostra acidificadas com ácido fórmico 0,1%; vazão 1,0 mL.min⁻¹; comprimento de onda 260 nm e coluna C₁₈ / 250 x 4 mm / 5 μm



Como apresentado em 4.2., foram realizados os seguintes cálculos:

- Estimativa do volume morto:

Sendo:

- Diâmetro= 4,6 mm e raio= 2,3 mm

- Comprimento= 150 mm

$$\frac{1}{2} \text{ volume} = \frac{3,14 \cdot (2,3)^2 \cdot 150}{2} = 1245,795$$

$$\text{Volume morto} = \frac{\left(\frac{1245,795}{1000}\right)}{1} = 1,25$$

- Fator de capacidade:

$$K = \frac{2,78 - 1,25}{1,25} = 1,224$$

- Fator de alargamento:

$$T = \frac{(0,925 + 0,925)}{2 \cdot (0,925)} = 1$$

- Número de pratos:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{14,8}{0,55}\right)^2 = 4011,51$$

Por meio dos testes citados anteriormente, pode-se assumir que a conservação da coluna; a diminuição da geração de resíduos; o número de pratos teóricos; a altura e largura do pico; a simetria e a quantificação confiável do ativo podem ser garantidas por meio do uso da fase móvel composta por etanol:água purificada (30:70 v/v); vazão 1,0 mL/min, sendo a água e a amostra acidificadas com ácido fórmico 0,1%.

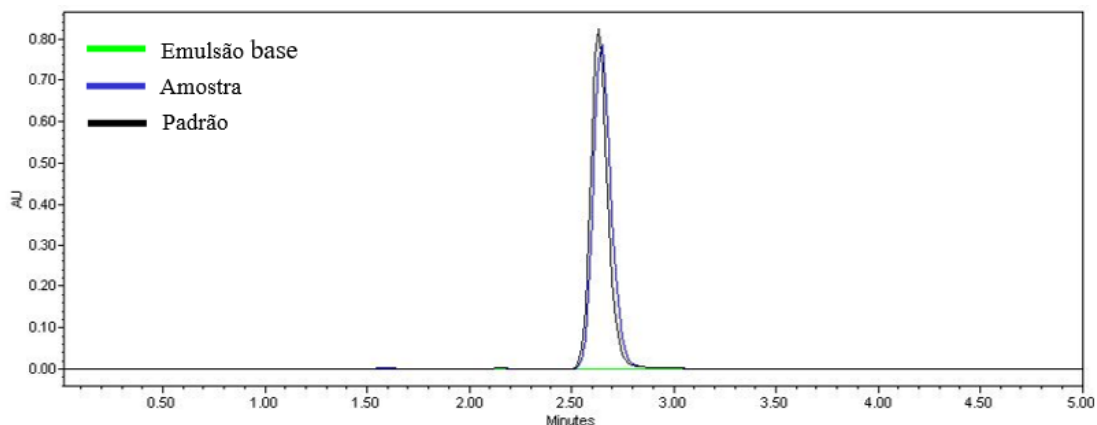
4.2. ESPECIFICIDADE

Prepararam-se soluções estoques contendo amostra da emulsão tanto com como sem ácido vanílico, além do padrão contendo, para comparação, somente AV, sendo que as concentrações finais de todas as amostras corresponderam a 100 µg.mL⁻¹ em etanol. A respectiva leitura de cada amostra foi realizada em CLAE de maneira individual, sendo que posteriormente os picos foram sobrepostos a fim de gerar uma melhor visualização e detecção de possíveis contaminantes.

Visto que não foram registrados picos na solução com a emulsão base, mesmo que próximos ou no mesmo tempo de retenção do AV, estes não interferiram na análise.

A Figura 5 representa a injeção da amostra e base da emulsão em relação ao padrão de AV a 100 µg.mL⁻¹.

Figura 5 - Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ diluídas na fase móvel, utilizando coluna Eclipse Plus C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 μm , Agilent); vazão 1 mL.min⁻¹; detecção a 260 nm



Foram preparadas diferentes soluções contendo o AV na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que foram expostas a degradação ácida; básica; oxidativa; fotolítica e em alta temperatura, para a condição de estresse. Estas soluções, após o período de exposição, foram injetadas no equipamento. As figuras 6 a 10 apresentam os cromatogramas obtidos.

Figura 6 - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em HCl 0,001 M, a 80°C

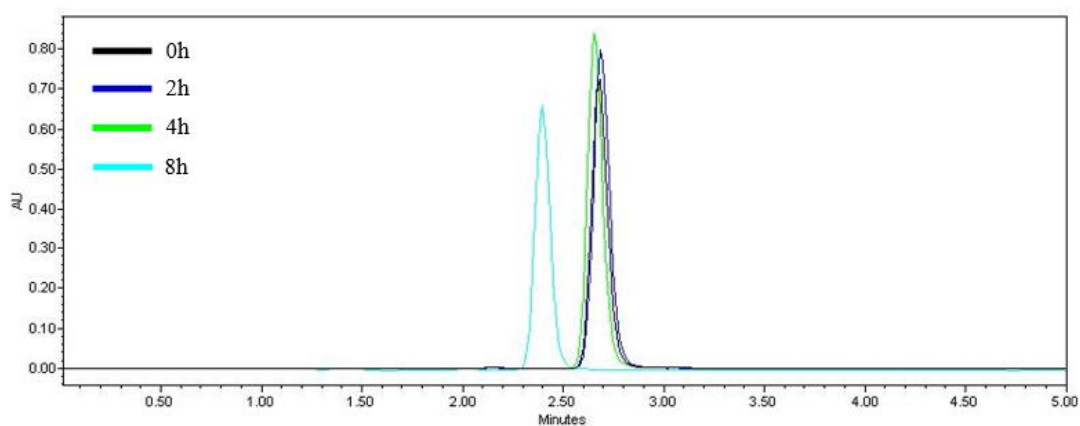


Figura 7 - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em NaOH $0,001 \text{ M}$, a 80°C

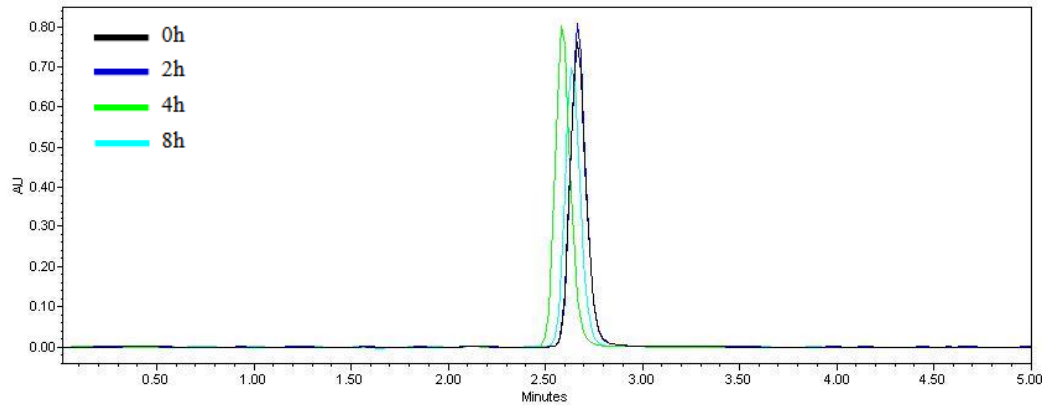


Figura 8 - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em água, a 80°C

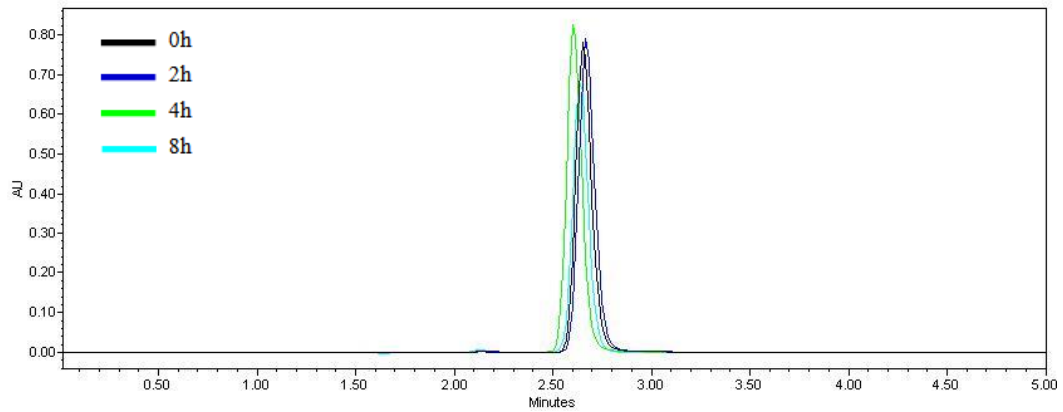


Figura 9 - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em luz ultravioleta

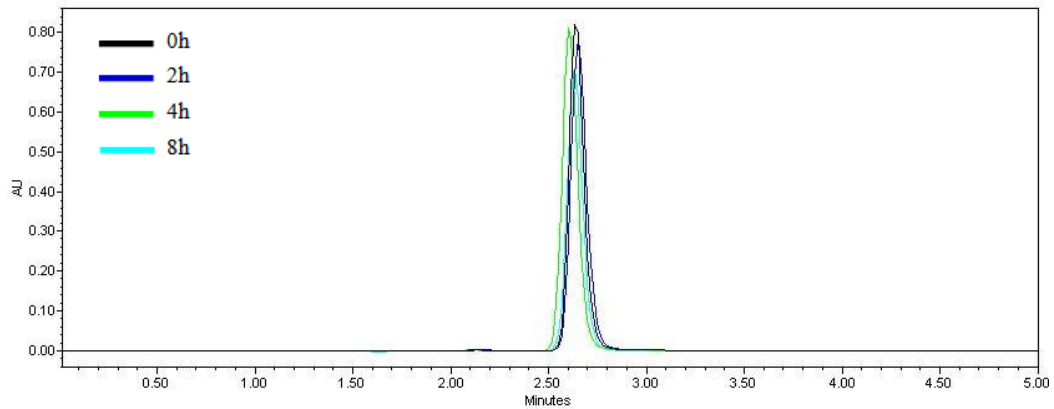
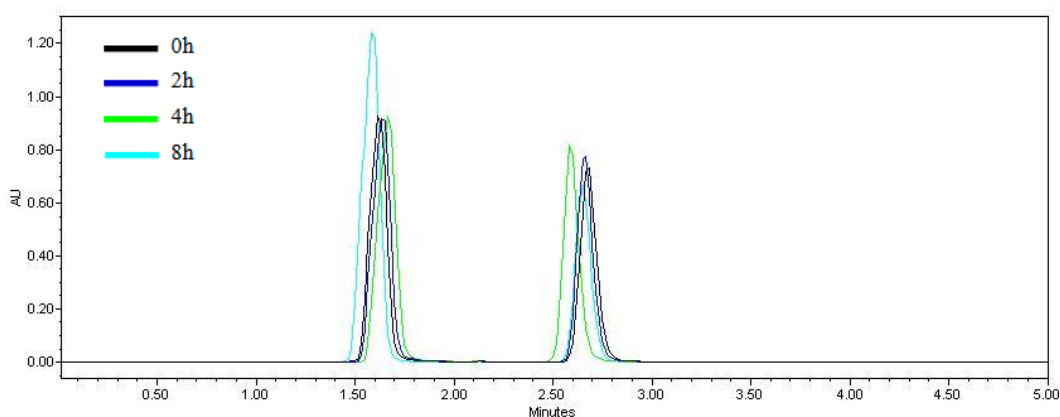


Figura 10 - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido vanílico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em H_2O_2 a 80°C



A partir dos cromatogramas apresentados, observa-se que não existem interferentes no pico de análise do AV, ou seja, não foram identificados picos próximos ao tempo de retenção do padrão. No entanto, a análise da Figura 10 (condição com H_2O_2) torna possível o reconhecimento de outro pico, o que sugere a existência de produtos de degradação.

4.3. EXATIDÃO

A tabela 4 apresenta os valores obtidos a partir do teste de recuperação do ácido vanílico na emulsão por meio do método CLAE.

Tabela 4 - Valores obtidos a partir do teste de recuperação do ácido vanílico na emulsão por meio de CLAE

	AV adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	AV recuperado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR
R1	48	50,92	106,07		
R2	60	58,79	97,98	101,88	3,98
R3	72	73,15	101,60		

DPR: desvio padrão relativo

A partir da análise dos resultados obtidos neste ensaio, o método pode ser considerado exato, já que o valor de recuperação média para a emulsão (101,88%) demonstra que há concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (BRITO, 2003).

4.4. PRECISÃO

A tabela 5 apresenta os valores obtidos a partir do teste de repetibilidade de sete réplicas da solução de ácido vanílico 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista.

Tabela 5 - Valores obtidos a partir do teste de repetibilidade do ácido vanílico

60 mg.mL ⁻¹ 1	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Área 7	Média	DPR (%)
	4613040	4548042	4636833	4617188	4591603	4613444	4613663	4604830,43	0,61

DPR: desvio padrão relativo

A partir da análise dos resultados obtidos neste ensaio, o método pode ser considerado preciso, já que o valor de desvio padrão relativo (0,61%) demonstra que há proximidade entre as várias medidas efetuadas na mesma amostra (BRITO, 2003).

4.5. LINEARIDADE

Os valores das áreas obtidas para a curva analítica de ácido vanílico estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores das áreas referentes ao pico de ácido vanílico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico

Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)	1ª curva	2ª curva	3ª curva	Média	DP	DPR (%)
20	1735390,6667	1671772,0000	1596512,0000	1667891,5556	69520,6041	4,1682
40	3127997,6667	3372872,3333	2963721,6667	3154863,8889	205894,1777	6,5262
60	4724746,0000	4931162,6667	4498356,3333	4718088,3333	216479,9620	4,5883
80	6338551,0000	6594639,0000	6057341,3333	6330177,1111	268746,6970	4,2455
100	7255356,3333	8049902,0000	7274989,6667	7526749,3333	453169,8373	6,0208

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

Construiu-se, com as médias dos valores das áreas das três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade, a curva analítica do AV (Figura 11) nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, corresponde a $y = 74.465,1439x + 211.645,4111$, com $R^2 = 0,9979$. O coeficiente de correlação foi satisfatório, dessa maneira indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

Por meio da Figura 12 é possível observar o cromatograma com os picos das concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AV.

Figura 11 - Curva analítica do ácido vanílico obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel

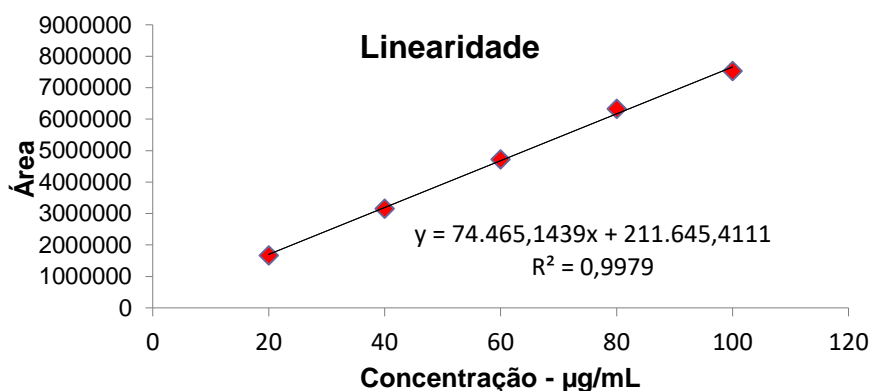
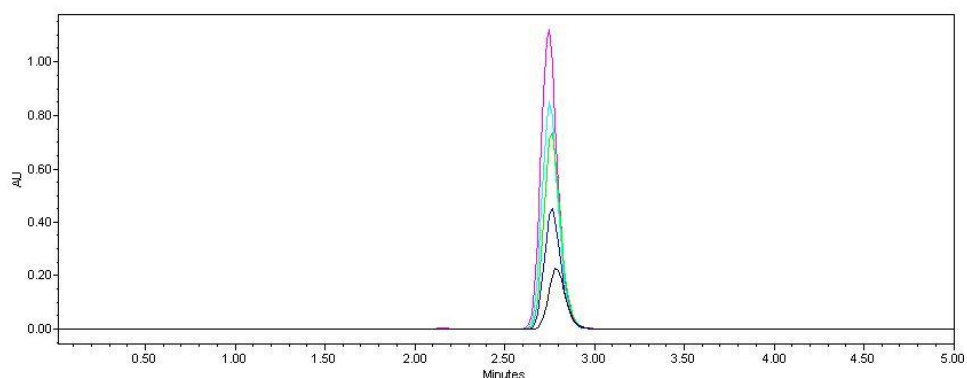


Figura 12 - Cromatograma do ácido vanílico em concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtidas por CLAE a 260 nm



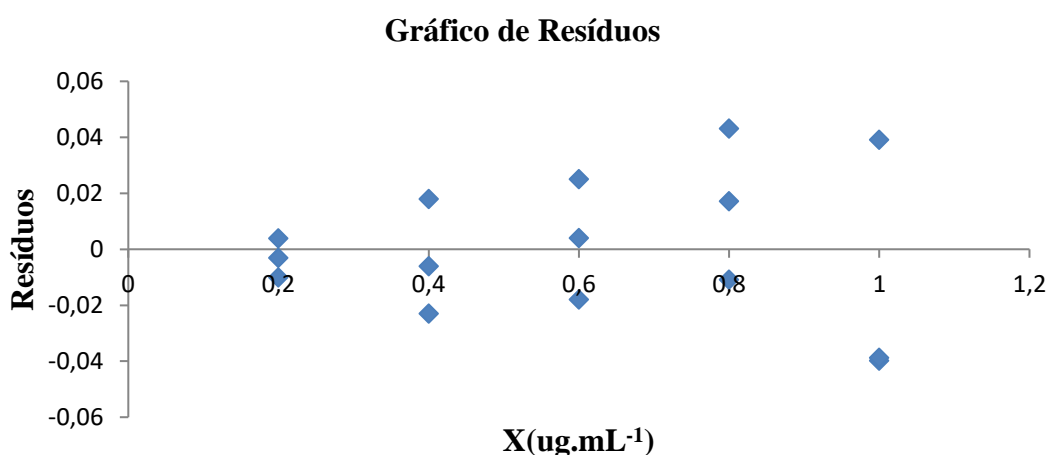
Após a construção da curva analítica e a constatação de que os valores se apresentaram lineares pelo R^2 encontrado (0,9979), foi realizada, na Tabela 8, a

análise de variância (ANOVA) para os respectivos valores e feita a análise residual por meio do gráfico de resíduos, este apresentado na Figura 13.

Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) para os valores da curva analítica

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	VARIÂNCIA	F calc	F tab (0,05)
ENTRE DOSES	4	0,66688	0,16672	224,12	3,48
REGRESSÃO LINEAR	1	0,66447	0,66447	893,27	4,96
DESVIO LINEARIDADE	3	0,00240	0,0008007	1,08	3,71
DENTRO (RESÍDUO)	10	0,00744	0,000743867	-	-
TOTAL	14	0,67431	-	-	-

Figura 13 - Gráfico de Resíduos



Na análise da variância (ANOVA, Tabela 8), foi possível constatar que não houve variação significativa entre as doses, uma vez que F calculado (224,12) > F tabelado (3,48), que o desvio da linearidade também não foi significativo, pois F calculado (1,08) < F tabelado (3,71) e que a regressão linear foi significativa, visto que F calculado (893,27) > F tabelado (4,96).

O gráfico de dispersão dos resíduos (Figura 13) apresentou resultados favoráveis, já que valores não ultrapassaram o intervalo entre 2 e -2 no eixo vertical, garantindo assim a linearidade do método.

4.6. LIMITE DE DETECÇÃO

Aplicando-se na equação os valores apresentados na Tabela 6, obteve-se que a concentração mínima que o método analítico é capaz de detectar corresponde a 5,75 µg.mL⁻¹ de ácido vanílico.

$$LD = \frac{129.719,63 \cdot 3,3}{74.465,14} = 5,75$$

Tabela 6 - Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do ácido vanílico por CLAE

	Intercepção com o eixo Y	Inclinação Curva Analítica
Curva 1	361.262,93	71.252,42
Curva 2	130.661,60	79.890,13
Curva 3	143.011,70	72.252,88
Média	211.645,41	74.465,14
Desvio Padrão	129.719,63	4.724,73

O valor de limite de detecção deve ser menor que a primeira concentração usada, ou seja, menor que 20 µg.mL⁻¹, a fim de mostrar que a quantidade usada é suficiente para detectar o AV.

4.7. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Aplicando-se na equação os valores apresentados na Tabela 6, obteve-se que a concentração mínima que o método analítico é capaz de detectar corresponde a 17,42 µg.mL⁻¹ de ácido vanílico.

$$LQ = \frac{129.719,63 \cdot 10}{74.465,14} = 17,42$$

O valor de limite de quantificação deve ser menor que a primeira concentração usada, ou seja, menor que 20 µg.mL⁻¹, a fim de mostrar que a quantidade usada é suficiente para quantificar o AV.

4.8. ROBUSTEZ

A robustez foi avaliada por meio de modificações nas condições cromatográficas previamente estabelecidas, tais como vazão de fase móvel;

comprimento de onda; proporção etanol: água na fase móvel; volume de injeção e marca do solvente utilizado. Os valores obtidos após estas modificações apresentaram desvio padrão relativo (DPR) menor que 5%, ou seja, as pequenas alterações proporcionadas não provocaram variações significativas nos resultados obtidos, o que indica que o método é robusto, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 - Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de ácido vanílico

Variável	Faixa investigada	AV (%)	DPR (%)
Comprimento de onda para leitura dos resultados (nm)	259	60,00	1,2804
	260	60,10	
	261	61,39	
Vazão da Fase móvel (mL/min)	0,98	60,00	1,3885
	1,00	58,53	
	1,02	58,64	
Proporção etanol: água na fase móvel	25:75	59,67	0,8413
	30:70	60,00	
	35:65	60,66	
Volume de injeção (µL)	18	59,40	0,5484
	20	60,00	
	22	59,48	
Fabricante do etanol	JT Baker®	60,00	0,1147
	Scharlau®	60,10	

DPR: Desvio padrão relativo

5. CONCLUSÃO

Neste estudo o método analítico desenvolvido foi validado, assim assegurando todos os parâmetros de especificidade; exatidão; precisão; limite de detecção; limite de quantificação; linearidade e robustez estabelecidos.

De acordo com as diferentes condições cromatográficas testadas e seus respectivos resultados, tornou-se possível identificar a opção mais satisfatória para a

realização dos testes para validação do método, sendo nela utilizada proporção de fase móvel (etanol:água) 30:70; água e solução estoque da amostra acidificadas com ácido fórmico 0,1%; vazão de 1,0 mL.min⁻¹; comprimento de onda correspondente a 260 nm e coluna Eclipse Plus C₁₈ / 150 x 4,6mm / 5 µm. A partir deste conjunto de condições cromatográficas, pode-se assumir que a conservação da coluna; a diminuição da geração de resíduos; o número de pratos teóricos; a altura e largura do pico; a simetria e a quantificação confiável do ativo podem ser garantidas.

A partir dos testes de estresse realizados, observa-se que não existem interferentes no pico de análise do AV, ou seja, não foram identificados picos próximos ao tempo de retenção do padrão. No entanto, a análise da condição de H₂O₂ torna possível o reconhecimento de outro pico, o que sugere a existência de produtos de degradação.

A análise dos resultados obtidos neste ensaio permite afirmar que o método pode ser considerado exato, já que o valor de recuperação média para a emulsão demonstra que há concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (BRITO, 2003).

A precisão deste método pôde ser determinada por meio do teste de repetibilidade, visto que o valor de desvio padrão relativo demonstra que há proximidade entre as várias medidas efetuadas na mesma amostra (BRITO, 2003).

Os valores de limite de detecção e de limite de quantificação foram calculados e demonstraram ser menores que a primeira concentração utilizada, ou seja, menores que 20 µg.mL⁻¹, o que indica que a quantidade utilizada foi suficiente para detectar e quantificar o método.

Na análise da linearidade, o coeficiente de correlação obtido foi satisfatório, desta maneira indicando excelente correlação linear entre os dados analisados. Além disso, a análise da variância (ANOVA) permitiu constatar que não houve variação significativa entre as doses, que o desvio da linearidade também não foi significativo, e que a regressão linear foi significativa. O gráfico de dispersão dos resíduos apresentou resultados favoráveis, garantindo assim a linearidade do método.

Para a robustez, os valores obtidos após as modificações apresentaram desvio padrão relativo (DPR) menor que 5%, ou seja, as pequenas alterações proporcionadas não provocaram variações significativas nos resultados obtidos, o que indica que o método é robusto.

Desta maneira, foi possível desenvolver e validar a metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido vanílico em emulsão cosmética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. Panorama do Setor Maio 2022. São Paulo, 2021. <https://abihpec.org.br>. Acesso em: 14 jun. 2022.

ALMEIDA, M.G.J.; CHIARI, B.G.; CORREA, M.A.; MAN CHIN, C.; ISAAC, V.L.B. Validation of an alternative analytical method for the quantification of antioxidant activity in plant extracts. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 32, p. 90-95, 2013.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 92, de 9 de dezembro de 2008. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0092_09_12_2008.html

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 07, de 10 de fevereiro de 2015, Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências..". <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/29327>.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 175-177, Jul./Dez. 2002.

BAUMANN, L. **Dermatologia cosmética**: Princípios e práticas. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 332/05, de 1 de dezembro de 2005. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/cosmetovigilancia>.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Seção 1, ano. 154, n. 141, p. 87-89, 2017. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&data=25/07/2017&pagina=87>.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, Jan./Dez. 2003.

CASTOR, L. R. G Propriedades Químicas e Farmacológicas da Apocinina , Vanilina e Ácido Vanílico. , 2013. Disponível em:

<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102430/000738081.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

CHIARI, B.G.; MAGNANI, C.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323-330, 2012.

CORREA, M. A. **Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica**. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997 146p.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.65, n.3, Julho 2013.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, São Paulo, n.7, p.21-25, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

FRANCO, L. G. **Cromatografia Verde**. Trabalho de conclusão de Curso (Licenciatura em Química) Faculdade de Ciências – Departamento de Química, Bauru, 2015. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/124229>.

FRIES, A.T.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto & Saúde**, Ijuí, Unijuí, v. 10, n.19, p. 17-23, Jul./Dez. 2010.

GOLDENBERG, M. Corpo, envelhecimento e felicidade na cultura brasileira. **Contemporânea**, v. 9, n. 2, 2011. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/contemporanea/article/view/2143>.

HAKKINEN, S. H.; KÄRENLAMPI, O.S.; HEINONEN, I.M.; MYKKÄNEN, M.H.; TÖRRÖNEN, A.R. HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries. **J Sci Food Agric**, v.77, p. 543-551, 1998.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3th.ed.New York: Oxford Science Publications, 2000. 936p.

LESELLIER, E.; WEST, C. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. **Journal of Chromatography A**. v.1382, p. 2-46, 2015.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Rev. Anal.**, n.1, p. 48-51, 2002.

PARRINHA, A. R. G. **Novas Tendências em Cosmética Anti-envelhecimento**. 2014. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Escola de Ciências e Tecnologia da Saúde, Lisboa.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n.2, p.227-229, 2002.

PÓVOA FILHO, H. Antioxidantes. In: PÓVOA, H. **Radicais Livres: em Patologia Humana**. Rio de Janeiro: Imago, 1995, p.211-246.

PRISTA, L. N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. p.600.

PUSSAYANAWIN, V.; WETZEL, D.L.; FULCHER, R.G. Fluorescence Detection and Measurement of Ferulic Acid in Wheat Milling Fractions by Microscopy and HPLC. **J. Agric. Food Chem**, v. 36, p. 515-520, 1988.

RODRIGUES, G. D.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. **Química Nova**, São Paulo, v.33, n. 6, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L.F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, Abr./Jun., 2007.

SILVA, B. B.; VAL, B. S. R.; GOMES, S. M. S.; GOMES, T. N. C.; AVERSA, T. M.; ALMEIDA, Q. A. R. Utilização dos conceitos da Química Verde nas aulas práticas de laboratório. Divisão de Ensino de Química da Sociedade Brasileira de Química (ED/SBQ), Dpto de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (QMC/UFSC). XVIII Encontro Nacional de Ensino de Química (XVIII ENEQ) Florianópolis, SC, Brasil –25 a 28 de julho de 2016.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-8, Jan. 2002.

SOUSA, C.M.M.S.; SILVA, H.R.; JUNIOR, G.M.V.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPAGNOL, C. M.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Validation of HPLC–UV Assay of Caffeic Acid in Emulsions. **Journal of Chromatographic Science**, v. 34, n. 3, p. 305-311, Out. 2015.

SPENCE, A.R. **Anatomia Humana Básica**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1991.

TONHI, E., COLLINS, K.E., JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

QUIROGA, M.I.; GUILLOT, C.F. **Cosmética Dermatológica Prática**. 5.ed. Buenos Aires: Atheneu, 1987

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres**: o programa de saúde dos antioxidantes. Rio de Janeiro: Campus, 1995. 151p.

ZHOU, X.; WU, F. Vanillic acid changed cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling rhizosphere total bacterial, *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. communities. **Nature: Scientific Reports**, v. 8, Article number: 4929, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23406-2>.