

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANÁLITICA

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL  
CONTROL DE FILTROS UV DE NATURALEZA ORGÁNICA  
EN PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LA PROTECCIÓN  
SOLAR

ALBERTO CHISVERT SANÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 7 d'  
Abril de 2003 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores Luque de Castro
- D. Luis Fermín Capitán Vallvey
- D<sup>a</sup>. Marta Elena Díaz García
- D. Alan Townshend
- D<sup>a</sup>. Adela Sevillano Cabeza

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Amparo Salvador Carreño

©Copyright: Servei de Publicacions  
Alberto Chisvert Sanía

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6884-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA EL CONTROL DE FILTROS UV  
DE NATURALEZA ORGÁNICA  
EN PRODUCTOS COSMÉTICOS  
PARA LA PROTECCIÓN SOLAR

**TESIS DOCTORAL**

Alberto Chisvert Sanía

Valencia, 2003

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA EL CONTROL DE FILTROS UV  
DE NATURALEZA ORGÁNICA  
EN PRODUCTOS COSMÉTICOS  
PARA LA PROTECCIÓN SOLAR

Memoria presentada por D. Alberto Chisvert Sanía  
para la obtención del título de Doctor en Química  
(modalidad de Doctorado Europeo).

Valencia, 2003





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Departamento de Química Analítica  
Avda. Dr. Moliner, 50  
46100-Burjassot (Valencia)

---

Dr. D. CARLOS MONGAY FERNÁNDEZ, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València,

## INFORMA

Que la presente memoria, titulada “**Desarrollo de métodos analíticos para el control de filtros UV de naturaleza orgánica en productos cosméticos para la protección solar**”, que presenta D. Alberto Chisvert Sanía para optar al Grado de Doctor en Química (modalidad de Doctorado Europeo), ha sido realizada bajo la dirección de la profesora Dra. Dña. Amparo Salvador Carreño en el Departamento de Química Analítica de la Universitat de València.

Y para que así conste, firmo el presente informe en València, a 9 de enero de 2003.





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Departamento de Química Analítica  
Avda. Dr. Moliner, 50  
46100-Burjassot (Valencia)

---

Amparo Salvador Carreño, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universitat de València, en calidad de Directora de la Tesis Doctoral (modalidad de Doctorado Europeo) presentada por D. Alberto Chisvert Sanía, con el título **“Desarrollo de métodos analíticos para el control de filtros UV de naturaleza orgánica en productos cosméticos para la protección solar”**,

#### CERTIFICA

Que la citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universitat de València, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Universitat de les Illes Balears y en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de Hull (Reino Unido), y que, a su juicio, reúne los requisitos necesarios exigidos en este tipo de trabajos.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en València, a 9 de enero de 2003.

Fdo. A. Salvador





*A mi padre, por cómo se sentiría.*



## AGRADECIMIENTOS

Cuando uno empieza a escribir *“los agradecimientos”* siente el alivio de que la redacción de todo el trabajo llevado a cabo en los últimos años llega a su fin, y se da cuenta que esta parte es la que más esfuerzo requiere por la multitud de personas que han contribuido, de una forma u otra, al desarrollo de esta Tesis Doctoral, y surge el temor (por mi parte) de olvidar, inconscientemente, a alguna de ellas. A muchas de estas personas están indudablemente unidas anécdotas de todo tipo. A todas ellas agradezco de todo corazón la ayuda prestada y los momentos compartidos, así como los conocimientos transmitidos:

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología, por la beca predoctoral concedida.

Al Departamento de Química Analítica de la Universitat de València por haberme permitido realizar este trabajo.

Al personal de administración y servicios del Departamento, especialmente a Javier García (cuya “r” está desgastada de la multitud de veces que tanto yo como otros doctorandos le hemos llamado para que nos solucionase los problemas informáticos que todos padecemos).

A todos los profesores del Departamento, en los que siempre he encontrado ayuda cuando la he necesitado. Muy especialmente a Adela Sevillano, a la que admiro, respeto y guardo un gran cariño.

A Carmen Pascual, por el tiempo que me dedicó durante los primeros años de esta Tesis Doctoral.

A todos los compañeros del Departamento, sobretodo a Adela Maurí, Carmen Molins, Jorge Verdú, Luis Tortajada, Susana Messeguer y Yolanda Moliner que además han sido compañeros de sobremesa durante todo este tiempo.

A aquellos compañeros de laboratorio que durante la realización de sus Proyectos Final de Carrera coincidieron conmigo, especialmente a Txiki, Loli y Amparo Rodríguez.

A “mi hermana pequeña” (como yo digo) Loli, por compartir tantos y tantos momentos de risas en el laboratorio, y a la que deseo que algún día alcance el grado de doctor.

A Amparo Cháfer, por su ayuda incondicional.

A Maite Vidal, por su ayuda en los trabajos realizados conjuntamente y que sin su optimismo me hubiera resultado muy duro verles el final.

A mis amigos-compañeros de licenciatura, en especial a Mengual por su apoyo moral (y presionar alguna vez el botón del sistema SIA mientras yo almorzaba), y a Jesulín por su ayuda con el alemán desde la lejanía.

A aquellos que se “prestaron” como voluntarios en el estudio de filtros UV en orina, especialmente a Mengual y a mi hermana Teresa que se aplicaron el producto solar sobre sus carnes.

A Javier Monleón, por la conversación que tuvimos aquella noche de verano de 1994.

A todos aquellos profesionales del sector cosmético que me asesoraron cuando lo necesité, muy especialmente a Pascual Cuadrado y Andrés López.

A los compañeros de laboratorio de la University of Hull: Radwan, Wirat, Napaporn y Awadh por su ayuda, y a aquellas personas que hicieron que mi estancia en Hull fuera más llevadera, especialmente a Toni y Miriam, Miguel, David y Chus por los momentos vividos.

Al Prof. Alan Townshend, por aceptarme en su grupo de investigación de la University of Hull, y aprender de él multitud de conocimientos, y al Dr. Alan Wheatley, por su ayuda prestada en el detector de quimioluminiscencia.

A los compañeros de laboratorio del Departamento de Química de la Universitat de les Illes Balears, en especial a Tolo y a Mateu, por su ayuda y discusión sobre temas que han hecho madurar mis conocimientos.

A Joan (March), por multitud de cosas, entre ellas seguir de cerca mi tesis sin ser mi director, transmitirme multitud de conocimientos y discutir sobre temas interesantísimos para la elaboración de esta tesis, permitirme realizar una estancia de tres meses en su laboratorio en la Universitat de les Illes Balears y además aguantarme las 24 h del día (bueno, casi) durante un mes entero.

Sobretudo quisiera agradecer de todo corazón a mi Directora de Tesis todos los conocimientos transmitidos durante este tiempo, y el haberse portado conmigo no sólo como mi directora, sino también como una verdadera madre. Además quisiera expresarle mi enorme gratitud por haber confiado en mí desde el principio. Gracias por todo, Amparo.

Finalmente, a toda mi familia, por todo el apoyo que me han dado. Especialmente a mi madre, por su afecto y comprensión, y haber posibilitado que hoy esté aquí redactando esta tesis. A mi hermana Teresa, por tantas y tantas tardes que me ha acompañado al laboratorio cuando tenía que quedarme hasta tarde, y cómo no a mi novia Rosa, por su cariño, saberme llevar cuando los resultados no eran los que uno esperaba y sobretudo por su paciencia.



## **ÍNDICE GENERAL**



**PRIMERA PARTE: INTRODUCCIÓN** ..... 15

**CAPÍTULO 1: PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LA PROTECCIÓN SOLAR: NORMATIVA, TIPOS DE FILTROS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS** ..... 17

<b>1.1. Necesidad del uso de productos cosméticos para la protección solar</b> .....	19
<b>1.2. Normativa sobre filtros UV</b> .....	20
<b>1.3. Clasificación de los filtros UV</b> .....	24
1.3.1. Filtros UV. Clasificación .....	25
<b>1.4. Métodos oficiales de análisis de productos cosméticos</b> .....	27
1.4.1. Necesidad de métodos oficiales de análisis para la determinación de filtros UV.....	29
<b>1.5. Interés de la determinación de filtros UV en productos cosméticos para la protección solar</b> .....	29
1.5.1. Publicaciones referentes a la determinación de filtros UV en productos cosméticos.....	30
<b>1.6. Conclusiones</b> .....	43

**SEGUNDA PARTE: DETERMINACIÓN DE FILTROS UV MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS AUTOMATIZADOS** ..... 45

**CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE OCTIL METOXICINAMATO Y BENZOFENONA-3 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA UV DERIVADA** ..... 53

<b>2.1. Introducción</b> .....	55
2.1.1. Interés de la determinación de octil metoxicinamato y benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar ..	55
2.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	56
2.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	56
<b>2.2. Método de referencia: determinación de octil metoxicinamato y benzofenona-3 mediante cromatografía líquida de alta eficacia</b> .....	57
2.2.1. Método de referencia. Parte experimental .....	57
2.2.1.1. Instrumentación.....	57
2.2.1.2. Reactivos y muestras.....	58
2.2.1.3. Procedimiento experimental .....	58
2.2.2. Método de referencia. Resultados .....	58

<b>2.3. Método propuesto: determinación simultánea de octil metoxicinamato y benzofenona-3 mediante espectrometría UV derivada.....</b>	<b>60</b>
2.3.1. Método propuesto. Parte experimental.....	60
2.3.1.1. Instrumentación.....	60
2.3.1.2. Reactivos y muestras.....	61
2.3.1.3. Metodología de trabajo .....	61
2.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión .....	62
2.3.2.1. Elección del disolvente .....	62
2.3.2.2. Estudio de la estabilidad de las disoluciones de los analitos con el tiempo y con la irradiación con luz UV .....	62
2.3.2.3. Determinación manual .....	64
Estudio de los espectros derivados de primer orden	64
Estudio de los espectros derivados de segundo orden .....	69
<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación simultánea de octil metoxicinamato y benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría UV derivada (modo manual)</i></b> .....	<b>72</b>
<b>Parámetros analíticos del método manual propuesto .....</b>	<b>72</b>
i) Linealidad .....	72
ii) Sensibilidad .....	74
iii) Límite de detección .....	74
iv) Exactitud.....	74
v) Precisión.....	74
2.3.2.4. Automatización del método. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo continuo.....	74
Estudio de las variables instrumentales	75
<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación simultánea de octil metoxicinamato y benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría UV derivada empleando un sistema de inyección en flujo continuo</i></b> .....	<b>76</b>

<b>Parámetros analíticos del método FIA propuesto</b> .....	76
i) Linealidad .....	76
ii) Sensibilidad .....	77
iii) Límite de detección .....	77
iv) Exactitud .....	77
v) Precisión .....	78
vi) Velocidad de muestreo .....	78
<b>2.4. Conclusiones</b> .....	78

**CAPÍTULO 3: DETERMINACIÓN DE BENZOFENONA-3 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR (VIS) EMPLEANDO SISTEMAS AUTOMATIZADOS** ..... 81

<b>3.1. Introducción</b> .....	83
3.1.1. Interés de la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar .....	83
3.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	84
3.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	84
<b>3.2. Método de referencia: determinación de benzofenona-3 mediante cromatografía líquida de alta eficacia</b> .....	85
3.2.1. Método de referencia. Parte experimental .....	85
3.2.2. Método de referencia. Resultados .....	85
<b>3.3. Método propuesto: determinación de benzofenona-3 mediante espectrometría de absorción molecular (VIS) empleando sistemas automatizados</b> .....	86
3.3.1. Método propuesto. Parte experimental .....	86
3.3.1.1. Instrumentación .....	86
3.3.1.2. Reactivos y muestras .....	86
3.3.1.3. Metodología de trabajo .....	87
3.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión .....	87
3.3.2.1. Estudio de la reacción colorimétrica .....	87
Determinación de la estequiometría del complejo .....	88
Selectividad de la reacción .....	90
3.3.2.2. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo continuo .....	91
a) Montaje monocanal .....	91
Estudio de las variables instrumentales .....	91

<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría de absorción molecular (VIS) empleando un sistema de inyección en flujo continuo monocanal</i></b>	.... 93
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------

<b>Parámetros analíticos del método FIA monocanal propuesto</b>	..... 94
i) Linealidad	..... 94
ii) Sensibilidad	..... 94
iii) Límite de detección	..... 94
iv) Exactitud	..... 94
v) Precisión	..... 96
vi) Velocidad de muestreo	..... 96
b) Montaje bicanal	..... 96
Estudio de las variables instrumentales	..... 96

<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría de absorción molecular (VIS) empleando un sistema de inyección en flujo continuo bicanal</i></b>	.... 98
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------

<b>Parámetros analíticos del método FIA bicanal propuesto</b>	..... 98
i) Linealidad	..... 98
ii) Sensibilidad	..... 99
iii) Límite de detección	..... 99
iv) Exactitud	..... 99
v) Precisión	..... 100
vi) Robustez del método propuesto frente a la variación en la concentración de los reactivos	..... 100
vii) Velocidad de muestreo	..... 101

3.3.2.3. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección secuencial	..... 101
Estudio de las variables instrumentales	..... 102

<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría de absorción molecular (VIS) empleando un sistema de inyección secuencial</i></b>	.. 107
<b>Parámetros analíticos del método SIA propuesto .....</b>	<b>108</b>
i) Linealidad .....	108
ii) Sensibilidad .....	108
iii) Límite de detección .....	108
iv) Exactitud.....	108
v) Precisión.....	110
vi) Robustez del método propuesto frente a la variación en la concentración de los reactivos .....	110
vii) Velocidad de muestreo.....	110
<b>3.4. Conclusiones.....</b>	<b>111</b>
<b><u>CAPÍTULO 4: DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FENIL BENCIMIDAZOL SULFÓNICO Y BENZOFENONA-4 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR (UV) EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN SECUENCIAL</u></b> .....	<b>113</b>
<b>4.1. Introducción .....</b>	<b>115</b>
4.1.1. Interés de la determinación de ácido fenil bencimidazol sulfónico y benzofenona-4 en productos cosméticos para la protección solar.....	115
4.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	116
4.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	116
<b>4.2. Método de referencia: determinación de ácido fenil bencimidazol sulfónico y benzofenona-4 mediante cromatografía líquida de alta eficacia .....</b>	<b>117</b>
4.2.1. Método de referencia. Parte experimental .....	117
4.2.1.1. Instrumentación.....	117
4.2.1.2. Reactivos y muestras.....	117
4.2.1.3. Procedimiento experimental .....	118
4.2.2. Método de referencia. Resultados .....	118

<b>4.3. Método propuesto: determinación simultánea de ácido fenilbencimidazol sulfónico y benzofenona-4 mediante espectrometría de absorción molecular (UV) empleando un sistema de inyección secuencial</b> .....	120
4.3.1. Método propuesto. Parte experimental .....	120
4.3.1.1. Instrumentación.....	120
4.3.1.2. Reactivos y muestras.....	120
4.3.1.3. Metodología de trabajo .....	121
4.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión ....	121
4.3.2.1. Estudio de la elución selectiva de PBS .....	121
4.3.2.2. Estudio de la elución selectiva de BZ4 .....	122
4.3.2.3. Tamponación en línea. Efecto del pH de retención.....	124
<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación simultánea de ácido fenilbencimidazol sulfónico y benzofenona-4 en aguas solares mediante espectrometría de absorción molecular (UV) empleando un sistema de inyección secuencial</i></b> ....	127
<b>Parámetros analíticos del método SIA propuesto</b> .....	128
i) Linealidad.....	128
ii) Sensibilidad .....	128
iii) Límite de detección .....	129
iv) Exactitud.....	129
v) Precisión .....	131
vi) Velocidad de muestreo .....	131
<b>4.4. Conclusiones</b> .....	132
<b><u>Anexo 4.I:</u></b> <i>Elaboración de aguas solares según el protocolo de empresas del sector cosmético</i> .....	133
<b><u>CAPÍTULO 5: DETERMINACIÓN DE OCTIL DIMETIL PABA MEDIANTE QUIMIOLUMINIMETRÍA EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO CONTINUO</u></b> .....	135
<b>5.1. Introducción</b> .....	137
5.1.1. Interés de la determinación de octil dimetil PABA en productos cosméticos para la protección solar.....	137

5.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	138
5.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	138
<b>5.2. Método de referencia: determinación de octil dimetil PABA mediante cromatografía líquida de alta eficacia .....</b>	<b>139</b>
<b>5.3. Método propuesto: determinación de octil dimetil PABA mediante quimioluminimetría empleando un sistema de inyección en flujo continuo .....</b>	<b>140</b>
5.3.1. Método propuesto. Parte experimental .....	140
5.3.1.1. Instrumentación.....	140
5.3.1.2. Reactivos y muestras.....	140
5.3.1.3. Metodología de trabajo .....	141
5.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión ....	141
5.3.2.1. Estudio del oxidante y del medio en el que se realiza la reacción de oxidación.....	141
5.3.2.2. Estudio de las variables instrumentales.....	141
5.3.2.3. Estudio de la influencia de sensibilizadores, iones metálicos y tensioactivos .....	144
5.3.2.4. Estudio de la potencia del fotomultiplicador .....	145
5.3.2.5. Efecto de la desgasificación .....	146
5.3.2.6. Estudio de interferentes .....	148
<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación de octil dimetil PABA en productos para la protección solar mediante quimioluminimetría empleando un sistema de inyección en flujo continuo</i> ..</b>	<b>149</b>
<b>Parámetros analíticos del método FIA propuesto .....</b>	<b>150</b>
i) Calibración .....	150
ii) Límite de detección .....	150
iii) Exactitud.....	150
iv) Precisión.....	151
v) Velocidad de muestreo .....	151
<b>5.4. Conclusiones.....</b>	<b>152</b>
<b><u>Anexo 5.I:</u> <i>Elaboración de aguas solares según el protocolo de empresas del sector cosmético</i>.....</b>	<b>153</b>

**TERCERA PARTE: MÉTODO LÍMPIOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE FILTROS UV MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA ... 155**

**CAPÍTULO 6: DETERMINACIÓN DE LOS FILTROS UVB AUTORIZADOS A NIVEL INTERNACIONAL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA ..... 159**

<b>6.1. Introducción</b> .....	161
6.1.1. Interés de la determinación simultánea de filtros químicos internacionalmente autorizados en productos cosméticos para la protección solar .....	161
6.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	161
6.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	162
<b>6.2. Método propuesto: determinación de los filtros UVB autorizados a nivel internacional mediante cromatografía líquida de alta eficacia .</b>	<b>163</b>
6.2.1. Método propuesto. Parte experimental .....	163
6.2.1.1. Instrumentación.....	163
6.2.1.2. Reactivos y muestras.....	163
6.2.1.3. Metodología de trabajo .....	163
6.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión ....	164
6.2.2.1. Estudio de las variables cromatográficas .....	165
6.2.2.2. Repetibilidad del tiempo de retención y del área de los picos cromatográficos .....	167
6.2.2.3. Estudio de la linealidad .....	167
6.2.2.4. Uso de patrón interno .....	168
<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación cromatográfica de filtros UVB en productos cosméticos para la protección solar</i></b> .....	<b>169</b>
<b>Parámetros analíticos del método propuesto</b> .....	<b>169</b>
i) Linealidad.....	169
ii) Sensibilidad .....	170
iii) Límite de detección .....	170
iv) Exactitud.....	170
v) Precisión .....	172
vi) Tiempo de análisis .....	173
<b>6.3. Conclusiones</b> .....	<b>173</b>

<b><u>Anexo 6.I:</u></b> <i>Elaboración de una crema solar conteniendo los filtros UV determinados</i> .....	174
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

**CAPÍTULO 7: DETERMINACIÓN DE LOS FILTROS UVA Y UVB AUTORIZADOS A NIVEL INTERNACIONAL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA** ..... 177

<b>7.1. Introducción</b> .....	179
7.1.1. Interés de la determinación simultánea de todos los filtros químicos internacionalmente autorizados en productos cosméticos para la protección solar.....	179
7.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	179
7.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	180
<b>7.2. Método propuesto: determinación de los filtros UVA y UVB autorizados a nivel internacional mediante cromatografía líquida de alta eficacia</b> .....	180
7.2.1. Método propuesto. Parte experimental .....	180
7.2.1.1. Instrumentación.....	180
7.2.1.2. Reactivos y muestras.....	181
7.2.1.3. Metodología de trabajo .....	181
7.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión ....	182
7.2.2.1. Estudio de las variables cromatográficas .....	182
Estudio de la concentración de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a emplear en la fase móvil .....	183
Estudio del caudal de fase móvil.....	184
Estudio de la proporción de agua/etanol en la fase móvil .	186
7.2.2.2. Repetibilidad del tiempo de retención y del área de los picos cromatográficos .....	187
7.2.2.3. Estudio de la linealidad .....	188
7.2.2.4. Estudio de la señal del butil metoxidibenzoilmetano en función del tiempo .....	189
<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación cromatográfica de filtros UV en productos cosméticos para la protección solar</i></b> .....	190
<b>Parámetros analíticos del método propuesto</b> .....	190
i) Linealidad .....	190
ii) Sensibilidad .....	190
iii) Límite de detección .....	191

iv) Exactitud.....	191
v) Precisión .....	195
vi) Tiempo de análisis .....	195
<b>7.3. Conclusiones.....</b>	<b>195</b>
<b><u>Anexo 7.I:</u> <i>Elaboración de una crema solar conteniendo los filtros UV determinados</i>.....</b>	<b>196</b>
<b><u>CAPÍTULO 8:</u> <u>DETERMINACIÓN DE FILTROS UV HIDROSOLUBLES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA</u>.....</b>	<b>199</b>
<b>8.1. Introducción .....</b>	<b>201</b>
8.1.1. Interés de la determinación filtros UV en aguas solares .....	201
8.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	202
8.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	202
<b>8.2. Método propuesto: determinación de filtros UV hidrosolubles mediante cromatografía líquida de alta eficacia .....</b>	<b>203</b>
8.2.1. Método propuesto. Parte experimental .....	203
8.2.1.1. Instrumentación.....	203
8.2.1.2. Reactivos y muestras.....	203
8.2.1.3. Metodología de trabajo .....	204
8.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión ....	204
8.2.2.1. Estudio de las variables cromatográficas .....	204
8.2.2.2. Estudio de la influencia de la luz UV.....	208
8.2.2.3. Repetibilidad del tiempo de retención y del área de los picos cromatográficos .....	209
<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación cromatográfica de filtros UV hidrosolubles en productos cosméticos para la protección solar</i>.....</b>	<b>209</b>
<b>Parámetros analíticos del método propuesto .....</b>	<b>210</b>
i) Linealidad.....	210
ii) Sensibilidad .....	210
iii) Límite de detección .....	210
iv) Exactitud.....	211
v) Precisión .....	213
vi) Tiempo de análisis .....	213

<b>8.3. Conclusiones</b> .....	213
--------------------------------	-----

<b>Anexo 8.I:</b> <i>Elaboración de un agua solar conteniendo los filtros UV estudiados</i> .....	215
---------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b><u>CUARTA PARTE:</u></b> <b><u>DETERMINACIÓN DE FILTROS UV EN FLUIDOS BIOLÓGICOS</u></b> .....	217
---------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b><u>CAPÍTULO 9:</u></b> <b><u>DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE ÁCIDO FENIL BENCIMIDAZOL SULFÓNICO EN ORINA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN SECUENCIAL</u></b> .....	219
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>9.1. Introducción</b> .....	221
9.1.1. Interés de la determinación filtros UV en orina.....	221
9.1.2. Antecedentes y estado actual del tema .....	222
9.1.3. Justificación del objetivo de trabajo .....	223
<b>9.2. Método propuesto: determinación fluorimétrica de ácido fenil bencimidazol sulfónico en orina mediante extracción en fase sólida en línea empleando un sistema de inyección secuencial</b> .....	223
9.2.1. Método propuesto. Parte experimental.....	223
9.2.1.1. Instrumentación.....	223
9.2.1.2. Reactivos y muestras.....	224
9.2.1.3. Metodología de trabajo .....	224
9.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión ....	225
9.2.2.1. Estudio de interferencias .....	226
9.2.2.2. Formación <i>en línea</i> del calibrado de adición estándar. ....	230
Estudio de la estructura del sándwich.....	231
Realización del calibrado de adición estándar <i>en línea</i> con diferentes volúmenes de disolución patrón.....	232
9.2.2.3. Estudio de la estabilidad de las muestras de orina .....	233
9.2.2.4. Estudio de la influencia del pH en el resultado analítico....	234

<b><i>Procedimiento propuesto para la determinación fluorimétrica de ácido fenilbencimidazol sulfónico en orina mediante extracción en fase sólida en línea empleando un sistema de inyección secuencial</i></b> .....	234
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Parámetros analíticos del método SIA propuesto</b> .....	235
i) Sensibilidad .....	235
ii) Límite de detección .....	235
iii Exactitud .....	236
iv) Precisión.....	237
v) Velocidad de muestreo .....	237
 <b>Aplicación del método propuesto al análisis de muestras reales de orina procedentes de usuarios de productos cosméticos para la protección solar conteniendo ácido fenilbencimidazol sulfónico</b> .....	238
 <b>9.3. Conclusiones</b> .....	239
 <b><u>GENERAL CONCLUSIONS</u></b> .....	241
 <b><u>APÉNDICE I: CLAVES EMPLEADAS</u></b> .....	251
 <b><u>APÉNDICE II: CONTRASTES DE SIGNIFICACIÓN</u></b> .....	257
 <b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	265
 <b><u>ARTÍCULOS PUBLICADOS PERTENECIENTES A ESTA TESIS DOCTORAL</u></b> .....	275

## **PRIMERA PARTE**

### **INTRODUCCIÓN**



## CAPÍTULO 1

# **PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LA PROTECCIÓN SOLAR: NORMATIVA, TIPOS DE FILTROS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

Parte del contenido de este Capítulo ha sido publicado en *NCP Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos* (2000) 250:3-8; *NCP Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos* (2002) 264:9-16; *Green Chem* (2002) 4:G57-G58.



### **1.1. NECESIDAD DEL USO DE PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LA PROTECCIÓN SOLAR**

La radiación visible (VIS) (400-760 nm) constituye el 44.3 % de la radiación solar que llega a la superficie terrestre, mientras que el 49.5 % está constituido por radiación infrarroja (IR) (>760 nm), y tan sólo un 6.2 % corresponde a radiación ultravioleta (UV) (100-400 nm), ya que la capa de ozono estratosférico hace posible su atenuación. El 98 % de la radiación UV se debe a la denominada ultravioleta A (UVA) (320-400 nm), mientras el 2 % restante se debe a la ultravioleta B (UVB) (290-320 nm); la UVC (100-290 nm) que es la más energética no llega a la superficie terrestre.

La exposición solar posee una acción terapéutica en diversas patologías, favorece la producción de vitamina D (*Miro et al., 1997*), aumenta la absorción del calcio y previene el raquitismo, pero su exceso es sumamente perjudicial. En los últimos años se ha observado un importante aumento de tumores cancerosos de la piel, que se ha asociado, entre otros factores, a una excesiva exposición a los rayos solares (*Urbach, 1989; Meunier et al., 1998*), especialmente debido al deterioro de la capa de ozono, que provoca que la radiación UV llegue a la piel con mayor intensidad. Además, la radiación UV puede causar otros efectos negativos, tales como inflamaciones y quemaduras solares (*Hruza y Pentland, 1993*), hiperqueratosis y fotoenvejecimiento (*Gilchrist, 1996*), fototoxicidad o fotoalergia (*Epstein, 1999*) y estados de inmunosupresión (*Whitmore y Morison, 1995; Moyal, 1998*).

El uso de productos cosméticos para la protección solar, que incorporan filtros UV en su formulación, podría contribuir a prevenir o al menos minimizar estos efectos (*Kligman et al., 1980; Gasparro et al., 1998*).

En la *Directiva Europea 76/768/CEE* de 27 de Julio de 1976 en materia de productos cosméticos y sus sucesivas modificaciones, se define:

*Producto cosmético* es “toda sustancia preparada destinada a ser puesta en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistemas piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y/o las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos y protegerlos para mantenerlos en buen estado, modificar su aspecto o corregir los olores corporales”.

*Filtros UV ó absorbentes de UV* son “sustancias que se añaden a los productos cosméticos con la finalidad concreta de filtrar determinados rayos ultravioleta para así proteger la piel o los productos de determinados efectos dañinos de dichos rayos”, y añade “Para proteger la piel contra dichos efectos sólo se permite el empleo de las sustancias relacionadas en el *Anexo VII de la Directiva de productos cosméticos.*”

Teniendo en cuenta ambas definiciones, se podría definir como *producto cosmético para la protección solar, protector solar o fotoprotector*, cualquier producto cosmético que incorpore filtros UV en su formulación con el fin de proteger la piel de las radiaciones UV solares.

La industria del sector cosmético juega, en este sentido, un papel muy importante, desarrollando productos para la protección solar aptos para todo tipo de pieles y preferencias, que aplicados convenientemente proporcionen al individuo la protección necesaria para desarrollar sus actividades profesionales o disfrutar del baño o deporte al aire libre, sin estar expuesto a los posibles riesgos anteriormente mencionados.

## **1.2. NORMATIVA SOBRE FILTROS UV**

Tras sucesivas modificaciones y adaptaciones según el progreso técnico de la directiva original (76/768/CEE) en materia de productos cosméticos, y dada la importancia de los compuestos empleados como filtros UV, la *Directiva Europea 83/574/CEE* de 26 de octubre de 1983 incorporó por primera vez un listado de compuestos que podían ser empleados como filtros UV en los productos cosméticos, a modo de anexo (*Anexo VII de la Directiva Europea en materia de productos cosméticos*). En este anexo se incluían 6 compuestos que podían formularse en los preparados cosméticos (*Primera Parte del anexo*) y 31 que podían emplearse provisionalmente (*Segunda Parte del anexo*). En la tabla 1.1 se muestra la nomenclatura, cantidad máxima permitida y las directivas en las que se modificaron las condiciones de uso de cada uno de estos compuestos.

Tabla 1.1. Listado inicial de compuestos que podían ser empleados como filtros UV en los productos cosméticos para la protección solar según la directiva 83/574/CEE.

UE <sup>a</sup>	Nombre químico	Nomenclatura INCI <sup>b</sup>	Conc máx. autorizada	Modificaciones <sup>c</sup>
<i>Primera Parte. Lista de los filtros UV admitidos que podrán contener los productos cosméticos</i>				
1.1	Ácido 4-aminobenzoico	Paba	5 %	
1.2	Metil sulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-ilidinetil) anilino	Canfor benzalconio metosulfato	6 %	
1.3	Salicilato de 3,3,5-trimetil ciclohexilo ( <i>homosalato</i> )	Homosalato	10 %	
1.4	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona ( <i>oxibenzona</i> )	Benzofenona-3	10 %	
1.5	Ácido 3-(1H-imidazol-4-il)-2-propenoico y su éster etílico	Ácido urocánico	2 % (expresado como ácido)	93/47/CEE <sup>II-1</sup> 96/41/CE <sup>†</sup>
1.6	Ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , TEA	Ácido fenilbencimidazol sulfónico	8 % (expresado como ácido)	
<i>Segunda Parte. Lista de los filtros UV que podrán contener provisionalmente los productos cosméticos</i>				
2.1	4-[bis(2-hidroxiopropil)amino]benzoato de etilo (mezcla de isómeros)	Etil dihidroxipropil PABA	5 %	92/86/CEE <sup>†</sup>
2.2	4-aminobenzoato de etilo etoxilado	PEG-25 PABA	10 %	98/62/CE <sup>II-1</sup>
2.3	4-dimetilaminobenzoato de pentilo (mezcla de isómeros)	Pentil dimetil PABA	5 %	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.4	4-aminobenzoato de glicerilo	Gliceril PABA	5 %	92/86/CEE <sup>†</sup>
2.5	4-dimetilaminobenzoato de 2-etilhexilo	Octil dimetil PABA	8 %	2000/6/CE <sup>II-1</sup>
2.6	Salicilato de 2-etilhexilo	Octil salicilato	5 %	98/62/CE <sup>II-1</sup>
2.7	2-acetamidobenzoato de 3,3,5-trimetilciclohexilo	Homomentil acetamidobenzoato	2 %	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.8	Ácido cinámico (sal de potasio)	Ácido cinámico	2 %	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.9	Ácido 4-metoxicinámico (sales de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y DEA)	Ácido metoxicinámico	8 % (expresado como ácido)	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.10	4-metoxicinamato de isopropilo	Isopropil metoxicinamato	3 %	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.11	Ácido salicílico (sales de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y TEA)	Ácido salicílico	2 % (expresado como ácido)	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.12	4-metoxicinamato de isoamilo (mezcla de isómeros)	Isoamil metoxicinamato	10 %	98/62/CE <sup>II-1</sup>
2.13	4-metoxicinamato de 2-etilhexilo	Octil metoxicinamato	10 %	97/45/CE <sup>II-1</sup>
2.14	4-metoxicinamato de 2-etoxietilo ( <i>cinoxate</i> )	Cinoxato	5 %	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.15	3,4-dihidroxi-5-((3,4,5-trihidroxi-benzoil)-oxi)benzoato de trioleilo	Digalloil trioleato	4 %	89/174/CEE <sup>†</sup>
2.16	2-hidroxi-4-metoxi-4'-metilbenzofenona ( <i>mexenona</i> )	Benzofenona-10	4 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 92/86/CEE <sup>†</sup>
2.17	Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico ( <i>sulisobenzona</i> )	Benzofenona-4	5 % (expresado como ácido)	83/574/CEE <sup>II</sup> 2000/6/CE <sup>II-1</sup>
2.18	2-(4-fenilbenzoil) benzoato de 2-etilhexilo	Octil fenilbenzoilbenzoato	10 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>
2.19	5-metil-2-fenilbenzoxazol	Metil fenilbenzoxazol	4 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>
2.20	3,4-dimetoxifenilgloxilato de sodio	Dimetoxi fenilgloxilato de sodio	5 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>

Tabla 1.1 (continuación)

UE <sup>a</sup>	Nombre químico	Nomenclatura INCI <sup>b</sup>	Conc máx. autorizada	Modificaciones <sup>c</sup>
2.21	4,4'-dimetoxi dibenzoilmetano	Dimetoxi dibenzoilmetano	6 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>
2.22	5-(3,3-dimetil-2-norborniliden)-3-penten-2-ona	Bornelona	3 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>
2.23	Ácido $\alpha$ -(2-oxoborn-3-yliden)-xilen-4-sulfónico	Ácido metilbenciliden canfor sulfónico	6 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>
2.24	Ácido $\alpha$ -(2-oxoborn-3-iliden)-toluen-4-sulfónico y sus sales	Ácido benciliden canfor sulfónico	6 % (expresado como ácido)	83/574/CEE <sup>II</sup> 94/32/CEE <sup>II→I</sup>
2.25	3-(4'-metilbenciliden) canfor	4-metilbenciliden canfor	6 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
2.26	3-benciliden canfor	3-benciliden canfor	6 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
2.27	Ácido $\alpha$ -cyano-4-metoxicinámico y su éster hexílico	Hexil ciano metoxicinamato	5 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>
2.28	4-isopropil-dibenzoilmetano	Isopropil dibenzoilmetano	5 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 94/32/CEE <sup>†</sup>
2.29	Salicilato de 4-isopropilbencilo	Isopropilbencil salicilato	4 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 2000/6/CE <sup>†</sup>
2.30	4-metoxicinamato de ciclohexilo	Ciclohexil metoxicinamato	1 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 89/174/CEE <sup>†</sup>
2.31	4-tert-butil-4'-metoxidibenzoilmetano	Butil metoxidibenzoilmetano	5 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 93/47/CEE <sup>II→I</sup>

<sup>a</sup> Número de orden otorgado según las sucesivas directivas de la Unión Europea

<sup>b</sup> INCI (*International Nomenclature Cosmetic Ingredient*) elaborada por COLIPA (*Comitee De Liaison Des Associations Europeans de L'Industries de la Parfumerie, De Produits Cosmetiques et de Toilette*). En su defecto se nombrará por analogía con los nombres de compuestos similares cuya nomenclatura INCI sí existe

<sup>c</sup> Directivas europeas que modificaron la ubicación de los filtros UV, pasando de la *Primera Parte* a la *Segunda Parte* (I→II) o al contrario (II→I), o bien fueron eliminados (†) (y por tanto prohibido su uso como filtros UV) del Anexo VII de la *Directiva Europea sobre productos cosméticos*.

En posteriores directivas, se fueron eliminando parte de los compuestos inicialmente permitidos por considerar que constituían un peligro para la salud e incorporando nuevos compuestos. En la tabla 1.2 se recogen estas modificaciones y se muestran los compuestos que pueden emplearse en la actualidad como filtros UV de acuerdo con la legislación vigente dentro del marco de la Unión Europea.

Tabla 1.2. Listado actualizado de compuestos que pueden ser empleados como filtros UV en los productos cosméticos para la protección solar.

UE <sup>a</sup>	Nombre químico	Nomenclatura INCI <sup>b</sup>	Conc máx. autorizada	Modificaciones <sup>c</sup>
<i>Primera Parte. Lista de los filtros UV admitidos que podrán contener los productos cosméticos</i>				
1.1	Ácido 4-aminobenzoico	Paba	5 %	83/574/CEE <sup>I</sup>
1.2	Metil sulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-ilidinetil) anilino	Canfor benzalconio metosulfato	6 %	83/574/CEE <sup>I</sup>
1.3	Salicilato de 3,3,5-trimetil ciclohexilo ( <i>homosalato</i> )	Homosalato	10 %	83/574/CEE <sup>I</sup>
1.4	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona ( <i>oxibenzona</i> )	Benzofenona-3	10 %	83/574/CEE <sup>I</sup>
1.6	Ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , TEA	Ácido fenilbencimidazol sulfónico	8 % (expresado como ácido)	83/574/CEE <sup>I</sup>

Tabla 1.2 (continuación)

UE <sup>a</sup>	Nombre químico	Nomenclatura INCI <sup>b</sup>	Conc máx. autorizada	Modificaciones <sup>c</sup>
1.7	Ácido 3,3'-(1,4-fenilendimetileno) bis (7,7-dimetil-2-oxobicyclo-[2.2.1]hept-1-ilmetano sulfónico) y sus sales	Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico	10 % (expresado como ácido)	91/184/CEE <sup>I</sup>
1.8	4-tert-butil-4'-metoxidibenzoilmetano	Butil metoxidibenzoilmetano	5 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 93/47/CEE <sup>II→I</sup>
1.9	Ácido $\alpha$ -(2-oxoborn-3-iliden)-toluen-4-sulfónico y sus sales	Ácido benciliden canfor sulfónico	6 % (expresado como ácido)	83/574/CEE <sup>II</sup> 94/32/CEE <sup>II→I</sup>
1.10	2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilhexilo	Octocrileno	10 % (expresado como ácido)	95/34/CEE <sup>I</sup>
1.11	Polímero de N-[(2 y 4)-[(2-oxoborn-3-iliden)metil]bencil]acrilamida	Poliacrilamidometil benciliden canfor	6 %	94/32/CEE <sup>II</sup> 96/41/CE <sup>II→I</sup>
1.12	4-metoxicinamato 2-etilhexilo	Octil metoxicinamato	10 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 97/45/CE <sup>II→I</sup>
1.13	4-aminobenzoato de etilo etoxilado	PEG-25 PABA	10 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
1.14	4-metoxicinamato de isoamilo (mezcla de isómeros)	Isoamil metoxicinamato	10 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
1.15	2,4,6-trianilina-(p-carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina	Octil triazona	5 %	89/174/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
1.16	2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-[2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)disiloxanil)propil]fenol	Drometrisol trisiloxano	15 %	98/62/CE <sup>I</sup>
1.17	4,4'-[[6-[[[(1,1-dimetiletil)amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]bis-bis(2-etilhexil) benzoate	Dioctil butamido triazona	10 %	98/62/CE <sup>I</sup>
1.18	3-(4'-metilbenciliden) canfor	4-metilbenciliden canfor	4 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
1.19	3-benciliden canfor	3-benciliden canfor	2 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
1.20	Salicilato de 2-etilhexilo	Octil salicilato	5 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 98/62/CE <sup>II→I</sup>
1.21	4-dimetilaminobenzoato de 2-etilhexilo	Octil dimetil PABA	8 %	83/574/CEE <sup>II</sup> 2000/6/CE <sup>II→I</sup>
1.22	Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico ( <i>sulisobenzona</i> )	Benzofenona-4	5 % (expresado como ácido)	83/574/CEE <sup>II</sup> 2000/6/CE <sup>II→I</sup>
1.23	2,2'-metilen-bis-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-6-(2H-benzotriazol-2-il)fenol]	Metilen bisbenzotriazolil tetrametilbutilfenol	10 %	2000/6/CE <sup>I</sup>
1.24	Ácido 2,2'-(1,4-fenilen) bis-1H-bencimidazol-4,6-disulfónico (sal monosódica)	Ácido fenildibencimidazol tetrasulfónico	10 % (expresado como ácido)	2000/6/CE <sup>I</sup>
1.25	2,2'-[6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil]bis[5-[(2-etilhexil)oxi]fenol]	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazona	10 %	2000/6/CE <sup>I</sup>
1.26	Metil 3-[4-[2,2-bis(etoxicarbonil)etenil]fenoxil]propenil dimetil polisiloxano	Polisilicona-15	10 %	2002/34/CE <sup>I</sup>
1.27	Dióxido de titanio	Dióxido de titanio	25 %	2002/34/CE <sup>I</sup>
<i>Segunda Parte. Lista de los filtros UV que podrán contener provisionalmente los productos cosméticos</i>				
Actualmente no se incluye ningún compuesto en esta lista				

<sup>a</sup> Número de orden otorgado según las sucesivas directivas de la Unión Europea

<sup>b</sup> INCI (*International Nomenclature Cosmetic Ingredient*) elaborada por COLIPA (*Comitee De Liaison Des Associations Europeennes de L'Industries de la Parfumerie, De Produits Cosmetiques et de Toilette*).

<sup>c</sup> Directivas europeas que admitieron el uso de estos compuestos en los productos cosméticos para la protección solar y por tanto aparecieron en la *Primera Parte del anexo VII (I)* o bien fueron admitidos provisionalmente (II), y posteriormente pasaron de la de la *Segunda Parte* a la *Primera Parte* (II→I).

### **1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS FILTROS UV**

En la tabla 1.2 se observa que existen 26 compuestos que pueden emplearse como filtros UV según la *Directiva Europea en materia de productos cosméticos*. Cabe mencionar que existen otras normativas como la de Estados Unidos (*FDA, 1999*) que permite tan sólo 14 sustancias y la Japonesa (*Japanese SCI, 1985*) que permite 22. Hay que resaltar la gran divergencia tanto en los niveles permitidos por las diferentes normativas como en los filtros autorizados.

Los filtros UV se pueden dividir en dos grupos:

*Filtros inorgánicos o físicos*, son aquellos que poseen una función fundamentalmente impermeabilizante, reflejando gran parte de la radiación UV que llega a la piel. Se han venido utilizando como tales algunos óxidos metálicos.

*Filtros orgánicos o químicos*, son aquellos que absorben la radiación UV. Se trata de moléculas orgánicas constituidas por uno o varios anillos bencénicos, conjugados con dobles enlaces C-C y/o grupos carbonilo, proporcionando un sistema de alta deslocalización electrónica, que les confiere un elevado coeficiente de absorción molar en la zona UVA y/o UVB.

Los filtros físicos proporcionan una mayor protección y al no penetrar en la piel no constituyen ningún trastorno para el sistema inmunológico, pero forman una película impermeable que tapa los poros de la piel. Por otra parte, el coste de las materias primas es más elevado que en el caso de los filtros químicos.

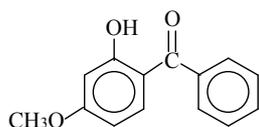
Los filtros químicos proporcionan menor protección. Penetran en la piel, por lo que pueden provocar en algunos casos reacciones alérgicas. Su coste es menor y permiten la transpiración de la piel. Por otra parte, estos productos son más aceptados comercialmente debido a que suelen ser más fluidos y tienen una aplicación más confortable para el usuario, puesto que su aspecto, una vez absorbido, no deja una capa de producto sobre la piel como ocurre en el caso de los filtros físicos. Además, para las empresas de productos cosméticos, resulta más sencillo formular productos con filtros químicos que con filtros físicos, ya que éstos presentan mayor dificultad en lo que se refiere a la formulación de emulsiones estables.

Como se observa en la tabla 1.2, tan sólo existe un filtro físico (el dióxido de titanio) del total de los 26 filtros autorizados.

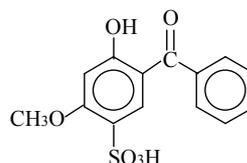
### 1.3.1. Filtros químicos. Clasificación:

Los 26 filtros químicos permitidos por la legislación europea, se podrían clasificar en 9 grupos:

#### 1) Derivados de la benzofenona:

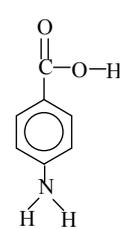


Benzofenona-3

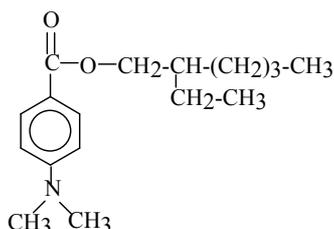


Benzofenona-4

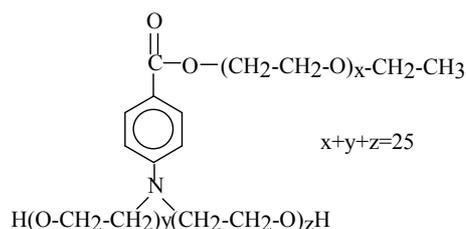
#### 2) Ácido p-aminobenzoico y sus derivados:



PABA

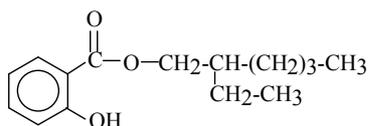


Octil dimetil PABA

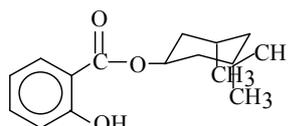


PEG-25 PABA

#### 3) Salicilatos:

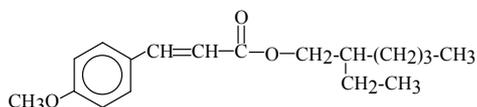


Octil salicilato

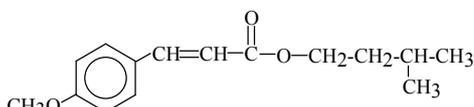


Homosalato

#### 4) Metoxicinamatos:

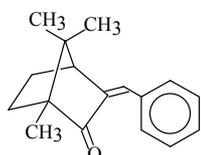


Octil metoxicinamato

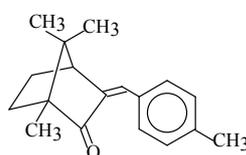


Isoamil metoxicinamato

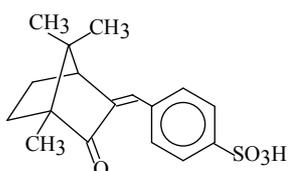
5) Derivados del canfor:



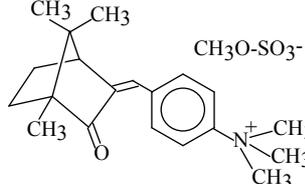
3-benciliden canfor



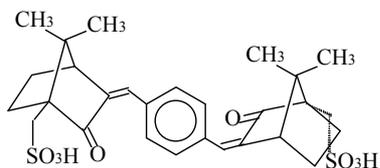
4-metilbenciliden canfor



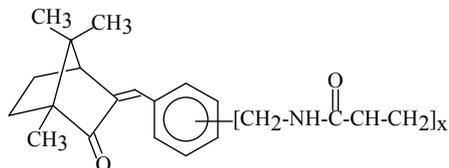
Ácido benciliden canfor sulfónico



Canfor benzalconio metosulfato



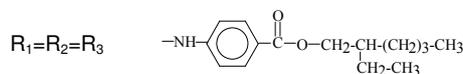
Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico



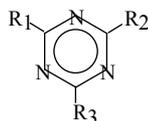
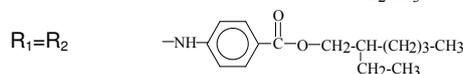
Poliacrilamidometil benciliden canfor

6) Derivados de la triazina:

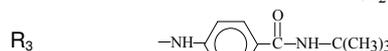
Octil triazona



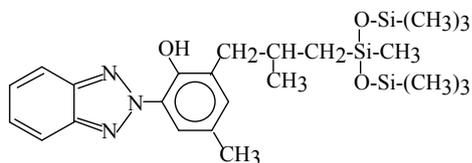
Diocil butamido triazona



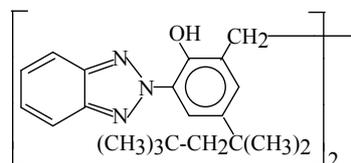
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina



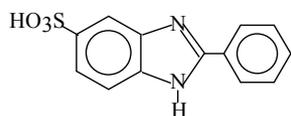
7) Derivados del benzotriazol:



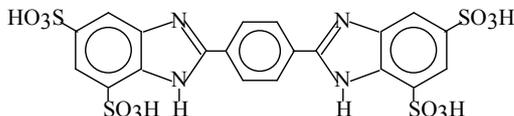
Drometrisol trisiloxano



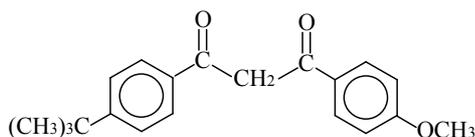
Metilen bisbenzotriazolil tetrametilbutilfenol

8) Derivados del bencimidazol:

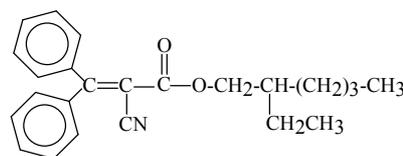
Ácido fenilbencimidazol sulfónico



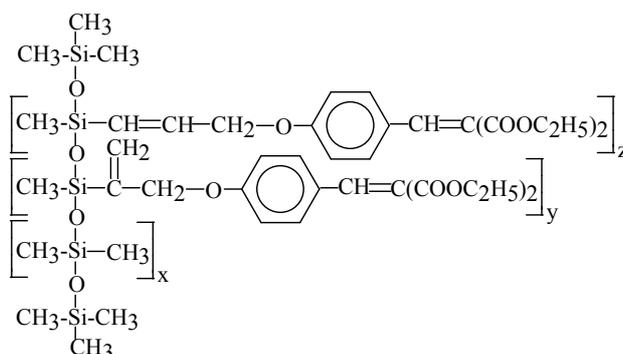
Ácido fenildibencimidazol tetrasulfónico

9) Otros:

Butil metoxidibenzoilmetano



Octocrileno



Polisilicona-15

#### 1.4. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS DE PRODUCTOS COSMÉTICOS

En el artículo 8 de la *Directiva Europea 76/768/CEE* se manifiesta la necesidad de disponer de unos métodos de análisis con los que poder controlar correctamente la composición de los productos cosméticos y comprobar que se cumplen las condiciones prescritas en las disposiciones comunitarias.

En la primera directiva sobre análisis de productos cosméticos (80/1335/CEE) se abordan aspectos como la toma y tratamiento de muestras en función del tipo y del estado físico del producto cosmético, además de incluirse protocolos de análisis para unos pocos compuestos utilizados en las formulaciones cosméticas.

A esta directiva siguieron otras con el fin de ampliar el número de componentes a analizar, y dos modificaciones por las que se mejoraban algunos métodos de análisis, hasta completar un total de siete directivas por las que se establecen métodos oficiales de análisis para el control de la composición de los productos cosméticos. Las directivas existentes en la actualidad se indican en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Directivas europeas sobre métodos oficiales de análisis de los productos cosméticos.

Directiva		Fecha
1ª	80/1335/CEE	22/12/1980
2ª	82/434/CEE	14/05/1982
3ª	83/514/CEE	27/09/1983
4ª	85/490/CEE	11/10/1985
Modificación de la 1ª	87/143/CEE	10/02/1987
Modificación de la 2ª	90/207/CEE	04/04/1990
5ª	93/73/CEE	09/09/1993
6ª	95/32/CE	07/07/1995
7ª	96/45/CE	02/06/1996

El *Real Decreto 1599/1997* de 17 de octubre, sobre productos cosméticos, reunió toda la normativa europea sobre productos cosméticos existente hasta ese momento, derogando las disposiciones reglamentarias anteriores. Sólo se mantienen en vigor seis órdenes ministeriales, cuyo texto no recoge el texto completo de las directivas europeas sino sólo una referencia a ellas. El Ministerio de Sanidad y Consumo (1998) editó una publicación en la que se recogen los textos completos de todas estas directivas.

Tan sólo para el 27 % de las sustancias cuya concentración está limitada en el *Anexo III del RD 1599/1997* (y que se corresponde con el *Anexo III de la Directiva Europea*) se dispone de método analítico oficial. En lo que a las sustancias *conservadoras* se refiere, y cuyas restricciones de uso se especifican en el *Anexo IV del Real Decreto (Anexo IV de la Directiva Europea)*, se disponen de métodos de análisis oficiales para el 87 %.

Por otra parte, existen más de cuatrocientas sustancias *prohibidas* en la composición de los productos cosméticos según el *Anexo II del Real Decreto (Anexo II de la Directiva Europea)*. La introducción de cualquiera de estos ingredientes de forma voluntaria en la composición de los productos cosméticos es bastante improbable dada la seriedad de las empresas del sector cosmético en Europa, aunque en algunos casos particulares se podría formar alguna de ellas como subproducto o provenir de la degradación de alguna sustancia permitida, o bien como impureza en la materia prima, por lo que sería necesario su control.

Sin embargo, el principal problema estriba sin duda en la ausencia de métodos oficiales para determinar la concentración exacta de las sustancias *admitidas* en los productos cosméticos pero cuya concentración está limitada en el producto acabado. El control de producción en estos casos es absolutamente necesario ya que los contenidos máximos autorizados por el Ministerio de Sanidad y Consumo se corresponden con la distinta toxicidad de las sustancias, zona de aplicación, etc. y por tanto, sobrepasarlo en algún lote de fabricación podría ocasionar problemas dermatológicos al consumidor.

Por otro lado, algunos de los pretratamientos indicados en los métodos analíticos oficiales, podrían ser susceptibles de mejoras que permitieran una mayor simplicidad y rapidez, y asimismo se podrían utilizar un mayor número de técnicas instrumentales modernas que permitieran dinamizar los procedimientos, además de intentar sustituir (en la medida de lo posible) los disolventes y reactivos tóxicos empleados (*Salvador et al., 2000 a*).

#### **1.4.1. Necesidad de métodos oficiales de análisis para la determinación de filtros UV:**

En lo que se refiere a la determinación de filtros UV, es de destacar que no existe ningún método oficial para la determinación de los filtros UV admitidos en la actual legislación. Tan sólo se dispone de método de análisis oficial para la determinación de gliceril PABA. Dicho compuesto fue prohibido por la *Directiva Europea 92/86/CEE* de 21 de octubre de 1992. El método se basa en una determinación cualitativa mediante cromatografía de capa fina y su posterior determinación cuantitativa mediante cromatografía líquida de alta resolución. Este ejemplo concreto muestra la necesidad de una revisión de los métodos oficiales de análisis existentes en la actualidad para los productos cosméticos en general, y muy en particular la necesidad de poner a punto métodos para los productos para la protección solar, ya que la concentración de los filtros UV está limitada por la legislación.

#### **1.5. INTERÉS DE LA DETERMINACIÓN DE FILTROS UV EN PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LA PROTECCIÓN SOLAR**

El control analítico de la composición de los productos cosméticos para la protección solar es necesario debido a que el contenido de los filtros UV en el producto acabado está relacionado con el Factor de Protección Solar (FPS) de la formulación, y por tanto con su eficacia protectora. Además, es necesario asegurar que los niveles de

concentración no sobrepasen los permitidos por la legislación vigente, para garantizar su seguridad, ya que se han descrito diversos problemas dermatológicos en usuarios de protectores solares (*Funk et al., 1995; Schauder e Ippen, 1997; Berne y Ros, 1998; Cook y Freeman, 2001*), y se han planteado algunas dudas sobre su inocuidad habiéndose sugerido la posibilidad de que el uso regular de protectores solares pudiera producir deficiencias en la síntesis de vitamina D, e incluso que alguno de los filtros orgánicos pudiera ser carcinogénico (*Apgar, 1999*), si bien estos aspectos no han sido confirmados. En un artículo publicado por *Gasparro et al. (1998)* se recogen algunos aspectos importantes relacionados con la seguridad y eficacia de los protectores solares. En un reciente estudio se abordan los beneficios y riesgos del uso de filtros UV (*Nohynek y Schaefer, 2001*).

Por tanto, resulta de gran interés el desarrollo de métodos analíticos que posibiliten el control de este tipo de productos, con el fin de asegurar que el Factor de Protección Solar es el que se espera de la formulación (*eficacia*) y que el contenido de filtros UV no sobrepase los límites establecidos por la legislación vigente (*seguridad*).

#### **1.5.1. Publicaciones referentes a la determinación de filtros UV en productos cosméticos:**

Tan sólo se conocen tres artículos publicados con anterioridad a la *Directiva Europea 76/768/CEE* referentes a este tema. *Eiden et al. (1969)* determinaron cualitativamente metil fenilbenzoxazol mediante cromatografía en capa fina y lo cuantificaron mediante gravimetría y espectrometría UV/VIS. Los mismos autores (*Eiden y Tenczer, 1971*) determinaron más tarde el cinoxato de forma cualitativa empleando cromatografía en capa fina, resonancia magnética nuclear y espectrometría UV/VIS. El primer artículo publicado empleando técnicas cromatográficas data de 1972 (*Paulus, 1972*), en el que se determinaron cinamatos y salicilatos mediante cromatografía de gases.

En una búsqueda bibliográfica informatizada empleando la base de datos Analytical Abstracts, Current Contents y ScienceFinder Scholar, desde el año 1976 hasta diciembre de 2002, se han encontrado del orden de 70 publicaciones referentes a la determinación de filtros UV en productos cosméticos. En la tabla 1.4 se muestran estas publicaciones, junto con los filtros UV determinados, técnica analítica empleada y una breve descripción del método de análisis empleado\*.

---

\* Se incluyen los artículos publicados que forman parte de esta Tesis Doctoral así como otros realizados por nuestro grupo de investigación.

Tabla 1.4. Artículos publicados sobre la determinación de filtros UV en productos cosméticos (1976-2002).

En el **Apéndice I** se indican las claves de las abreviaturas empleadas. Los filtros UV no permitidos actualmente por la legislación europea se han escrito entre paréntesis.

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
Schmitz-Masse et al. (1979)	(EP, GP)	GC Empleo de NMR y TLC con fines cualitativos		
Liem y Hilderink (1979)		TLC		
Mason (1980)	TiO <sub>2</sub>	FAAS		
Eiden y Tittel (1981 a)	BZ3, BZ4, MBC, OMC, PBS, PMC, 3BC, 4PB + (BZ12, CA, CX, BOR, BZL, DPG, IDM, MPB, OPB)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> AcCN:H <sub>2</sub> O (16:5) para liposolubles y MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1) para hidrosolubles		Se determinan en dos grupos según sean lipo ó hidrosolubles
Eiden y Tittel (1981 b)	BZ3, BZ4, MBC, PBS, PMC, 3BC, 4PB + (BZ12, CA, CX, BOR, BZL, DPG, IDM, MPB, OPB)			
Cumpelik (1982)	BZ3, HS, ODP, OMC, OS, PAB, PBS + (DT, GP, BZ8, CX, EHP, PDP, SA)	GC-FID	Patrones y muestra en piridina en caliente se derivatizan con HMDS+TMS. Centrifugación.	Análisis semicuantitativo
Masse et al. (1982)	EHP	HPLC-UV/VIS C <sub>18</sub> 10 µm, MeOH:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.02M (9:11) Empleo de NMR y TLC con fines cualitativos		
König y Ryschka (1983)	BDM, BZ3, BZ4, MBC, OMC, PBS, 3BC + (BOR, BZ2, BZ9, CA, CX, BZL, DPG, PDP, OPB, PMC)	HPLC-UV/VIS, Si hexano:AcOEt (93:7) para liposolubles y C <sub>18</sub> MeOH:H <sub>2</sub> O (2:3) para hidrosolubles		Se determinan en dos grupos según sean lipo ó hidrosolubles
Konig (1984)	BZ3, BZ4, MBC, OMC, PBS, 3BC + (BOR, BZ2, BZ9, CA, CX, BZL, DPG, PDP, OPB, PMC)	HPLC-UV/VIS, Si hexano:AcOEt (93:7) para liposolubles y C <sub>18</sub> MeOH:H <sub>2</sub> O (2:3) para hidrosolubles		Se determinan en dos grupos según sean lipo ó hidrosolubles
Tan et al. (1984)	BZ3, ODP	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 10 µm, MeOH:AcCN (90:10)	Patrones en MeOH. Lociones+H <sub>2</sub> O y dilución con MeOH. Labiales+CHCl <sub>3</sub> y dilución con MeOH. Filtración en ambos tipos de muestras.	

Tabla 1.4 (continuación)

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
Gagliardi et al. (1986)	PAB + (EP, GP)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 10 µm, AcCN:10 <sup>-2</sup> M NaClO <sub>4</sub> /5.10 <sup>-3</sup> M NH <sub>4</sub> Cl pH 3 (gradiente)	Muestra+NaCl+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M +MeOH en caliente. Dilución con MeOH y filtración. Patrones en MeOH.	Muestras aditivadas
Lu (1987)		UV/VIS	Muestra en EtOH.	Evaluación calidad Análisis cualitativo
Gagliardi et al. (1987)	BDM, BZ3, BZ4, CBM, MBC, ODP, OMC, PAB, 3BC + (BOR, BZ1, CA, GP, PS, SA)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 10 µm, AcCN:10 <sup>-3</sup> M HClO <sub>4</sub> /NaClO <sub>4</sub> (gradiente), y MeOH:H <sub>2</sub> O (85:15)	Patrones en MeOH se diluyen con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1 M. Se extraen con CHCl <sub>3</sub> y evapora, redisolviendo en MeOH, obteniendo dos grupos. Muestra+MeOH+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> se sonica. Se diluye con MeOH y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y se extrae con CHCl <sub>3</sub> y evapora, redisolviendo en MeOH, obteniendo dos grupos.	Se determinan en dos grupos por separado  Muestras aditivadas
Oshima y Saito (1987)	BZ3, ODP + (BZ2, CX, DR)	HPLC-UV/VIS, AcCN:H <sub>2</sub> O (variable según caso)	Muestras en THF	Se determinan en dos grupos por separado
Gagliardi et al. (1989)	BZ3, BZ4, HS, IMC, MBC, ODP, OMC, PBS + (BZ1, BZ2, BZ8, BZ9, CA, IBS)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 10 µm, AcCN:10 <sup>-3</sup> M HClO <sub>4</sub> /NaClO <sub>4</sub> (gradiente)	Patrones en MeOH se evapora y se extrae con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M, y el resto se redissuelven en MeOH. Muestra+MeOH+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> se sonica en caliente y centrifuga. Se evapora y se extraen los iónicos con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Resto en MeOH.	Se determinan en dos grupos por separado
Ikeda et al. (1989)	BDM, BZ3, ODP, OMC + (IDM, CX)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 150x4.6 mm, 5 µm, MeOH:THF:H <sub>2</sub> O (4:6:6)	Patrones en THF. Muestra en THF y ultrasonidos.	
Ikeda et al. (1990)	BDM, BZ3, ODP, OMC + (IDM, CX)	GC-MS Columna: 50% dimetil-50% difenilpolisiloxano	Patrones en THF. Muestra en THF y ultrasonidos.	
DiNunzio y Gadde (1990)	BZ3, OCR, ODP, OMC, OS + (MA)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 300x3.9 mm, 10 µm, THF:AcOH:H <sub>2</sub> O (55:0.09:44.91)	Patrones en THF se diluyen con H <sub>2</sub> O:THF. Muestras en THF+AcCN, se filtra, se añade H <sub>2</sub> O y THF	

Tabla 1.4 (continuación)

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
Gagliardi et al. (1990)	OT	HPLC-DAD, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 5 μm, MeOH:AcCN:H <sub>2</sub> O 1% AcOH (gradiente)	Muestra en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M y THF se somete a ultrasonidos en caliente, y se centrifuga.	
Narayanan et al. (1991)	PAB	RAMAN, empleando láser de Kr	Disoluciones de patrones y muestras en EtOH.	
Tomasella et al. (1991)	BZ3, ODP, OMC	MLC-UV, C <sub>8</sub> 250x4.6 mm, 10 μm, SDS 0.1M:i-propanol (90:10)	Patrones en MeOH se diluyen con fase móvil. Muestra en i-propanol se diluye con fase móvil y se filtra.	
Meyer y Powell (1991)	(OMP)	HPLC-TD, CN 300x3.9 mm, 5 μm ó 10 μm	Extracción con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :hexano seguida de adición de NaCl, centrifugación, evaporación, reconstitución con i-octano, y centrifugación.	
Ohba et al. (1991)		HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 5 μm, 85 % MeOH conteniendo cationes voluminosos.	Muestra en acetona (ó MeOH:CHCl <sub>3</sub> 1:1) y H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> se somete a ultrasonidos. Se filtra.	
Masse y Herpol-Borremans (1991)		HPLC-UV/VIS, TLC		Análisis cualitativo
Herpol-Borremans y Masse (1992)	OT	HPLC-UV/VIS C <sub>18</sub> , MeOH 100 %	Muestra se suspende en THF.	
Excofier et al. (1993)	BZ3, OMC, OS + (MA)	HPLC-DAD C <sub>8</sub> 150x4 mm, 5 μm, MeOH:H <sub>2</sub> O:AcOH (gradiente)	Patrones se disuelven en MeOH.	Estudio de resolución de mezclas empleando patrones (tratamiento matemático)
Hild (1993)	BZ3, IMC, MBC, ODP, OMC, PBS + (IDM)	HPLC-UV, C <sub>18</sub> ó C <sub>8</sub> 5 μm, 5 mM tampón AcO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> pH 3.8:AcCN (3:17) GC-FID		
Wallner (1993)	1) BDM, BZ3, MBC, OMC + (IDM) 2) BZ4, PAB, PBS + (DPG)	1) HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4 mm, 5 μm, 0.01 M fosfato pH 2.5:MeOH (15:85) 2) HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4 mm, 5 μm, 0.005 M AcO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> pH 3.8:AcCN (75:25)	Muestras se disuelven en fase móvil (distinta según filtros a analizar) mediante agitación y en caliente, y se filtran. Patrones se disuelven en fase móvil.	Se determinan en dos grupos por separado

Tabla 1.4 (continuación)

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
Ro et al. (1994)	BZ3, HS, OS + (BZ1, BZ2, BZ6, BZ8)	GC-MS Columna:100 % dimetilpolisiloxano	A patrones en DMF se añade BSTFA. Muestra se disuelve en DMF y ultrasonidos, se filtra y se añade BSTFA.	
Pietta et al. (1995)	BDM, BZ3, BZ4, PBS, + (BZ1)	MEKC-UV/VIS, tampón: SDS+AcCN+fosfato pH 7	Muestra+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M+MeOH y centrifugación. Se extrae con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , se filtra y se evapora a sequedad. Se disuelve en MeOH, y adición de tampón.	
Meijer y Loden (1995)	BZ3, BDM, OMC	HPLC-UV/VIS, C <sub>8</sub> 200x4.6, 5 μm, MeOH: 1% AcOH (gradiente)	Muestra se extrae con EtOH en caliente, se diluye con EtOH y se centrifuga.	Estudios de estabilidad en producto acabado
Chou et al. (1995)	(OMP)	HPLC-TD, Si 250x4.6 mm, hexano:acetona (49:1) Empleo de IR, NMR y MS con fines cualitativos	Muestra en MeOH, se pasa por resina de intercambio catiónico. Se eluye con MeOH y se extrae con éter. Se lava con agua, se seca y evapora. Se disuelve en hexano.	
Mori et al. (1996)	BDM, BZ3, ODP, OMC + (BZ1)	NMR	Muestras se agitan con solución NaCl+CHCl <sub>3</sub> . Se centrifuga, y fase orgánica se concentra a sequedad y se disuelve en CHCl <sub>3</sub> deuterado.	
Kawauchi et al. (1996)	TiO <sub>2</sub>	XRFS	Muestra se disuelve en H <sub>2</sub> O y se sonica. Se filtra.	
Broadbent et al. (1996)	OMC	SFC-MS Columna:30% fenil-70% metilpolisiloxano	Patrones en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ó MeOH, según estudio	Estudios isomerización-degradación empleando patrones
Schneider et al. (1996)	BDM, BZ3, BZ4, HS, MBC, OCR, ODP, OMC, OS, OT, PBS	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 150x4.6 mm, 5 μm, 0.1% TFA:MeOH:AcCN (gradiente)	Muestra en THF y ultrasonidos. Adición de MeOH y TFA 0.1%, y de nuevo ultrasonidos, y filtración. Patrones en MeOH o tampón/MeOH.	Muestra sintética
Jiang et al. (1996)	BDM, BZ3, ODP, OMC, OS	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 100x8 mm, 4 μm, MeOH: H <sub>2</sub> O (88:12)	Disolución de muestra en MeOH y centrifugación.	Estudios estabilidad en el producto acabado

Tabla 1.4 (continuación)

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
Scurei y Oprea (1996)	OMC, OS	UV/VIS (obtención espectros derivados)	Extracción de los filtros y medida de la primera derivada	
Cheng et al. (1997)	OMC	RAMAN, empleando láser de Ar	Extracción filtros con EtOH en ultrasonidos y en caliente, y centrifugación. Patrones en EtOH.	
Musial y Sherma (1997)	ODP	TLC-densitometría UV, C <sub>18</sub> 10x20 cm, MeOH:THF:H <sub>2</sub> O (10:7:3)	Muestras disueltas en i-PrOH.	
Yao et al. (1998)	BDM, BZ3, BZ4, MBC, ODP, OMC, OS, PAB + (IDM, PS, SA)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 220x4.6, 10 µm, MeOH:THF:H <sub>2</sub> O:HClO <sub>4</sub> (2000:2000:1600:1) 70%	Muestra en fase móvil se agita y se filtra.	
Musial y Sherma (1998)	OMC	TLC-densitometría UV, C <sub>18</sub> 10x20 cm, MeOH:THF:H <sub>2</sub> O (10:7:3)		
Rastogi y Jensen (1998)	BCS, BDM, BZ3, BZ4, CBM, HS, IMC, MBC, OCR, ODP, OMC, OS, OT, PBS, P25, TDS, 3BC + (IBS, IDM, UA)	HPLC-DAD, C <sub>18</sub> 150x4.6 mm, 5 µm, AcCN:THF:tampón citrato pH 9 (gradiente)	Patrones de OT en AcOEt, resto en MeOH. Muestra en MeOH+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 M en caliente, dilución con MeOH, filtración y dilución con fase móvil.	Análisis cualitativo
Vanquerp et al. (1999)	BDM, BZ3, MBC, ODP, P25	HPLC-UV/VIS, C <sub>8</sub> 250x4 mm, 5 µm, MeOH:AcOH 1% (gradiente)	Patrones P25 en agua y resto en EtOH.	Estudios de fotoestabilidad empleando patrones
Azevedo et al. (1999)	BZ4, PBS	UV/VIS (espectros derivados)	Patrones de BZ4 en EtOH, y PBS en TEA 0.1 M. Muestra se disuelve en EtOH o TEA según el analito a determinar	Se determinan por separado
Wang (1999)	BZ3, BZ4 + (BZ1, BZ2, BZ6, BZ8, BZ10)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 5 µm, AcCN:MeOH:H <sub>2</sub> O (30:30:40)	Patrones en EtOH:H <sub>2</sub> O (50:50). Lociones/cremas en MeOH:H <sub>2</sub> O y filtración. Labiales se someten extracción con CHCl <sub>3</sub> y MeOH, centrifugación, dilución con MeOH, y filtración.	
Scalia (2000)	BDM, BZ3, MBC, ODP, OMC	SFE-HPLC-UV/VIS, Ph 150x3 mm, 5 µm, MeOH:AcCN:THF:0.5% AcOH (45:10:10:35)	Extractos de muestra en EtOH.	
Westgate y Sherma (2000 a)	BZ3	TLC-densitometría UV, C <sub>18</sub>		

Tabla 1.4 (continuación)

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
* Salvador et al. (2000 b)	TiO <sub>2</sub> + (ZnO, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	1) MAE-ICP-AES (para TiO <sub>2</sub> ) 2) FAAS (para ZnO, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), llama de aire/acetileno	1) Muestra en medio ácido se irradia con MO. El residuo se funde a la llama y disuelve en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Patrones acuosos. 2) Patrones acuosos. Muestra se disuelve en IBMK+tensioactivo+agua.	
Shih y Cheng (2000)	BZ3, MBC, OMC	MAE-HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 5 μm, AcCN:H <sub>2</sub> O (90:10)	Muestras en MeOH se irradia con MO, se deja enfriar y se filtran.	
Wang y Chen (2000)	ODP, OMC, PAB + (EDP, EP, PDP)	1) SFE-MEK-UV/VIS, tampón 40 mM tetraborato disódico+CTAB+urea:AcCN (75:25) 2) SFE-HPLC-DAD, C <sub>18</sub> 250x4.6 mm, 5 μm, AcCN:0.50 % AcO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (gradiente)	1) Extractos de muestra en acetonitrilo, y diluidos con tampón. 2) Extractos de muestra en acetonitrilo, y diluidos con fase móvil.	
Westgate y Sherma (2000 b)	OS	TLC-densitometría UV		
Westgate y Sherma (2000 c)	OS	TLC-densitometría UV, C <sub>18</sub> 10x20 cm, MeOH:THF:H <sub>2</sub> O (10:7:3)	Disolución muestra y patrones en EtOH.	
Li et al. (2000)	BZ3, BZ4, ODP, OMC, OS + (PS)	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> , 10 μm, MeOH:THF:H <sub>2</sub> O (3:10:10)		
Fisher y Sherma (2000)	OCR	TLC-densitometría UV, C <sub>18</sub> 10x20 cm, MeOH:THF:H <sub>2</sub> O (10:7:3)	Muestra se extrae con EtOH.	
* Chisvert et al. (2001 a)	BZ3, OMC	FIA-UV/VIS (espectros derivados) Portador: EtOH	Disolución de muestra en EtOH y filtración. Patrones en EtOH.	
Fourneron (2001)	BDM, OMC	HPLC-DAD		Estudio resolución mezclas empleando patrones
* Chisvert et al. (2001 b)	BZ3	FIA-UV/VIS, SIA-UV/VIS Portador: EtOH. Reacción de complejación con Ni <sup>+2</sup> en medio amoniacal en línea.	Disolución de muestra en EtOH y filtración. Patrones en EtOH.	
* Chisvert et al. (2001 c)	BZ3, BZ4, HS, ODP, OMC, OS	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 125x4 mm, 5 μm, EtOH:AcOH 1.7% (70:30)	Disolución de muestra en EtOH y filtración. Patrones en EtOH.	

Tabla 1.4 (continuación)

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
Chrompack Application note (2001)	BDM, BZ3, ODP, OMC, OS	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 150x4.6 mm, THF:8.16 mM ac hexanosulfónico:AcOH (50:49:1)		Estudio en patrones
* Chisvert et al. (2001 d)	BDM, BZ3, BZ4, HS, ODP, OMC, OS	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 125x4 mm, 5 µm, EtOH:AcOH 1.7% (70:30) conteniendo 65.4 mM de HP-β-CD	Disolución de muestra en EtOH y filtración. Patrones en EtOH.	
* Salvador et al. (2001 a)	BZ3	MAE-SIA-UV/VIS Portador: EtOH. Reacción de complejación con Ni <sup>2+</sup> en medio amoniacal en línea.	Muestra se suspende en EtOH y se irradia con MO. Se añade NH <sub>4</sub> OH 25%, se filtra y diluye con EtOH. Patrones en EtOH: NH <sub>4</sub> OH 25 % (96:4).	
* Salvador et al. (2001 b)	HS	SFE-HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 125x4 mm, 5 µm, EtOH:AcOH 0.4% (75:25)	Patrones de HS en EtOH. Extractos se recogen en EtOH y se filtran si es necesario.	Muestras sintéticas
Masse et al. (2001)	ODP, PAB, P25 + (GP, EHP)	GC-MS, NMR		Análisis cualitativo
Masse y Herpol-Borremans (2001)	HS, ODP, OS	HPLC-UV/VIS	Muestra se suspende en MeOH.	
Chang y Chang (2001)	BDM, BZ3, OMC, OS	Voltimetría Electrodo mixto de resina epoxi y carbon	Muestra en MeOH se agita y centrifuga. El extracto se filtra y diluye con electrolito.	
Wang (2002)	BZ3, OMC, OS	Voltimetría Electrodos de carbono vitrificado y mercurio		
* Townshend et al. (2002)	ODP	FIA-CL, Portador: EtOH:H <sub>2</sub> O (70:30), Reactivo: KMnO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Disolución de la muestra en portador, y filtración. Patrones de ODP en portador.	
* Chisvert et al. (2002 a)	BZ4, PBS	SIA-SPE-UV/VIS Portador: agua, eluyente: HCl 0.1 y 1 M	Disolución de muestra y patrones en agua. Extracción en fase sólida en línea.	
Mazonakis et al. (2002)	OMC	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 250x4.5 mm, 5 µm, MeOH:H <sub>2</sub> O (90:10)	Residuos de la limpieza con agua caliente y detergentes del reactor se inyectan directamente. Patrones de OMC en i-propanol.	Estudio proceso de limpieza reactores

Tabla 1.4 (continuación)

Ref.	Filtros UV	Técnica instrumental	Procedimiento	Comentario
* Chisvert y Salvador (2002)	BZ4, PBS, TDS	HPLC-UV/VIS, C <sub>18</sub> 125x4 mm, 5 µm, EtOH:tampón acetato 20 mM pH 4.6 (30:70)	Disolución de muestra y patrones en fase móvil.	
Klampfl et al. (2002)	BDM, BZ3, HS, MBC, OCR, ODP, OMC, OS, PBS	MEKC-DAD, tampón: SDS+Brij 35+ 1-butanol+n-octano+2-propanol+borato pH 9.2		Estudio con patrones
* Chisvert et al. (2002 b)	PAB	SIA-UV/VIS, Portador: EtOH. Reacción de diazotación con NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y acoplamiento con oxina en línea.	Disolución de la muestra en EtOH:HCl 0.1 M (80:20), y filtración. Patrones en EtOH:HCl 0.1 M (80:20).	
Rastogi (2002)	BDM, BZ3, DRT, HS, IMC, MBC, OCR, ODP, OMC, OS, OT, PBS, P25, TDS	HPLC		

\* Artículos publicados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral.

Como se observa en la tabla 1.4, el número de publicaciones sobre el tema ha ido en aumento en estos últimos años, lo que indica el interés de la comunidad científica en este campo. En la figura 1.1 se muestra un diagrama donde se manifiesta más clara esta evolución.

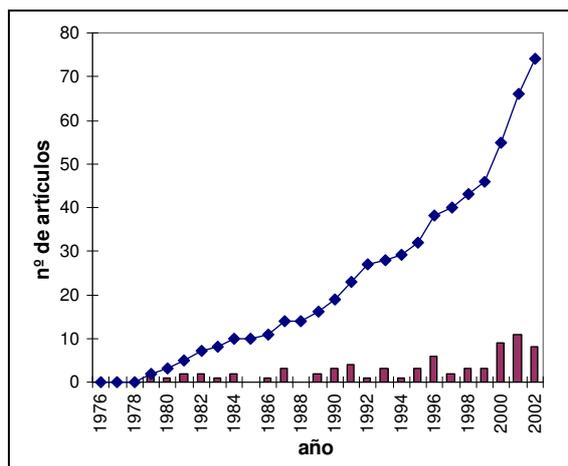


Fig. 1.1. Histograma de la evolución con los años del número de artículos publicados sobre la determinación de filtros UV en productos cosméticos. La línea continua representa el número acumulado de artículos.

En cuanto a las técnicas analíticas empleadas para la determinación cuantitativa, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido la más empleada. Otras técnicas cromatográficas, como la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de gases (GC) y otras técnicas afines también han sido propuestas por diversos autores. La espectrometría molecular ha sido empleada en menor medida y tan sólo dos publicaciones hacen referencia al empleo de técnicas electroquímicas. Técnicas de espectrometría atómica, tales como absorción atómica con atomización en llama (FAAS), emisión atómica con atomización en plasma acoplado por inducción (ICP-AES) y fluorescencia de rayos X (XRFS) han sido propuestas para el análisis de filtros físicos.

Las técnicas de espectrometría UV/VIS y NMR, cromatográficas como TLC y GC-MS, e incluso HPLC con detector de fila de diodos (DAD), han sido también empleadas con fines cualitativos.

En la figura 1.2 se muestra una clasificación de los artículos publicados en función de la técnica analítica empleada para la determinación de filtros UV.

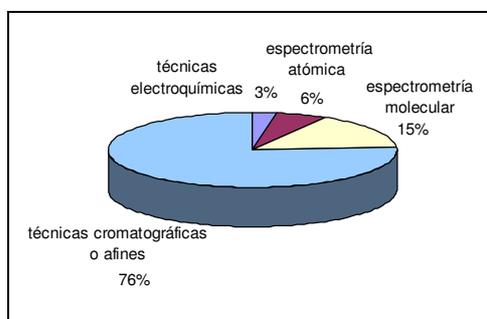


Fig. 1.2. Representación del porcentaje de trabajos publicados sobre el tema en función del tipo de técnica empleada.

El hecho de que las técnicas cromatográficas sean las más utilizadas en el análisis de filtros químicos, se debe a que se trata de compuestos orgánicos fácilmente liposolubles, que son habitualmente mezclados en las formulaciones y por tanto dificultan su determinación por medida directa sin previa separación. No obstante se han propuesto estrategias para la determinación directa de mezclas mediante espectrometría UV/VIS, empleando espectros derivados (*Scurei y Oprea, 1996; Azevedo et al., 1999; Chisvert et al., 2001a* (Capítulo 2 de esta memoria)) o extracción en fase sólida en línea mediante un sistema de inyección secuencial (*Chisvert et al., 2002a* (Capítulo 4 de esta memoria)).

También cabe indicar que incluso empleando técnicas cromatográficas resulta a veces difícil separar todos los analitos de interés. Así, aún empleando cromatografía líquida se recurre, en algunos casos, a una separación previa mediante extracción líquido-líquido (*Gagliardi et al., 1987; Gagliardi et al., 1989*) o bien al empleo de modificadores que añadidos convenientemente a la fase móvil posibilitan la separación de compuestos que inicialmente coeluyen (*Chisvert et al., 2001 d* (Capítulo 7 de esta memoria)).

También cabe indicar que debido al gran número de filtros UV y a su diferente naturaleza, a veces resulta muy difícil la determinación simultánea mediante cromatografía líquida de los analitos de interés debido a incompatibilidades en el tratamiento de la muestra (como puede ser simplemente el disolvente empleado para su disolución) o bien la necesidad de condiciones cromatográficas muy diferentes y a la vez incompatibles entre sí, y se recurre a la determinación en dos grupos (*König y Ryschka, 1983; König, 1984; Ohshima y Saito, 1987; Wallner, 1993*).

A menudo también se emplean estrategias para la separación previa de los componentes de la matriz que pueden llegar a interferir, bien mediante extracción líquido-líquido (*Meyer y Powell, 1991; Pietta et al., 1995, Wang, 1999*) o mediante el uso de resinas de intercambio iónico (*Chou et al., 1995*), tratamientos que, obviamente, dificultan el proceso y aumentan el tiempo total de análisis.

El pretratamiento de la muestra también viene condicionado por el tipo de cosmético, de forma que su disolución es más o menos dificultosa. Es el caso de protectores labiales o maquillajes que incorporan filtros UV en su formulación, cuya total solubilización es a menudo imposible y se requiere de una etapa previa de extracción de los analitos. Se han empleado técnicas como la extracción asistida por microondas (MAE) (*Salvador et al., 2000 b; Shih y Cheng, 2000; Salvador et al., 2001 a*), o la extracción con fluidos en estado supercrítico (SFE) (*Scalia, 2000; Whang y Cheng, 2000; Salvador et al., 2001 b*).

Otros pretratamientos que cabría comentar serían aquellos en que se realizan reacciones de derivatización, como es el caso de *Cumpelik (1982)* y *Ro et al. (1994)* que realizan una silylación de los filtros UV para su determinación por cromatografía de gases con el fin de conseguir determinar filtros ionizables de alto punto de ebullición o bien aumentar la sensibilidad, respectivamente. El empleo de reacciones de formación de complejos para la determinación mediante espectrometría de absorción molecular en la zona del visible de benzofenona-3 (*Chisvert et al., 2001 b* (Capítulo 3 de esta memoria); *Salvador et al., 2001 a*), o la reacción de diazotación-acoplamiento empleada para la determinación de ácido p-aminobenzoico (*Chisvert et al., 2002 b*) constituyen también ejemplos de reacciones de derivatización.

Algunos de los métodos descritos en la tabla 1.4 presentan buenas características desde el punto de vista analítico para ser utilizados en la determinación de filtros UV en productos cosméticos para la protección solar. Sin embargo, la característica de la que carecen la mayoría de ellos es la inocuidad de los disolventes y/o reactivos empleados, tanto para el analista, que debe extremar las precauciones a la hora de realizar los análisis (de rutina en la mayoría de los casos, debido a la necesidad diaria de controlar el proceso de fabricación en las empresas del sector), como para el medio ambiente debido a los residuos generados. Es aquí donde la denominada "Química Verde" (del término en inglés "Green Chemistry"), que surgió en los años 90 como una forma de utilización de las habilidades, conocimientos y talento de los químicos

para evitar la amenaza que podrían suponer los procesos químicos tanto para la salud humana como para el medio ambiente (*Anastas, 1999*), puede realizar útiles aportaciones. Una de las áreas más activas de la investigación en la "Química Verde" es el desarrollo de métodos analíticos. La "Química Analítica Verde" ("Green Analytical Chemistry") (*Namiesnick, 2001*) se dedica al diseño, desarrollo y validación de nuevos métodos analíticos que eliminen o al menos reduzcan el uso y generación de sustancias peligrosas en todas las etapas del análisis químico, desde la preparación de las muestras hasta la medida de la señal analítica.

Algunas de las estrategias que podrían adoptarse para conseguir métodos analíticos más "verdes" o "limpios" (*Salvador et al., 2002 a; Salvador et al., 2002 b*) son:

- ❖ Diseño de métodos automatizados de análisis en flujo continuo y/o secuencial, que disminuyen el contacto del operador con los productos químicos y permiten la minimización de los reactivos y disolventes utilizados en los métodos convencionales, con lo que se consigue disminuir la peligrosidad del procedimiento tanto para el operador como para el medio ambiente, así como los residuos generados, lográndose además abaratar los costes del procedimiento (*Rocha et al., 2001*)
- ❖ Diseño de métodos alternativos de análisis en los que se sustituyen los reactivos químicos peligrosos por reactivos inocuos para la salud humana y el medio ambiente

En este sentido, el grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral ha realizado un esfuerzo para intentar desarrollar métodos de análisis que podrían enmarcarse dentro de la mencionada "Química Analítica Verde". Algunos de estos métodos de análisis "limpios" podrían ser considerados por los organismos europeos a la hora de elaborar los protocolos de los métodos oficiales para el análisis de productos cosméticos para la protección solar, por sus especiales características de exactitud, precisión, rapidez, simplicidad y ausencia de toxicidad tanto para el operador como para el medio ambiente. Estas características facilitan su aplicación para el control de producción que, en muchos casos podría ser realizado, a pie de fábrica, en las propias industrias cosméticas.

## **1.6. CONCLUSIONES**

La mayor exposición de la población humana a la radiación solar derivada de las costumbres actuales junto con el actual deterioro de la capa de ozono, hace necesaria una mayor protección frente a la radiación solar para evitar los efectos perjudiciales para la salud, que podrían evitarse por el uso de productos cosméticos para la protección solar.

La eficacia de este tipo de productos viene determinada por el contenido y tipo de filtros UV en su formulación, estando limitados por la legislación para asegurar la inocuidad del producto acabado ya que se han descrito diversos problemas dermatológicos como consecuencia del uso de este tipo de productos.

Sin embargo, no existen en la actualidad métodos analíticos oficiales para el control de los productos solares, por lo que su desarrollo y propuestas resultan de gran interés.

En la bibliografía existen del orden de 70 publicaciones referentes al análisis de este tipo de productos, pero en la mayoría de los casos se trata de métodos que implican operaciones previas de extracción, lo que aumenta la manipulación de la muestra y ralentiza el procedimiento, y además se emplean disolventes y/o reactivos en cantidades que pueden ser perjudiciales para el analista y/o para el medio ambiente.

Por tanto, surge la necesidad de desarrollar métodos analíticos para el control de los productos cosméticos para la protección solar, que sean a la vez que exactos y precisos, rápidos y sencillos, y lo más inocuos posible.



## **SEGUNDA PARTE**

### **DETERMINACIÓN DE FILTROS UV MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS AUTOMATIZADOS**



La gran demanda de análisis químicos de diversos sectores empresariales y de consumo en la década de los años 70, provocó el desarrollo de un gran número de instrumentos y metodologías para llevar a cabo los análisis de forma automatizada (*van Gemert, 1973; Ruzicka y Hansen, 1975*).

Los primeros métodos se basaron en el “análisis en modo estático” (del inglés *batch analysis*). En estos sistemas, la muestra se sitúa en la celda de medida y se añaden de forma automatizada diferentes volúmenes de disoluciones tampón y/o reactivos, pudiéndose realizar cambios de temperatura si el proceso lo requiere, agitación, etc. De este modo la contaminación entre diferentes muestras es mínima, ya que cada muestra permanece en cada una de las cubetas durante todo el proceso, y además se obtiene una moderada velocidad de muestreo.

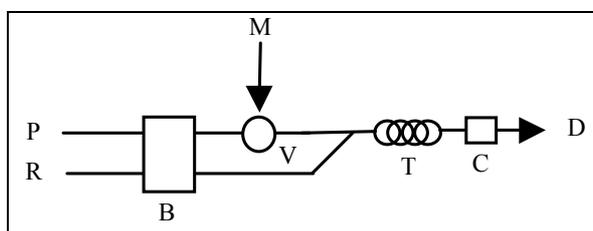
Así mismo se diseñaron los sistemas basados en el “análisis en flujo continuo” (del inglés *continuous flow analysis*), donde la disolución de muestra se aspira a través de una conducción (generalmente tubos de teflón), y permanece en movimiento dentro de ella, haciéndose confluír otros canales por los que circulan disoluciones de reactivos, hasta llegar a la celda de medida, donde la señal se registra continuamente. A continuación se cambia de disolución de muestra y se repite el ciclo. La mayor ventaja de este sistema es su versatilidad, pudiéndose realizar multitud de procesos en línea, tales como calentamiento, extracción líquido-líquido, filtración, diálisis, decantación e incluso destilación. Sin embargo, presenta el inconveniente de consumir un volumen más o menos grande de muestra; y además la facilidad de contaminación de una muestra con la que la precede, que es mayor cuando mayor es la velocidad de muestreo. No obstante, este último inconveniente puede minimizarse intercalando disolvente entre muestra y muestra, lo que disminuye la frecuencia de muestreo.

Otra metodología desarrollada fue la de los sistemas de “análisis en flujo continuo segmentado” (del inglés *air-segmented flow continuous analysis*). En estos sistemas se introducen segmentos de aire entre los diferentes bolos de muestra aspirados, reduciendo, por tanto, los problemas de contaminación.

Otro sistema de análisis automatizado es el basado en el “análisis en flujo detenido” (del inglés *stop-flow analysis*), donde la disolución de muestra y reactivo/s se mezclan inyectándolas en una cámara de

mezclado y una vez han reaccionado se conduce hasta la celda de medida, donde se detiene el flujo y se mide la señal analítica.

Sin embargo, no fue hasta la aparición en 1975 de los sistemas de “análisis por inyección en flujo continuo” (del inglés *flow injection analysis*) (FIA) (Ruzicka y Hansen, 1975) cuando se produjo un verdadero incremento del uso de los sistemas automatizados. En estos sistemas, la disolución de muestra es inyectada en el seno de una corriente continua de disolución portadora (que contiene los reactivos adecuados o bien se hace confluir con un canal que los contenga) y que es impulsada por una bomba peristáltica, de modo que se produce la dispersión del bolo de disolución de muestra inyectado generándose la señal analítica que es medida a su paso por la celda de flujo, obteniéndose picos cuya altura es mayor al aumentar el rendimiento de la reacción y menor es la dispersión del bolo de muestra. Por tanto, tienen lugar dos procesos simultáneamente: dispersión del bolo de disolución de muestra en el seno de la disolución portadora (*proceso físico*), y formación de un producto al reaccionar las moléculas de analito con las de reactivo (*proceso químico*). En la siguiente figura se muestra un esquema de un montaje FIA típico.



Esquema de un montaje FIA. (P) disolución portadora, (R) disolución de reactivos, (B) bomba peristáltica, (M) disolución de muestra, (V) válvula de inyección, (T) tubo de reacción, (C) celda de detección, (D) desechos.

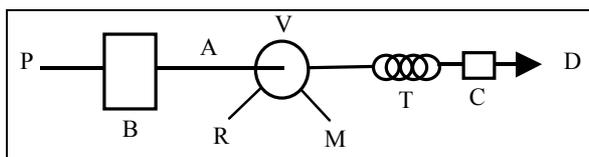
La mayor ventaja de los sistemas FIA respecto a los anteriores es el bajo consumo de disolución de muestra (del orden de  $\mu\text{l}$ ) y de reactivos (generalmente por debajo de 1 ml) en cada inyección, y la alta frecuencia de muestreo (Ruzicka, 1992).

En una búsqueda bibliográfica en la base de datos “*Analytical Abstracts*” (1980-2002) se pueden encontrar más de 8000 artículos en los que se emplean sistemas FIA. Entre ellos se encuentran numerosos artículos de revisión que muestran el gran interés y la gran aplicabilidad de este tipo de sistemas, y en los que se recogen también aspectos

teóricos y desarrollo de nueva instrumentación (*Ruzicka y Hansen, 1980; Ruzicka y Hansen 1983; Luque de Castro y Valcárcel, 1984; Luque de Castro, 1986; Ruzicka y Hansen 1986; Lázaro et al., 1988; Clark et al., 1990; Valcárcel y Luque de Castro, 1990; Ruzicka y Hansen, 2000*). Además se han escrito varios libros donde también se discuten los principios, aplicaciones y desarrollo de nueva instrumentación (*Ruzicka y Hansen, 1981; Ueno y Kina 1983; Valcárcel y Luque de Castro, 1987; Moller, 1988; Karlberg y Pacey, 1989; Trojanowicz, 2000*).

En lo que al análisis de productos cosméticos se refiere, se pueden encontrar unos pocos artículos en los que se utilizan este tipo de sistemas. Se han determinado diferentes tensioactivos (*León-González et al., 1990*), tioles (*Gerakis y Koupparis, 1993*), formaldehído (*Gámiz-Gracia y Luque de Castro, 1999 a*), colorantes (*Capitán-Vallvey et al., 2000; Capitán-Vallvey et al., 2002 a*), antioxidantes (*García y Ortiz, 2000; Capitán-Vallvey, 2001; Capitán-Vallvey et al., 2002 b*), fluoruro (*Salman et al., 1997*), cinc (*Ayora-Cañada et al., 1998*) y mercurio (*Gámiz-Gracia y Luque de Castro, 1999 b*). No existen antecedentes previos a la realización de esta Tesis Doctoral referentes a la determinación de filtros UV en productos cosméticos para la protección solar mediante sistemas FIA.

La necesidad de modificar la configuración del sistema para cada ligera variación efectuada (por ejemplo, un simple cambio en el volumen de muestra a inyectar implicaría cambiar el bucle de la válvula de inyección) propiciaron la aparición de un nuevo tipo de sistema automatizado que fue llamado “análisis por inyección secuencial” (del inglés *sequential injection analysis*) (SIA) (*Ruzicka y Marshall, 1990*). En la siguiente figura se muestra un esquema típico de un montaje SIA.



Esquema de un montaje SIA. (P) disolución portadora, (B) bomba peristáltica o bureta automática, (A) tubo de almacenamiento, (R) disolución de reactivo, (M) disolución de muestra, (V) válvula multicanal, (T) tubo de reacción, (C) celda de detección, (D) desechos.

Los principios en los que se basan los sistemas SIA, son similares a los de los sistemas FIA (dispersión del bolo de muestra y reacción entre

moléculas de analito y reactivos), aunque en el modo de operar difieren considerablemente.

En los sistemas SIA, diferentes volúmenes perfectamente definidos de disoluciones de muestra y reactivo son secuencialmente aspirados (con ayuda de una bomba peristáltica o una bureta automática) a través de una válvula multicanal al interior del llamado “tubo de almacenamiento”. A continuación se invierte el sentido del flujo, y girando convenientemente la válvula, se conducen los bolos de muestra y reactivos hasta la celda de medida a través del tubo de reacción, obteniéndose picos al igual que en los sistemas FIA.

Durante la aspiración de las disoluciones y su almacenamiento, tienen lugar fenómenos de dispersión, y al invertir el flujo se aumenta el contacto entre el bolo de disolución de muestra y reactivo, con lo que antes de llegar al tubo de reacción ya tiene lugar la formación de producto (*Ruzicka y Marshall 1990*). Por otro lado, el orden de aspiración de la disolución de muestra y disolución/es de reactivo/s, al igual que la relación de volúmenes entre los diferentes bolos aspirados, repercuten en el perfil del pico obtenido, y por tanto en la sensibilidad y en la frecuencia de muestreo (*Marshall y van Staden, 1992; van Staden et al., 1997*).

Además de la versatilidad de los sistemas SIA y la capacidad de acomodar el montaje a los posibles cambios requeridos para llevar a cabo un análisis determinado, todo el proceso puede programarse mediante el uso de un programa informático, de modo que los movimientos del sistema de propulsión y la válvula están sincronizados a la vez que automatizados. Además, el volumen de reactivos consumido en los sistemas SIA es mucho menor que en los sistemas FIA, y por tanto el volumen de residuos generados también es menor (*Leneham et al., 2002*). Sin embargo, generalmente los sistemas SIA presentan la desventaja respecto a los FIA de que la frecuencia de muestreo que permiten es menor (*Gubeli, 1991; Ruzicka y Gubeli, 1991*). *Cerdá et al. (2001)* comparan ambos tipos de sistemas, enumerando las ventajas e inconvenientes.

En una búsqueda bibliográfica en la base de datos “*Analytical Abstracts*” (1990-2002) se pueden encontrar del orden de 300 artículos en los que se emplean sistemas SIA. En diversos artículos de revisión se establecen los principios, aplicaciones e instrumentación de los sistemas SIA (*Christian GD, 1994; Taljaard y van Staden, 1998; Pasekova et al., 1999; Barnett et al., 1999; Liu y Fang, 1999; Sakai y Teshima, 2001; Lenehan CE et al., 2002*). No existen antecedentes previos a la

realización de esta Tesis Doctoral del empleo de sistemas SIA en el análisis de productos cosméticos de ningún tipo.

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado diversos procedimientos automatizados (empleando sistemas FIA y/o SIA) que posibilitan la determinación de este tipo de compuestos de una manera rápida, exacta y precisa.



## CAPÍTULO 2

### **DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE OCTIL METOXICINAMATO Y BENZOFENONA-3 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA UV DERIVADA**

El contenido de este Capítulo ha sido publicado en *Anal Chim Acta* (2001) 428:183-190, y presentado como cartel en la *XI Reunión Científica de la Sociedad Española de Química Analítica*, Valencia, 1999.



## 2.1. INTRODUCCIÓN

### 2.1.1. Interés de la determinación de octil metoxicinamato y benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar:

A la hora de formular un protector solar, es bastante frecuente realizar mezclas de dos o más filtros UV, ya que la protección que proporciona este tipo de filtros depende de su espectro en el UV y de su concentración. De ese modo se consigue cubrir una zona más amplia del espectro UV, y además se incrementa el poder absorbente en una determinada zona sin sobrepasar el límite establecido por la legislación para cada filtro.

Una de las mezclas utilizadas habitualmente en los productos cosméticos para la protección solar es la de la benzofenona-3 (BZ3) y octil metoxicinamato (OMC), por su complementariedad en la zona de absorción (figura 2.1).

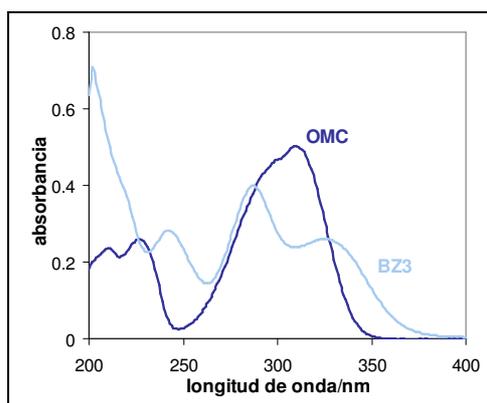


Fig. 2.1. Espectro UV de disoluciones de 6  $\mu\text{g/ml}$  de BZ3 y OMC en etanol.

El uso de ambos filtros UV está autorizado por la legislación europea hasta una concentración máxima del 10 % en el producto acabado.

En el presente capítulo se pretende poner a punto un método analítico para su determinación simultánea mediante espectrometría de absorción molecular en el UV en muestras de protectores solares.

### **2.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:**

La determinación simultánea de BZ3 y OMC en productos para la protección solar se ha llevado a cabo en la mayoría de los casos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (*Eiden y Tittel, 1981 a; König y Ryschka, 1983; König, 1984; Gagliardi et al., 1987; Gagliardi et al., 1989; Ikeda et al., 1989; DiNunzio y Gadde, 1990; Hild, 1993; Wallner, 1993; Meijer y Loden, 1995; Jiang et al., 1996; Schneider et al., 1996; Yao et al., 1998; Scalia, 2000; Shih y Cheng, 2000; Li et al., 2000; Rastogi, 2002*). Otras técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases (GC) (*Cumpelik, 1982; Ikeda et al., 1990*) también ha sido propuesta por otros autores. Tan sólo se ha publicado un artículo en el que se determinan simultáneamente mediante resonancia magnética nuclear (NMR) (*Mon et al., 1996*) y dos en los que se emplean métodos electroquímicos (*Chang et al., 2001; Wang, 2002*).

### **2.1.3. Justificación del objetivo del trabajo:**

En el presente capítulo se pretende poner a punto una metodología analítica, exacta y rápida, para la determinación simultánea de BZ3 y OMC en productos solares comerciales, que se pueda emplear fácilmente en los laboratorios de las empresas de fabricación de cosméticos, para controlar la composición de estos productos.

La metodología que se propone se basa en la resolución de la mezcla mediante espectrometría UV/VIS derivada. Esta técnica es de gran interés en química analítica ya que permite resolver mezclas de analitos o eliminar interferencias debidas a otros componentes de la matriz. En la bibliografía analítica se pueden encontrar diversos artículos en los que se discuten diferentes métodos de obtención de los espectros derivados y las aplicaciones de esta sencilla técnica (*Bosch-Ojeda, 1995; Kus et al., 1996*).

En el presente artículo se propone el empleo del modelo isodiferencial (en inglés "zero crossing"), y el procedimiento se ha automatizado mediante el empleo de un sistema de inyección en flujo continuo (FIA).

El uso de espectros derivados se ha utilizado en diversos trabajos para resolver mezclas, especialmente con detección UV/VIS (*Morales-Rubio et al., 1994; Ródenas et al., 1998; García-Rodríguez et al., 1998*), pero tan solo existen dos artículos en los que se automatiza el

procedimiento empleando sistemas FIA (*Vereda et al., 1997; López-Lavernia et al., 1999*).

El empleo de los espectros derivados también se ha utilizado en el análisis de algunos productos cosméticos, determinándose diversos colorantes (*Capitán-Vallvey et al., 1995; Capitán-Vallvey, 1997*). Pero, en las bases de datos consultadas durante la realización de este trabajo, tan sólo se encontraron dos antecedentes del uso de la espectrometría derivada en la determinación de mezclas de filtros UV en productos cosméticos. *Scurei y Oprea (1996)* determinaron octil salicilato (OS) y OMC en protectores solares, y *Azevedo et al. (1999)* determinaron benzofenona-4 (BZ4) y ácido fenil bencimidazol sulfónico (PBS) por separado, efectuando un pretratamiento de la muestra diferente según el analito a determinar. En ningún caso se llevaron a cabo las determinaciones empleando sistemas automatizados. En el presente capítulo se propone por primera vez un método para el análisis de productos cosméticos para la protección solar empleando un sistema FIA.

## **2.2. MÉTODO DE REFERENCIA: DETERMINACIÓN DE OCTIL METOXICINAMATO Y BENZOFENONA-3 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

Se determinó el contenido de OMC y BZ3 en tres muestras de cremas solares comerciales mediante HPLC.

Estas experiencias se realizaron para poder evaluar posteriormente la exactitud del método propuesto. El procedimiento experimental utilizado se basa en un método propuesto por *DiNunzio y Gadde (1990)*, ya que no existen métodos analíticos oficiales para el análisis de este tipo de productos.

### **2.2.1. Método de referencia. Parte experimental:**

#### **2.2.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un cromatógrafo de HPLC marca Hitachi con bucle de inyección de 20 µl, con bomba de alta presión Hitachi modelo L-7100 y con detector UV/VIS Hitachi modelo L-7420. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> (LiChrospher® RP-18 (12.5 cm x 4 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm)) de la casa comercial Merck.

### 2.2.1.2. Reactivos y muestras:

Octil metoxicinamato (OMC) 99.8 %, d=1.01 g/ml (Roig Farma S.A., Terrasa, Barcelona) y benzofenona-3 (BZ3) 98 % (Aldrich, Barcelona) se emplearon para preparar las disoluciones patrón. 2,2'-dihidroxi-4,4'-dimetoxibenzofenona 98 % (Aldrich) se empleó como patrón interno (PI). Los disolventes empleados fueron: tetrahidrofurano (THF) grado HPLC (Scharlab, Barcelona), ácido acético glacial (AcOH) para análisis (Panreac, Barcelona) y agua desionizada (empleando un sistema NANOpurell de Barnstead (Boston, EEUU)).

Las muestras de productos cosméticos, comercializadas por Laboratorios Expanscience (Madrid), de FPS 4 (*muestra A*), FPS 8 (*muestra B*) y FPS 20 (*muestra C*) fueron adquiridas en supermercados locales.

### 2.2.1.3. Procedimiento experimental:

Las muestras se prepararon por triplicado, disolviendo 0.5-3 g en 50 ml de THF. A continuación se filtraron a través de papel Whatman nº 42. A 2 ml del filtrado se añadieron 2 ml de disolución de patrón interno (0.6 mg/ml en THF) y 10 ml de agua desionizada, aforando hasta 25 ml con THF.

Se emplearon disoluciones de BZ3 (10-50 µg/ml) y OMC (20-100 µg/ml) en THF, conteniendo la misma cantidad de patrón interno y agua desionizada, como disoluciones patrón para construir la recta de calibrado.

Se inyectaron 20 µl de las disoluciones de las muestras y patrones, empleando THF:H<sub>2</sub>O:AcOH 55:44.91:0.09 (v/v/v) como fase móvil a un caudal constante de 0.5 ml/min. La detección se llevó a cabo a 313 nm.

### 2.2.2. Método de referencia. Resultados:

En experiencias anteriores al análisis se inyectaron por separado disoluciones de OMC, BZ3 y patrón interno (PI), con el fin de conocer el tiempo de retención en las condiciones de trabajo para posteriormente poder asignar los picos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Tiempos de retención de los analitos y patrón interno.

componente	Tiempo de retención/min
PI	4.11
BZ3	5.19
OMC	13.21

A continuación se obtuvieron los cromatogramas de las disoluciones patrón. En la figura 2.2 se muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma correspondiente a una disolución patrón conteniendo 80 µg/ml de OMC, 40 µg/ml de BZ3 y 50 µg/ml de PI.

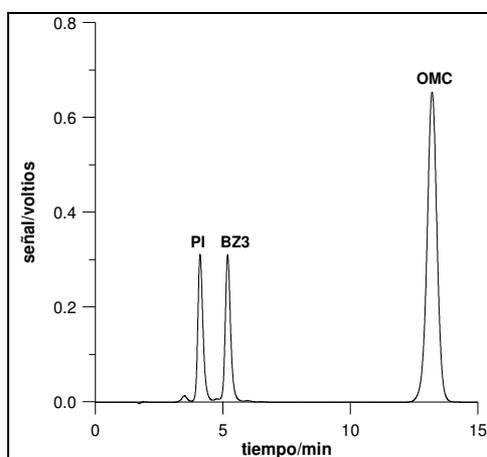


Fig. 2.2. Cromatograma de una disolución patrón conteniendo 80 µg/ml de OMC, 40 µg/ml de BZ3 y 50 µg/ml de PI.

La recta de calibrado de cada uno de los analitos se obtuvo representando el cociente entre el área del pico del analito y el área del pico del patrón interno frente a la concentración de analito, resultando ser:

$$A'_{\text{OMC}} = - (4 \pm 6) \cdot 10^{-2} + (5.28 \pm 0.09) \cdot 10^{-2} \cdot C_{\text{OMC}} ; r^2 = 0.9995; N=5$$

$$A'_{\text{BZ3}} = - (2 \pm 1) \cdot 10^{-2} + (2.56 \pm 0.04) \cdot 10^{-2} \cdot C_{\text{BZ3}} ; r^2 = 0.9994; N=5$$

siendo **A'** el cociente de áreas y **C** la concentración en µg/ml, respectivamente.

Los cromatogramas de las muestras se realizaron en las mismas condiciones que las de los patrones. En la figura 2.3 se muestra un cromatograma correspondiente a la disolución de la muestra C.

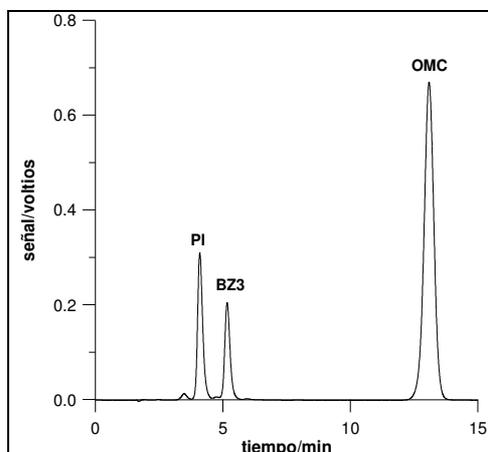


Fig. 2.3. Cromatograma correspondiente a la muestra C.

Los valores de concentración de cada uno de los analitos, obtenidos como media de tres réplicas, para cada una de las muestras ( $C_{ref}$ ) y sus desviaciones estándar ( $S_{ref}$ ) se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Concentración de los analitos en las muestras comerciales obtenida por el método de referencia.

Muestra	$C_{ref} \pm S_{ref} / \% (m/m)$	
	OMC	BZ3
A	$1.91 \pm 0.02$	N.D.*
B	$4.91 \pm 0.02$	$0.94 \pm 0.02$
C	$9.2 \pm 0.1$	$3.16 \pm 0.07$

\* No detectable

*Estos resultados se utilizarán posteriormente para compararlos con los obtenidos por el método propuesto, con el fin de evaluar su exactitud.*

## **2.3. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE OCTIL METOXICINAMATO Y BENZOFENONA-3 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA UV DERIVADA**

### **2.3.1. Método propuesto. Parte experimental:**

#### **2.3.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un espectrofotómetro UV/VIS de fila de diodos marca Hewlett-Packard modelo Diode 8453, que permite realizar medidas en función del tiempo y obtener espectros derivados.

Para el montaje FIA se utilizó una bomba peristáltica marca Gilson® modelo Minipuls-3, una válvula de seis vías marca Rheodyne, una cubeta de flujo Hellma® modelo QS 1000 (18 µl de volumen interno) y tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno.

### **2.3.1.2. Reactivos y muestras:**

Octil metoxicinamato (OMC) 99.8 %, d=1.01 g/ml (Roig Farma S.A., Terrasa, Barcelona) y benzofenona-3 (BZ3) 98 % (Aldrich, Barcelona) se emplearon para preparar las disoluciones patrón. Los disolventes empleados fueron: hexano, tolueno, diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, metil isobutilcetona, acetato de etilo, isopropanol, etanol (EtOH) de grado HPLC (Scharlab, Barcelona), ácido acético glacial (AcOH) para análisis (Panreac, Barcelona) y agua desionizada.

Las muestras de productos cosméticos analizadas, fueron las descritas en el *apartado 2.2.1.2.*

### **2.3.1.3. Metodología de trabajo:**

La metodología seguida en la realización del presente capítulo ha sido la siguiente:

En primer lugar se realizaron estudios previos para la elección del disolvente a utilizar, y posteriormente se estudió la estabilidad de las disoluciones a utilizar en las condiciones de trabajo.

A continuación se registraron los espectros UV entre 200-400 nm de disoluciones patrón de los analitos, disoluciones multicomponente de ambos analitos y muestras en el disolvente elegido, y se obtuvieron los espectros derivados de 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> orden. A partir de las disoluciones patrón de BZ3 se hallaron sus puntos isodiferenciales, obteniéndose las rectas de calibrado para OMC a esas longitudes de onda, y viceversa.

Finalmente se interpolaron las señales de las disoluciones multicomponente y las de las muestras en las rectas de calibrado obtenidas para cada analito.

El procedimiento se automatizó mediante un sistema de inyección en flujo continuo, seleccionando previamente los valores de las variables instrumentales implicadas.

Para verificar la exactitud del procedimiento propuesto se contrastaron los resultados con los obtenidos mediante el método de

referencia descrito con anterioridad (*apartado 2.2*). Asimismo, se estudiaron otros parámetros analíticos para evaluar la calidad del método.

En el *apartado 2.3.2* se detallan los estudios realizados y los resultados obtenidos en cada uno de ellos, así como los procedimientos propuestos y sus parámetros analíticos.

### **2.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:**

#### **2.3.2.1. Elección del disolvente:**

Se escogieron diez disolventes de diferente polaridad procurando abarcar un amplio intervalo, y se realizaron ensayos de solubilidad de los analitos en cada uno de estos disolventes. Los diez disolventes elegidos, ordenados en orden creciente de polaridad, fueron: hexano, tolueno, diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, metil isobutilcetona, acetato de etilo, isopropanol, etanol y agua. Se pesaron 0.025 g de cada uno de los analitos, y por separado se intentaron disolver en 25 ml de cada uno de los disolventes. Se disolvieron en todos ellos excepto en el agua, por lo que se descartó el agua en este primer ensayo.

Por otra parte se pesó 0.01 g de cada una de las muestras y se intentó disolver en los disolventes restantes, y en todos ellos se disolvieron completamente.

Por tanto, en principio, cualquiera de los disolventes ensayados, excepto el agua, podría ser empleado en el desarrollo del método. Debido a su menor toxicidad se eligió el etanol.

#### **2.3.2.2. Estudio de la estabilidad de las disoluciones de los analitos con el tiempo y con la irradiación con luz UV:**

Con este estudio se pretendía comprobar si las disoluciones patrón de los analitos son estables varios días, con el fin de poderlas utilizar durante varias jornadas de trabajo. Para ello se preparó diariamente una disolución de 0.3 mg/ml en EtOH de cada uno de los analitos durante cuatro días y se guardó resguardada de la luz, y al cuarto día se diluyeron con EtOH y se registró el espectro de estas disoluciones. En la figura 2.4. se muestran las lecturas de absorbancia de una disolución de 5 µg/ml de cada uno de los analitos (a su longitud de onda de máxima absorbancia) frente al tiempo transcurrido desde su preparación.

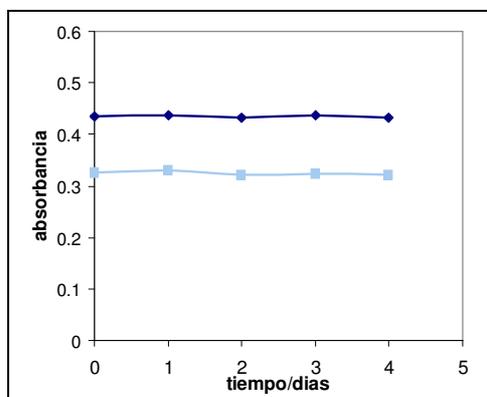


Fig. 2.4. Estabilidad de las disoluciones de OMC (◆) y BZ3 (■) con el tiempo.

Se aplicó el contraste de Grubbs (ver *Apéndice II*) para comprobar la existencia de valores anómalos y así verificar si había o no variación en las medidas de las disoluciones preparadas en diferentes días, mostrándose en todos los casos que no existían diferencias entre los diferentes valores de absorbancia a un nivel de significación del 5 %, lo que indica que se mantienen estables con el tiempo.

Por otra parte se estudió la influencia de la irradiación de los analitos con luz UV sobre su estabilidad, ya que la luz UV es de suficiente energía como para escindir dobles enlaces, y al realizar la determinación podría producir cambios en la naturaleza de los analitos. Según *Broadbent et al. (1996)* la irradiación de OMC con luz UV provoca la isomerización del isómero trans (que es el comercial) en el cis, y además provoca la formación de dímeros. Para ver la influencia de la irradiación UV en las condiciones de trabajo, se prepararon disoluciones de 5  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los analitos por separado en etanol, y se registraron varios espectros de cada una de ellas. En la figura 2.5 se observa la variación de la señal de absorbancia al irradiar varias veces la disolución de cada uno de los analitos.

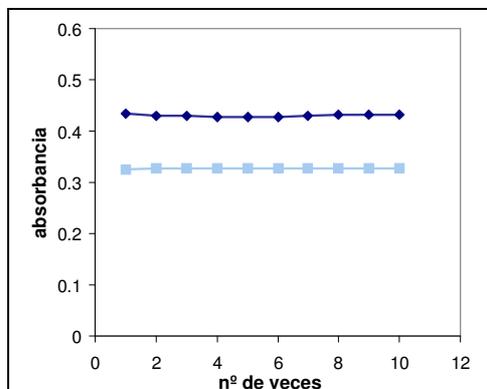


Fig. 2.5. Estabilidad de las disoluciones de OMC (◆) y BZ3 (■) con la radiación UV.

Como se observa, el hecho de medir la misma disolución varias veces (y por tanto irradiar con luz UV), no parece inducir cambios en los valores de absorbancia para ambos analitos. Al aplicar el contraste de Grubbs (*Apéndice I*) para confirmar la presencia de datos discrepantes, se observó que ninguno de ellos se podía desprejar para un nivel de significación del 5 %. Por tanto, se puede concluir que el irradiar una misma disolución de muestra con la lámpara del espectrofotómetro en las condiciones de trabajo no provoca cambios significativos en la señal de absorbancia de los analitos.

### 2.3.2.3. Determinación manual:

#### Estudio de los espectros derivados de primer orden:

Se observó un comportamiento lineal de la ley de Beer para OMC en etanol entre 0 y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Igualmente, se observó un comportamiento lineal para BZ3 entre 0 y 20  $\mu\text{g/ml}$ . Con el fin de que la medida de ambos analitos pudiera realizarse de manera simultánea en una misma disolución de muestra, se optó por acortar el intervalo de trabajo para BZ3 entre 0 y 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Se registró el espectro UV entre 200-400 nm de las disoluciones patrón de ambos analitos. A continuación se obtuvieron los espectros derivados de primer orden de las disoluciones de OMC y se hallaron los puntos isodiferenciales ( $\lambda$ ) como media de los obtenidos para las seis disoluciones patrón. De igual forma se operó con BZ3.

En las figuras 2.6 y 2.7 se muestran los espectros derivados de primer orden de las disoluciones patrón de OMC y BZ3 respectivamente.

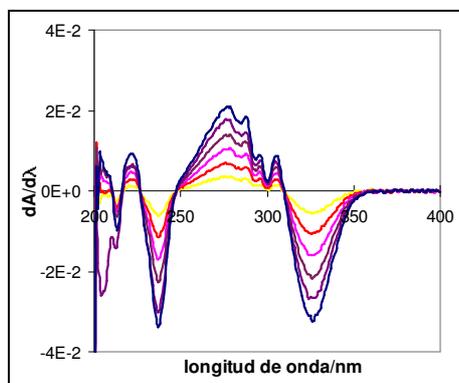


Fig. 2.6. Espectros derivados de primer orden de OMC.

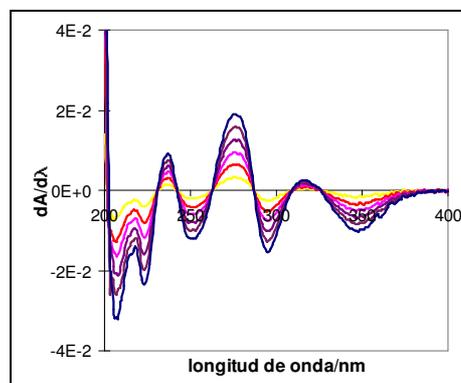


Fig. 2.7. Espectros derivados de primer orden de BZ3.

Los puntos isodiferenciales de los espectros de primer orden se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Puntos isodiferenciales de los espectros de primer orden de los analitos.

$\lambda/\text{nm}$	
OMC	BZ3
216.4± 0.3	230.9± 0.1
226.5± 0.2	242.2± 0.1
247.5± 0.2	262.7± 0.1
309.7± 0.2*	287.1± 0.1
	309.3± 0.4*
	325.9± 0.3

Se midió la señal de la primera derivada de las disoluciones patrón de cada uno de los analitos en los puntos isodiferenciales del otro, obteniendo las rectas de calibrado correspondientes. Nótese que los puntos isodiferenciales marcados con \* están excesivamente próximos, lo que ocasiona que la señal de la primera derivada de OMC a 309.3 nm y la de BZ3 a 309.7 nm sea muy pequeña y presenten una baja sensibilidad, por lo que estos puntos isodiferenciales no se tuvieron en cuenta en posteriores estudios.

En las figuras 2.8 y 2.9 se representan las rectas de calibrado para OMC y BZ3 respectivamente.

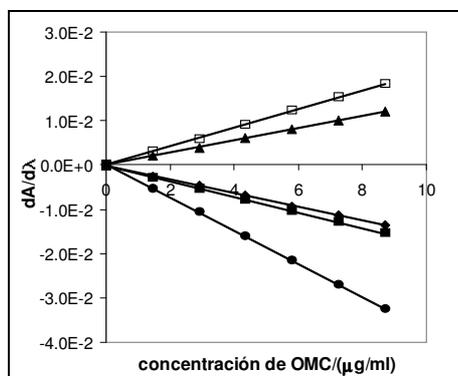


Fig. 2.8. Rectas de calibrado de OMC obtenidas con los espectros derivados de primer orden ((◆) 230.9, (■) 242.2, (▲) 262.7, (□) 287.1 y (●) 325.9 nm).

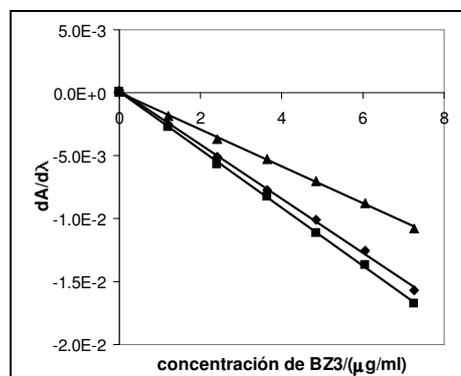


Fig. 2.9. Rectas de calibrado de BZ3 obtenidas con los espectros derivados de primer orden ((◆) 216.4, (■) 226.5 y (▲) 247.5 nm).

Por otra parte, se prepararon por triplicado disoluciones patrón multicomponente (PM) de ambos analitos de diferente concentración. La composición de estas disoluciones se detalla en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Composición de las disoluciones patrón preparados.

Disolución	concentración/(μg/ml)	
	OMC	BZ3
PM1	2.904	1.212
PM2	5.808	2.424
PM3	8.712	3.636

Se registró el espectro de cada una de estas disoluciones y se obtuvieron los espectros derivados de primer orden. Se midió la señal en los diferentes puntos isodiferenciales para determinar el contenido de ambos analitos, con el fin de estudiar en qué puntos se resuelve la mezcla. Una vez obtenida la concentración de los analitos para cada disolución y para cada longitud de onda como media de tres réplicas, se comparó con la concentración real mediante el contraste de *t de Student* (ver *Apéndice II*) para evaluar la exactitud en función de la longitud de onda empleada. Los resultados se muestran en las tablas 4.5 y 4.6, donde  $\bar{C}$  es la concentración media hallada del analito,  $\mu$  el valor real y  $t_{cal}$  es el valor calculado del parámetro de *t de Student*.

El valor crítico del parámetro de *t de Student* para un nivel de significación de 5 % y  $N-1=2$  grados de libertad es 4.30.

Tabla 2.5. Determinación de OMC en disoluciones patrón multicomponente empleando los espectros derivados de primer orden.

$\lambda$ /nm	dción.	C $\pm$ s / ( $\mu$ g/ml)	t <sub>cal</sub>
230.9	PM1	3.3 $\pm$ 0.1	5.68*
	PM2	6.17 $\pm$ 0.08	8.38*
	PM3	9.0 $\pm$ 0.1	4.56*
242.2	PM1	2.95 $\pm$ 0.02	3.98
	PM2	5.80 $\pm$ 0.05	0.16
	PM3	8.71 $\pm$ 0.02	0.28
262.7	PM1	2.85 $\pm$ 0.06	1.38
	PM2	5.8 $\pm$ 0.1	0.42
	PM3	8.7 $\pm$ 0.1	0.40
287.1	PM1	2.78 $\pm$ 0.05	4.29
	PM2	5.6 $\pm$ 0.1	2.79
	PM3	8.3 $\pm$ 0.2	3.87
325.9	PM1	2.8 $\pm$ 0.1	2.34
	PM2	5.57 $\pm$ 0.03	12.99*
	PM3	8.4 $\pm$ 0.1	4.33*

\*Valores que exceden al valor tabulado

Tabla 2.6. Determinación de BZ3 en disoluciones patrón multicomponente empleando los espectros derivados de primer orden.

$\lambda$ /nm	dción.	C $\pm$ s / ( $\mu$ g/ml)	t <sub>cal</sub>
216.4	PM1	1.83 $\pm$ 0.05	23.12*
	PM2	2.72 $\pm$ 0.04	12.06*
	PM3	3.42 $\pm$ 0.03	12.37*
226.5	PM1	1.57 $\pm$ 0.06	10.16*
	PM2	2.67 $\pm$ 0.05	9.35*
	PM3	3.74 $\pm$ 0.04	5.10*
247.5	PM1	1.26 $\pm$ 0.02	3.53
	PM2	2.41 $\pm$ 0.09	0.23
	PM3	3.67 $\pm$ 0.08	0.87

\*Valores que exceden al valor tabulado

Como se observa, existen varios puntos isodiferenciales en los que la resolución de la mezcla no es completa, proporcionando resultados inexactos en la determinación de los analitos a un nivel de significación de 5 %, manifestándose en un valor de t<sub>cal</sub> que excede al tabulado, tanto en la determinación de OMC como en la determinación de BZ3. Por tanto, estos puntos isodiferenciales no se tuvieron en cuenta para la determinación de los analitos en muestras reales.

Para determinar la aplicabilidad analítica de cada uno de los puntos isodiferenciales restantes en la determinación de los analitos en muestras reales, se realizó un estudio para comprobar la exactitud.

En primer lugar se preparó un calibrado de adición estándar de OMC y BZ3 para cada muestra en EtOH.

Se registraron los espectros de estas disoluciones y a partir de ellos se obtuvieron los espectros derivados de primer orden. Se obtuvieron las rectas de calibrado de adición estándar para cada muestra y para cada punto isodiferencial midiéndose la señal en cada uno de los puntos isodiferenciales seleccionados, obteniéndose los coeficientes de recuperación (**R**) como cociente entre las pendientes, esto es:

$$R (\%) = (b_{a.e.}/b) \cdot 100$$

siendo  $b_{a.e.}$  la pendiente obtenida en el calibrado de adición estándar y  $b$  la pendiente del calibrado normal.

En la tabla 2.7 se muestran los coeficientes de recuperación obtenidos para ambos analitos en cada una de las muestras en función de la longitud de onda empleada.

Tabla 2.7. Coeficientes de recuperación obtenidos en las muestras comerciales.

Muestra	$\lambda/nm$	R/%	
		OMC	BZ3
A	242.2	98±2	-
	247.5	-	99±2
	262.7	100±2	-
	287.1	98±1	-
B	242.2	97±2	-
	247.5	-	100±2
	262.7	98±3	-
	287.1	99±2	-
C	242.2	99±1	-
	247.5	-	102±2
	262.7	97±2	-
	287.1	96±1	-

Los valores del coeficiente de recuperación próximos al 100 % demuestran que el tipo de matriz presente en las cremas solares no provoca errores proporcionales en la determinación de ambos analitos en este tipo de muestras.

A continuación se realizó un estudio para comprobar la inexistencia de errores constantes. Se pesó por triplicado entre 0.06-0.18 g de muestra, disolviéndose en 50 ml de EtOH, y esta disolución se diluyó 2:25 con EtOH para proceder a la determinación de ambos analitos.

En las tablas 2.8 y 2.9 se muestran las concentraciones de los analitos obtenidas por el método en estudio (**C**) para cada uno de los puntos isodiferenciales, como media de tres réplicas, y los obtenidos por el método de referencia (**C<sub>ref</sub>**) descrito en *el apartado 2.2.*, así como sus desviaciones estándar (**s** y **s<sub>ref</sub>**). Los resultados obtenidos por ambos métodos se comparan mediante la aplicación del contraste de *t de Student* de comparación de las medias de dos series de resultados (*Apéndice II*).

El valor crítico del parámetro *t de Student* para un nivel de significación de 5 % y  $N_1+N_2-2=4$  grados de libertad es de 2.78

Tabla 2.8. Determinación de OMC en muestras reales empleando los espectros derivados de primer orden.

$\lambda/\text{nm}$	Muestra	$C \pm s$ % (m/m)	$C_{\text{ref}} \pm S_{\text{ref}}$ % (m/m)	$t_{\text{cal}}$
242.2	A	0.88 $\pm$ 0.01	1.91 $\pm$ 0.02	88.2*
	B	4.30 $\pm$ 0.08	4.91 $\pm$ 0.02	12.4*
	C	8.4 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.1	4.80*
262.7	A	0.96 $\pm$ 0.02	1.91 $\pm$ 0.02	62.2*
	B	5.00 $\pm$ 0.06	4.91 $\pm$ 0.02	2.52
	C	9.0 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.1	1.20
287.1	A	1.48 $\pm$ 0.03	1.91 $\pm$ 0.02	20.65*
	B	4.72 $\pm$ 0.08	4.91 $\pm$ 0.02	4.01*
	C	8.9 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.1	2.52

\* Valores que exceden al valor tabulado

Tabla 2.9. Determinación de BZ3 en muestras reales empleando los espectros derivados de primer orden.

$\lambda/\text{nm}$	Muestra	$C \pm s$ % (m/m)	$C_{\text{ref}} \pm S_{\text{ref}}$ % (m/m)	$t_{\text{cal}}$
247.5	A	-1.16 $\pm$ 0.01	N.D. *	-
	B	0.44 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.02	17.4**
	C	2.5 $\pm$ 0.2	3.16 $\pm$ 0.07	4.76**

\* No detectable

\*\* Valores que exceden al valor tabulado

Por tanto, se observa que la determinación de OMC a 242.2 nm en cualquiera de las muestras presenta diferencias significativas respecto al valor de referencia para un nivel de significación de 5 %, lo que indica la existencia de errores constantes, ya que previamente se demostró la inexistencia de errores proporcionales. En cambio, la comparabilidad de los resultados con los valores de referencia en los otros dos puntos isodiferenciales depende de las muestras, lo cual puede deberse a que tienen diferentes componentes en la matriz y alguno de ellos interfiere.

En el caso de la determinación de BZ3 a 247.5 nm existen errores constantes para cualquier tipo de muestra.

Por tanto aceptando la hipótesis de que las muestras presentan errores constantes en la primera derivada, se pasó a estudiar los espectros derivados de segundo orden con el fin de eliminar estas interferencias constantes, y hallar así longitudes de onda adecuadas para determinar simultáneamente ambos analitos en todas las muestras estudiadas.

### Estudio de los espectros derivados de segundo orden:

Al igual que en el estudio de la primera derivada, se obtuvieron los espectros derivados de segundo orden de las disoluciones patrón de ambos analitos, así como los puntos isodiferenciales de cada uno de ellos.

En las figuras 2.10 y 2.11 se muestran los espectros derivados de segundo orden correspondientes a las disoluciones patrón de OMC y de BZ3 respectivamente.

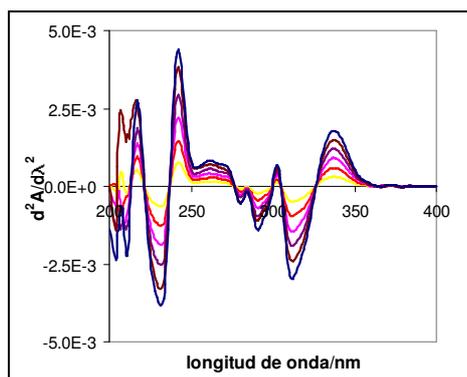


Fig. 2.10. Espectros derivados de segundo orden de OMC.

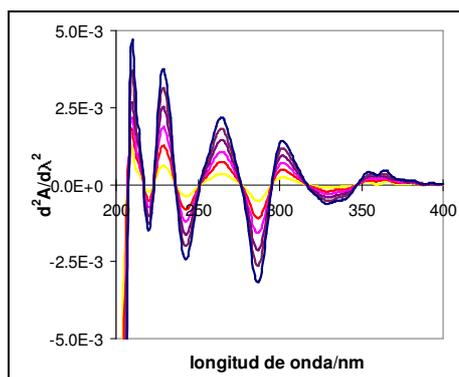


Fig. 2.11. Espectros derivados de segundo orden de BZ3.

Los puntos isodiferenciales de los espectros de segundo orden se muestran en la tabla 2.10.

Tabla 2.10. Puntos isodiferenciales de los espectros de segundo orden de los analitos.

$\lambda/\text{nm}$	
OMC	BZ3
221.5± 0.1	216.8± 0.1
299.7± 0.1	223.2± 0.1
305.0± 0.1	251.3± 0.1
326.2± 0.1	316.5± 0.1
	347.5± 0.1

A continuación se obtuvieron las señales derivadas de segundo orden de los patrones de cada analito en los puntos isodiferenciales del otro, y a partir de ellas las rectas de calibrado correspondientes. En las figuras 2.12 y 2.13 se representan las rectas de calibrado para OMC y BZ3 respectivamente.

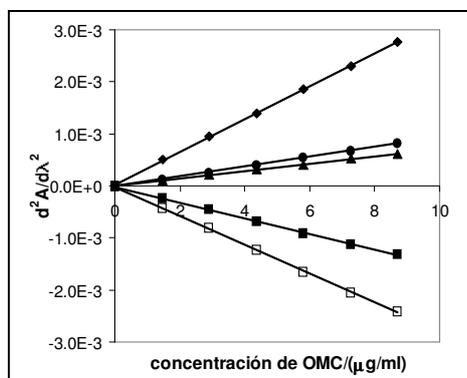


Fig. 2.12. Rectas de calibrado de OMC obtenidas con los espectros derivados de segundo orden ((◆) 216.8, (■) 223.2, (▲) 251.3, (□) 316.5 y (●) 347.5 nm).

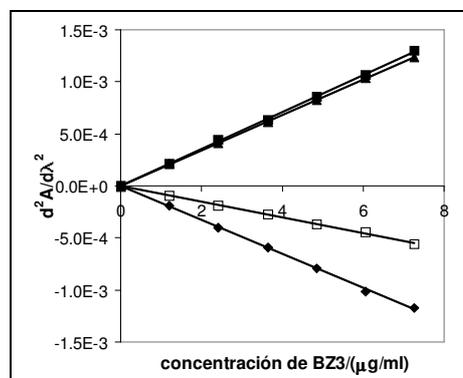


Fig. 2.13. Rectas de calibrado de BZ3 obtenidas con los espectros derivados de segundo orden ((◆) 221.5, (■) 299.7, (▲) 305.0 y (□) 326.2 nm).

Se obtuvieron las señales de los espectros derivados de segundo orden para las disoluciones multicomponente descritas con anterioridad (tabla 2.4) en cada uno de los puntos isodiferenciales, y a partir de ellas la concentración de los analitos, aplicándose el contraste de *t de Student* (Apéndice I) para evaluar la exactitud. Los resultados se muestran en las tablas 2.11 y 2.12, donde **C** es la concentración media hallada del analito correspondiente, **μ** el valor real y **t<sub>cal</sub>** es el valor calculado del parámetro de *t de Student*.

El valor del parámetro de *t de Student* para un nivel de significación de 5 % y N-2 grados de libertad es 4.30.

Tabla 2.11. Determinación de OMC en disoluciones patrón multicomponente empleando los espectros derivados de segundo orden.

λ/nm	dción.	C±s / (μg/ml)	t <sub>cal</sub>
216.8	PM1	2.90± 0.07	0.10
	PM2	5.72± 0.06	2.75
	PM3	8.62± 0.05	3.18
223.2	PM1	2.53± 0.08	7.69*
	PM2	5.4± 0.1	4.60*
	PM3	8.4± 0.1	6.04*
251.3	PM1	3.00± 0.04	4.03
	PM2	5.89± 0.05	2.83
	PM3	8.7± 0.1	0.17
316.5	PM1	2.81± 0.04	3.97
	PM2	5.72± 0.06	2.70
	PM3	8.6± 0.1	1.96
347.5	PM1	2.92± 0.09	0.32
	PM2	5.82± 0.07	0.25
	PM3	8.7± 0.2	0.52

\*Valores que exceden al valor tabulado

Tabla 2.12. Determinación de BZ3 en disoluciones patrón multicomponente empleando los espectros derivados de segundo orden.

λ/nm	dción.	C±s / (μg/ml)	t <sub>cal</sub>
221.5	PM1	0.8± 0.1	5.21*
	PM2	1.9± 0.1	7.07*
	PM3	2.7± 0.1	12.7*
299.7	PM1	1.20± 0.05	0.23
	PM2	2.44± 0.06	0.35
	PM3	3.6± 0.2	0.67
305.0	PM1	1.2± 0.1	0.12
	PM2	2.4± 0.1	0.07
	PM3	3.8± 0.2	1.00
326.2	PM1	1.21± 0.06	0.03
	PM2	2.5± 0.4	0.44
	PM3	3.56± 0.06	2.07

\*Valores que exceden al valor tabulado

Los puntos isodiferenciales 223.2 nm en la determinación de OMC y 221.5 nm en la determinación de BZ3, presentan interferencia de uno sobre el otro a un nivel de significación de 5 %. Por ello, estos dos puntos isodiferenciales no se tuvieron en cuenta para el análisis de muestras.

De igual forma, se procedió a la determinación de los analitos en cada una de las muestras. En las tablas 2.13 y 2.14 se muestran los valores obtenidos por el método ensayado (**C**) como media de tres réplicas, y los obtenidos por el método de referencia (**C<sub>ref</sub>**) (descrito en el apartado 2.2.), así como las desviaciones estándar. Los resultados se compararon aplicando el contraste de *t de Student* (Apéndice II) para evaluar la exactitud.

El valor crítico de *t* para un nivel de significación de 5 % y  $N_1+N_2-2=4$  grados de libertad es 2.78.

Tabla 2.13. Determinación de OMC en muestras reales empleando los espectros derivados de segundo orden.

$\lambda/\text{nm}$	Muestra	$C \pm s$ % (m/m)	$C_{\text{ref}} \pm S_{\text{ref}}$ % (m/m)	$t_{\text{cal}}$
216.8	A	1.53± 0.04	1.91± 0.02	16.7*
	B	4.33± 0.01	4.91± 0.02	44.93*
	C	8.3± 0.1	9.2± 0.1	8.47*
251.3	A	-0.14± 0.02	1.91± 0.02	129*
	B	4.27± 0.08	4.91± 0.02	13.9*
	C	8.8± 0.3	9.2± 0.1	2.25
316.5	A	1.81± 0.01	1.91± 0.02	8.10*
	B	4.73± 0.04	4.91± 0.02	6.00*
	C	8.80± 0.07	9.2± 0.1	5.10*
347.5	A	1.95± 0.03	1.91± 0.02	2.24
	B	4.87± 0.05	4.91± 0.02	0.96
	C	9.05± 0.05	9.2± 0.1	2.34

\* Valores que exceden al valor tabulado

Tabla 2.14. Determinación de BZ3 en muestras reales empleando los espectros derivados de segundo orden.

$\lambda/\text{nm}$	Muestra	$C \pm s$ % (m/m)	$C_{\text{ref}} \pm S_{\text{ref}}$ % (m/m)	$t_{\text{cal}}$
299.7	A	N.D.*	N.D.	-
	B	0.9± 0.1	0.94± 0.02	1.50
	C	3.0± 0.1	3.16± 0.07	2.06
305.0	A	N.D.	N.D.	-
	B	0.86± 0.08	0.94± 0.02	1.80
	C	3.1± 0.2	3.16± 0.07	0.61
326.2	A	N.D.	N.D.	-
	B	1.03± 0.08	0.94± 0.02	1.91
	C	3.2± 0.2	3.16± 0.07	0.17

\* No detectable

De los resultados obtenidos se concluye que la determinación de OMC en cualquiera de las muestras a 216.8, 251.3 y 316.5 nm presenta diferencias significativas respecto al valor de referencia para un nivel de significación de 5 %, lo que indica la existencia de errores constantes, ya que anteriormente se demostró que la matriz de este tipo de muestras no provoca errores proporcionales. Por ello, se seleccionó la longitud de onda de 347.5 nm para la determinación de OMC, en la que se obtienen valores comparables independientemente del tipo de muestra analizada.

Por otra parte, la determinación de BZ3 en cualquiera de los puntos isodiferenciales considerados conduce a la obtención de resultados comparables a un nivel de significación de 5 %. En los posteriores ensayos se tomaron los valores en el punto isodiferencial 299.7 nm por presentar una mayor sensibilidad.

***Procedimiento propuesto para la determinación simultánea de octil metoxicinamato y benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría UV derivada (modo manual):***

Se pesa, por triplicado, entre 0.06-0.18 g de muestra comercial, y se disuelve en 50 ml de etanol. A continuación se toma una alícuota de 2 ml (previamente filtrada si la muestra contiene  $\text{TiO}_2$ ) y se diluye a 25 ml con etanol.

Para la construcción de la recta de calibrado se emplean disoluciones de BZ3 (0-10  $\mu\text{g/ml}$ ) y OMC (0-10  $\mu\text{g/ml}$ ) en etanol.

Se registran los espectros UV de las disoluciones patrón y muestras, y a partir de ellos se obtienen los espectros derivados de segundo orden, midiéndose la señal de OMC a 347.5 nm y la de BZ3 a 299.7nm.

***Parámetros analíticos del método manual propuesto:***

*i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 2.15, siendo **a** la ordenada en el origen (y **s<sub>a</sub>** su desviación estándar), **b** la pendiente (y **s<sub>b</sub>** su desviación estándar), **r<sup>2</sup>** el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado.

Tabla 2.15. Parámetros de las rectas de calibrado obtenidas para la determinación de OMC y BZ3.

analito	$\lambda/\text{nm}$	Intervalo de trabajo	$a \pm s_a$	$b \pm s_b / (\text{ml}/\mu\text{g})$	$r^2$	N
OMC	347.5	0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	$(-8 \pm 2) \cdot 10^{-6}$	$(9.49 \pm 0.05) \cdot 10^{-5}$	0.99990	7
BZ3	299.7	0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *	$(-2 \pm 6) \cdot 10^{-6}$	$(1.78 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	0.9996	7

\* Lineal hasta 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$

*ii) Sensibilidad:*

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de las rectas de calibrado es del orden de  $10^{-4}$  ml/ $\mu\text{g}$  para la determinación de ambos analitos.

*iii) Límite de detección:*

El límite de detección instrumental para OMC, estimado como  $3 \cdot s_{y/x}/b$  donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y  $b$  la pendiente, fue de 0.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Para BZ3 fue de 0.16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

*iv) Exactitud:*

Tal y como se demuestra de los resultados del contraste de *t de Student*, tabla 2.13 y 2.14, el método propuesto proporciona resultados exactos, puesto que no existe diferencia a un nivel de significación de 5 % entre las concentraciones halladas por el método de referencia y el método propuesto.

*v) Precisión:*

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto son del orden del 1 % para la determinación de OMC, y entre 3-11 % para la determinación de BZ3.

#### 2.3.2.4. Automatización del método. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo continuo:

Se pretendía automatizar la determinación simultánea de OMC y BZ3 descrita en el apartado anterior. Para ello se empleó un sistema de inyección en flujo continuo (FIA) monocanal utilizando EtOH como portador. Las disoluciones patrón y muestras se inyectaron empleando una válvula de inyección de seis vías. En la figura 2.14 se muestra un esquema del montaje utilizado.

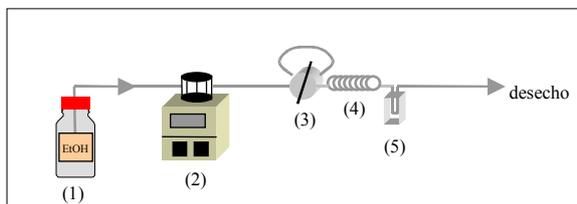


Fig. 2.14. Montaje FIA. (1) Portador: EtOH, (2) bomba peristáltica, (3) tubo de mezclado (50 cm), (4) válvula de inyección de seis vías con bucle de inyección de 200  $\mu$ l, (5) celda de flujo.

### Estudio de las variables instrumentales:

Utilizando un bucle de inyección de 200  $\mu$ l (menor volumen posible por razones técnicas) y un tubo de mezclado de 50 cm de longitud, se consiguió la dilución adecuada, sin excesivo ensanchamiento de pico y con tiempos de análisis cortos.

En una experiencia inicial se procedió a la selección del caudal a utilizar (figuras 2.15 y 2.16). Para ello se inyectó una disolución de 10  $\mu$ g/ml de OMC y una de 20  $\mu$ g/ml de BZ3 y se registró la señal de absorbancia a diferentes caudales, monitorizando la señal a 309 nm.

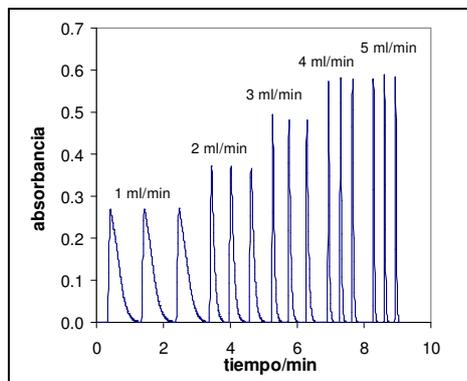


Fig. 2.15. Selección del caudal para la determinación de OMC.

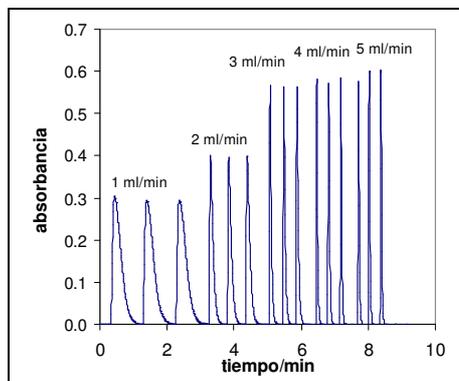


Fig. 2.16. Selección del caudal para la determinación de BZ3.

Como se aprecia en las figuras, la precisión obtenida en la señal de absorbancia a los diferentes caudales es similar. No obstante, entre 3-5 ml/min se observa una considerable reducción del tiempo de análisis, obteniéndose una buena sensibilidad para cualquiera de ellos, resultando adecuados para el análisis de las muestras.

El programa del equipo utilizado permite, una vez localizados los tiempos a los que se produce el máximo correspondiente a cada inyección, obtener el espectro completo a esos tiempos, con lo que se obtienen los espectros derivados de segundo orden a partir de ellos.

***Procedimiento propuesto para la determinación simultánea de octil metoxicinamato y benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría UV derivada empleando un sistema de inyección en flujo continuo:***

Cada una de las muestras se pesa por triplicado (0.01-0.03 g), y se disuelve en 50 ml de EtOH.

Se preparan disoluciones patrón de OMC (3-30 µg/ml) y BZ3 (1-10 µg/ml) en EtOH.

Las disoluciones patrón y las de las muestras se inyectan por triplicado, a través de un filtro de membrana de 0.45 µm de diámetro de poro, en el sistema FIA mostrado en la figura 2.14 empleando un caudal de 3 ml/min y monitorizando la señal a 309 nm.

Se localizan los tiempos a los que la señal es máxima para cada inyección y se obtienen los espectros UV entre 200-400 nm, y a partir de ellos los espectros derivados de segundo orden, midiéndose la señal de OMC a 347.5 nm y la de BZ3 a 299.7nm.

***Parámetros analíticos del método FIA propuesto:***

*i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 2.16, siendo **a** la ordenada en el origen y **b** la pendiente de las rectas de calibrado y **s<sub>a</sub>** y **s<sub>b</sub>** sus respectivas desviaciones estándar, **r<sup>2</sup>** el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado obtenidas.

Tabla 2.16. Parámetros de las rectas de calibrado obtenidas para la determinación automatizada de OMC y BZ3.

analito	λ/nm	Intervalo de trabajo	a ± s <sub>a</sub>	b ± s <sub>b</sub> / (ml/µg)	r <sup>2</sup>	N
OMC	347.5	3-30 µg/ml	(49±2).10 <sup>-6</sup>	(4.6±0.1).10 <sup>-5</sup>	0.998	7
BZ3	299.7	1-10 µg/ml *	(34±5). 10 <sup>-6</sup>	(9.2±0.1).10 <sup>-5</sup>	0.9995	7

\* Lineal hasta 40 µg/ml

ii) *Sensibilidad:*

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de las rectas de calibrado (tabla 2.16) es del orden de  $10^{-5}$  ml/ $\mu$ g para la determinación de BZ3, siendo la mitad para OMC.

iii) *Límite de detección:*

El límite de detección instrumental para OMC, estimado como  $3 \cdot s_{y/x}/b$  donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y  $b$  la pendiente, fue de 2.1  $\mu$ g/ml, y para BZ3 fue de 0.5  $\mu$ g/ml.

iv) *Exactitud:*

Para evaluar la exactitud, se determinó el contenido de OMC y BZ3 en las tres muestras de protectores solares estudiadas, y los resultados se compararon con los obtenidos por el método de referencia (descrito en el apartado 2.2.).

En la tabla 2.17 se muestran las concentraciones obtenidas por el método FIA ensayado, como media de tres réplicas, así como los obtenidos por el método de referencia, siendo  $C$  la concentración media hallada,  $s$  la desviación estándar de estos resultados, y  $C_{ref}$  la concentración media del analito hallada con el método de referencia y  $s_{ref}$  la desviación estándar de estos resultados. Los resultados se comparan aplicando el contraste de *t de Student* (Apéndice II).

El valor crítico de  $t$  para un nivel de significación de 5 % y  $N_1+N_2-2=4$  grados de libertad es 2.78.

Tabla 17. Determinación de los analitos en muestras reales mediante el sistema FIA empleando los espectros derivados de segundo orden.

$\lambda$ /nm	Muestra	$C \pm s$ % (m/m)	$C_{ref} \pm s_{ref}$ % (m/m)	$t_{cal}$
<i>Determinación de OMC</i>				
347.5	A	1.88 $\pm$ 0.03	1.91 $\pm$ 0.02	1.35
	B	4.99 $\pm$ 0.06	4.91 $\pm$ 0.02	2.10
	C	9.1 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 0.1	1.22
<i>Determinación de BZ3</i>				
299.7	A	N.D. *	N.D.	-
	B	1.0 $\pm$ 0.1	0.94 $\pm$ 0.02	1.02
	C	3.3 $\pm$ 0.2	3.16 $\pm$ 0.07	1.16

\* No detectable

A la vista de los resultados obtenidos se concluye que el método propuesto proporciona resultados estadísticamente comparables (nivel de significación de 5 %) a los obtenidos por el método HPLC empleado como referencia.

*v) Precisión:*

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto son del orden del 1 % para la determinación de OMC, y entre 6-10 % para la determinación de BZ3.

*v) Velocidad de muestreo:*

El tiempo consumido entre lecturas de una misma disolución es de 10 s, mientras que el tiempo necesario para realizar un ciclo completo en el que cada disolución se mide por triplicado es de 35 s, por lo que la velocidad de muestreo es de 103 muestras/hora.

## **2.4. CONCLUSIONES**

Se ha puesto a punto un método analítico para la determinación simultánea y directa de octil metoxicinamato y benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar. El método consiste en la obtención y medida de los espectros UV derivados de segundo orden.

Se pueden realizar las determinaciones de manera manual o automatizada mediante inyección en flujo continuo.

Se ha demostrado que las disoluciones de los analitos son estables durante varios días, y no se ven afectadas por la irradiación que reciben al ser medidas.

Las rectas de calibrado utilizadas, tanto en el modo manual como en flujo continuo, presentan una buena linealidad y precisión. Los órdenes de sensibilidad en ambos casos son los que corresponden al empleo de espectros derivados de segundo orden, y adecuados para el análisis de muestras comerciales de productos cosméticos para la protección solar.

El límite de detección instrumental en el modo manual permite determinar niveles de concentración de 0.11 µg/ml de OMC; mientras que en flujo continuo se puede realizar con un límite de detección de 2.1 µg/ml. Por su parte, en la determinación de BZ3 con el método manual

se obtiene un límite de detección instrumental de 0.11 µg/ml, mientras que en flujo continuo es 0.5 µg/ml..

La exactitud del procedimiento propuesto, tanto trabajando en forma manual como mediante inyección en flujo continuo, se ha contrastado por comparación de los valores con los obtenidos mediante la determinación por cromatografía líquida, no habiendo diferencias a un nivel de significación de 5 %.

Los coeficientes de variación son mayores empleando el sistema de inyección en flujo continuo que en el modo convencional, aunque en todo caso adecuados para las medidas a realizar. Las diferencias son aceptables considerando la imprecisión que conllevan los métodos de inyección en flujo continuo.

En ambos casos, los procedimientos son rápidos, pero evidentemente trabajando con los sistemas de inyección en flujo continuo la manipulación en la introducción de las muestras es mucho menor y además se pueden realizar las diluciones que se desee en flujo continuo, y todo ello redundando en una disminución del tiempo de análisis. El tiempo transcurrido entre la medida de dos muestras es del orden de 1 minuto trabajando en modo manual, y queda reducido a 10 segundos entre la obtención de un pico y el siguiente trabajando empleando el sistema de inyección en flujo continuo.

El método propuesto permite la determinación de forma rápida, exacta y precisa por lo que es adecuado para el control analítico de los productos cosméticos para la protección solar.

El disolvente utilizado es etanol, por lo que se puede considerar que no existe toxicidad ambiental en el laboratorio durante el análisis, siendo un método de análisis limpio.



## CAPÍTULO 3

### **DETERMINACIÓN DE BENZOFENONA-3 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR (VIS) EMPLEANDO SISTEMAS AUTOMATIZADOS**

Parte del contenido de este Capítulo ha sido publicado en *Fresenius' J Anal Chem* (2001) 369:684-689, y presentado como cartel en *Euroanalysis XI*, Lisboa, 2000, en donde obtuvo el 2º Premio a la Innovación.



### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. Interés de la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar:

Tal y como se ha indicado en el *Capítulo 1* de esta memoria, existe una gran variedad de filtros UV de naturaleza orgánica (benzofenonas, derivados del ácido p-aminobenzoico, salicilatos, etc.). Sin embargo, el filtro UV más utilizado en los últimos años es sin duda alguna la benzofenona-3 (BZ3), también conocida como *oxibenzona*. Su elevada absorptividad molar (figura 3.1) tanto en la zona UVB (280-320 nm) como UVA (320-400 nm) ha contribuido a este hecho, lo que hace que en algunas formulaciones se utilice como único filtro, aunque también suele encontrarse combinada con otros filtros con el fin de obtener un mayor Factor de Protección solar (FPS) o potenciar la protección en la zona UV donde BZ3 presenta menor absorción.

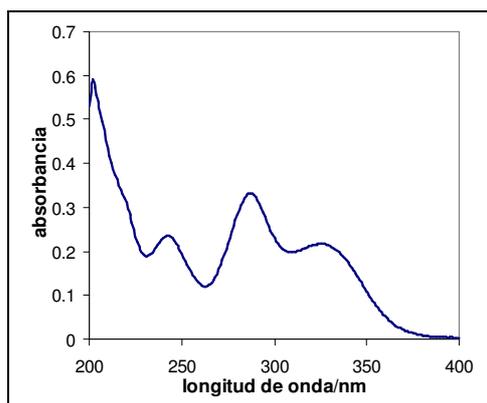


Fig. 3.1. Espectro UV de una disolución de 5 µg/ml de BZ3 en etanol.

La legislación europea permite un 10 % de BZ3 en los productos cosméticos para la protección solar (*tabla 1.2, Capítulo 1 de esta memoria*), mientras que la legislación estadounidense (FDA, 1999) autoriza sólo un 6 %. Sin embargo, se han descrito numerosas reacciones alérgicas y de sensibilización debidas al uso de BZ3 (*Schauder e Ippen, 1997; Berne y Ros, 1998; Schmidt et al., 1998; Cook y Freeman, 2002*), y de acuerdo con la legislación europea debe constar en la etiqueta del producto la leyenda "Contiene oxibenzona". Esto hace que el control analítico de la composición del producto acabado sea de gran importancia, con el fin de garantizar que los niveles de concentración no sobrepasen los permitidos por la legislación vigente

preservando así la inocuidad del producto, y además asegurar que el FPS es el que se espera de la formulación.

En el presente capítulo se pretende poner a punto un método analítico para la determinación de BZ3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría de absorción molecular en el visible.

### **3.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:**

Como ya se indicó en el *apartado 2.1.2. del Capítulo 2* de esta memoria, la mayoría de las técnicas para la determinación de BZ3 se basan en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). A los artículos allí citados que hacían referencia a la determinación de BZ3 y OMC, habría que añadir los publicados por *Tan et al. (1984)*, *Oshima y Saito (1987)*, *Wang (1999)* que también determinaron BZ3 mediante HPLC, *Ro et al. (1994)* mediante cromatografía de gases (GC), *Pietta et al. (1995)* mediante cromatografía micelar electrocinética (MEKC) y *Westgate y Sherma (2000)* mediante cromatografía en capa fina (TLC).

### **3.1.3. Justificación del objetivo del trabajo:**

La determinación directa de BZ3, así como la de otros filtros orgánicos, mediante espectrometría de absorción molecular en el UV presenta interferencias debidas al resto de componentes utilizados en la formulación cosmética. En el *Capítulo 2* se propuso el uso de espectros derivados para evitar estas interferencias. En el presente capítulo se pretende poner a punto una metodología analítica selectiva, exacta y rápida, para la determinación directa de BZ3 en productos cosméticos comerciales, que se pueda emplear fácilmente en los laboratorios de las empresas de fabricación de cosméticos, para controlar así la composición de estos productos.

La metodología que se propone se basa en la reacción colorimétrica de BZ3 con níquel en medio amoniacal, y el procedimiento se realiza tanto mediante un sistema de inyección de las muestras en flujo continuo (FIA) como secuencial (SIA), siendo la primera vez que se propone un método SIA para el análisis de productos cosméticos para la protección solar.

En las bases bibliográficas consultadas durante la realización de este trabajo, no se encontró ningún antecedente de la determinación espectrofotométrica de BZ3 ni de ningún otro filtro UV mediante espectrometría de absorción molecular en el visible.

### **3.2. MÉTODO DE REFERENCIA: DETERMINACIÓN DE BENZOFENONA-3 MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

Debido a que no existen métodos analíticos oficiales para el análisis de este tipo de productos, se determinó el contenido de BZ3 en cinco muestras de cremas y lociones solares mediante HPLC, basándose en el trabajo publicado por *DiNunzio y Gadde (1990)*.

#### **3.2.1. Método de referencia. Parte experimental:**

El procedimiento experimental utilizado es el descrito en el *apartado 2.2 del Capítulo 2* de esta memoria.

Las muestras comerciales analizadas fueron las siguientes: Leche Solar Nievina FPS 8 (*muestra A*) (Laboratorios Nievina, Valencia), Leche Solar Pryca FPS 8 (*muestra B*) y ), Leche Solar Pryca FPS 20 (*muestra C*) (Laboratorios Expanscience, Madrid), Aceite Solar Shiseido FPS 4 (*muestra D*) (Shiseido co., Tokio, Japón) y Loción Solar Clinique FPS 6 (*muestra E*) (Clinique Laboratoires, París, Francia).

#### **3.2.2. Método de referencia. Resultados:**

En las condiciones de trabajo empleadas, BZ3 presentaba un tiempo de retención de 5.19 minutos, y el patrón interno (PI) de 4.11 minutos.

Las muestras pueden, además, contener otros filtros solares como octil metoxicinamato (OMC) y octil dimetil PABA (ODP), utilizados junto con BZ3 en algunas formulaciones cosméticas y que presentan tiempos de retención mayores en las condiciones de trabajo empleadas. Por ello se debe esperar a que se eluyan del sistema cromatográfico, si se da el caso.

La recta de calibrado obtenida representando el cociente entre el área del pico de BZ3 y el área del pico del PI frente a la concentración del analito resultó ser:

$$A' = - (2 \pm 1) \cdot 10^{-2} + (2.48 \pm 0.04) \cdot 10^{-2} \cdot C_{BZ3} ; r^2 = 0.9992; N=5$$

siendo  $A'$  el cociente de áreas, y  $C_{BZ3}$  la concentración de BZ3 en  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados de la determinación, como media de tres réplicas, se muestran en la tabla 3.1, siendo  $C_{\text{ref}}$  la concentración promedio obtenida

por el método de referencia de cada una de las muestras analizadas y  $S_{ref}$  la desviación estándar de estos resultados.

Tabla 3.1. Concentración de BZ3 en las muestras comerciales analizadas por el método de referencia.

Muestra	$C_{ref} \pm S_{ref} / \% (m/m)$
A	1.57±0.02
B	0.95±0.03
C	2.97±0.04
D	0.50±0.02
E	2.54±0.02

Estos resultados se toman como referencia y se utilizarán posteriormente para compararlos con los obtenidos por el método propuesto, con el fin de evaluar su exactitud.

### **3.3. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE BENZOFENONA-3 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR (VIS) EMPLEANDO SISTEMAS AUTOMATIZADOS**

#### **3.3.1. Método propuesto. Parte experimental:**

##### **3.3.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un espectrofotómetro UV/VIS de fila de diodos marca Hewlett-Packard modelo Diode 8453, una cubeta de flujo Hellma® modelo QS 1000 (18 µl de volumen interno) y tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno.

Para el sistema FIA se utilizó una bomba peristáltica marca Gilson® modelo Minipuls-3 y una válvula de seis vías marca Rheodyne.

Para el sistema SIA se empleó una bureta automática Crison 2031 provista de una jeringa de 10 ml y una válvula automática de 8 vías marca Crison 2030 conectada a un ordenador mediante una interfase RS 232C y controlada mediante un programa informático no comercial diseñado para este sistema.

##### **3.3.1.2. Reactivos y muestras:**

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: benzofenona-3 (BZ3) 98 % (Aldrich, Barcelona), etanol (EtOH) 96 % grado cosmético (Guinama, Valencia) desgasificado en ultrasonidos, hidróxido amónico 25 % en  $NH_3$ ,  $d=0.910$  g/ml, nitrato de níquel hexahidrato para análisis (Probus S.A., Badalona) y agua desionizada.

Las muestras de productos cosméticos analizadas, fueron las citadas en el *apartado 3.2.1*.

### **3.3.1.3. Metodología de trabajo:**

La metodología seguida en la realización del presente capítulo ha sido la siguiente:

En primer lugar se realizaron estudios referentes a la reacción colorimétrica. Posteriormente se seleccionaron los parámetros de las variables propias de los sistemas automatizados y se determinó el contenido de BZ3 en cinco muestras comerciales, mediante el uso de sistemas de inyección en flujo continuo (FIA) y mediante un sistema de inyección secuencial (SIA). Finalmente se compararon los resultados con los obtenidos por el método de referencia descrito con anterioridad.

En el *apartado 3.3.2* se detallan todos los estudios realizados y los resultados obtenidos en cada uno de ellos, así como los procedimientos propuestos y sus parámetros analíticos.

### **3.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:**

#### **3.3.2.1. Estudio de la reacción colorimétrica:**

Según *Irima et al. (1997)* el ion  $Ni^{2+}$  es susceptible de extraerse de una disolución por complejación con ligandos bidentados tales como BZ3.

Debido a que los grupos hidroxilo fenólicos son relativamente fáciles de hidrolizar y máxime cuando en posición orto existe un grupo carbonilo capaz de deslocalizar la densidad de carga negativa generada, el poder complejante de BZ3 se potencia a pH elevado. Por el contrario el  $Ni^{2+}$  precipita en forma de hidróxido alrededor de pH 7 sin posibilidad de redisolución a pH superior, por lo que se trabajó en medio amoniacal, en el que el ion  $Ni^{2+}$  forma complejos amoniacales muy estables.

En el presente trabajo se ha demostrado que en medio amoniacal 0.5 M (pH $\approx$ 11.5) se produce una reacción instantánea entre BZ3 y el ion  $Ni^{2+}$ , haciendo que los estados electrónicos de BZ3 se vean afectados, con lo que se produce un desplazamiento batocrómico de la señal, apareciendo en una zona susceptible de medirse sin interferencias debidas a la matriz de las muestras.

En la figura 3.2 se muestra la influencia de los reactivos en el espectro de BZ3.

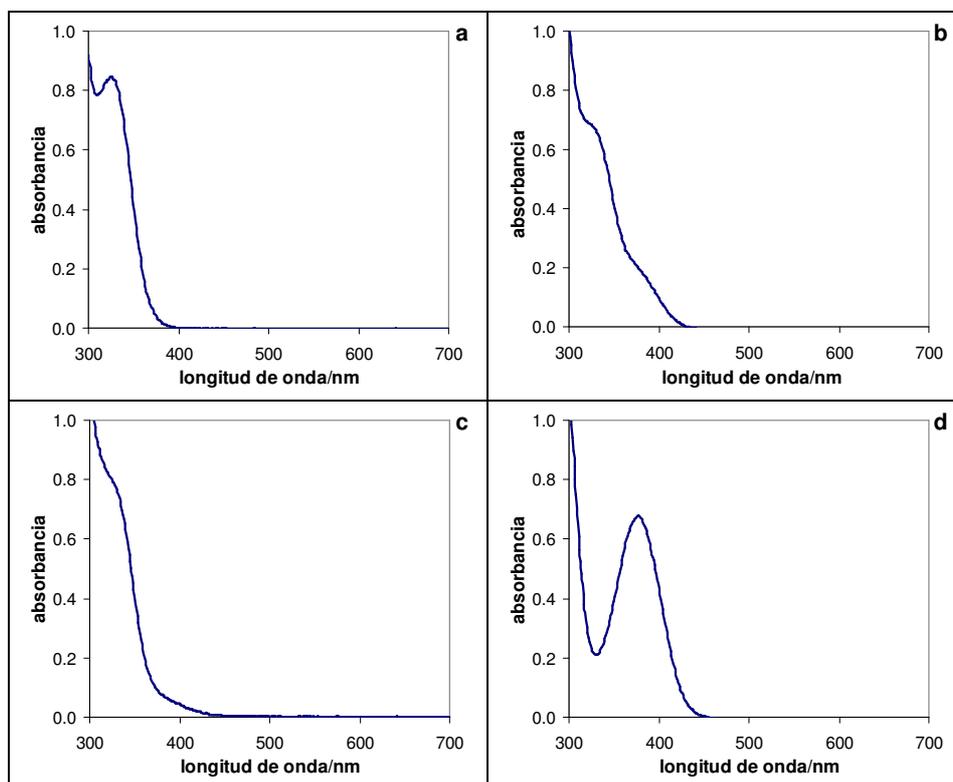


Fig. 3.2. Efecto de los reactivos sobre el espectro de una disolución de 20  $\mu\text{g/ml}$  de BZ3 en EtOH:agua 80:20 (v/v). a) BZ3, b) BZ3 en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  0.01 M, c) BZ3 en presencia de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M y d) BZ3 en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  0.01 M y  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M.

### Determinación de la estequiometría del complejo:

Existen diversos métodos en la bibliografía analítica para determinar la estequiometría de un complejo metal-ligando. En el presente trabajo se empleó el conocido “*método de Job o de las variaciones continuas*” (Job, 1928; MacCarthy 1975), ampliamente utilizado en química de coordinación. Para ello se prepararon disoluciones mezcla de ligando y metal, BZ3 y  $\text{Ni}^{2+}$  respectivamente, en EtOH:agua conteniendo amoníaco 0.5 M, y se midió la absorbancia a 376 nm, que corresponde al máximo del espectro de absorción del complejo formado.

En la tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos siendo  $X_L$  la fracción molar del ligando.

Tabla 3.2. Medida de las disoluciones empleadas para determinar la estequiometría del complejo  $\text{Ni}^{2+}-(\text{BZ3})_n$  mediante el método de Job.

disol.	$[\text{Ni}^{2+}]/\text{M}$	$[\text{BZ3}]/\text{M}$	$X_L$	$A_{376}^a$	$A_{\text{ML}}^b = A_{376}^c(1-X_L) \cdot A_M^c - X_L \cdot A_L^d$
1	$3.0 \cdot 10^{-4}$	0	0.0	0.0107	0
2	$2.4 \cdot 10^{-4}$	$0.6 \cdot 10^{-4}$	0.2	0.3808	0.3343
3	$2.1 \cdot 10^{-4}$	$0.9 \cdot 10^{-4}$	0.3	0.5272	0.4627
4	$1.8 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	0.4	0.6388	0.5564
5	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-4}$	0.5	0.7084	0.6081
6	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^{-4}$	0.6	0.7163	0.5980
7	$0.9 \cdot 10^{-4}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$	0.7	0.6276	0.4914
8	$0.6 \cdot 10^{-4}$	$2.4 \cdot 10^{-4}$	0.8	0.5048	0.3507
9	$0.3 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-4}$	0.9	0.3464	0.1743
10	0	$3.0 \cdot 10^{-4}$	1.0	0.1900	0

<sup>a</sup> señal medida experimentalmente a 376 nm

<sup>c</sup> señal debida al metal libre (disolución 1)

<sup>b</sup> señal debida a la interacción metal-ligando

<sup>d</sup> señal debida al ligando libre (disolución 10)

Tras representar  $A_{\text{ML}}$  frente a  $X_L$  se obtiene la estequiometría del complejo según la siguiente fórmula:

$$n = X_{\text{máx}} / (1 - X_{\text{máx}})$$

siendo  $n$  el número de ligandos unidos al ion metálico, y  $X_{\text{máx}}$  la fracción molar de ligando correspondiente al máximo de la curva de la representación tal y como se muestra en la figura 3.3.

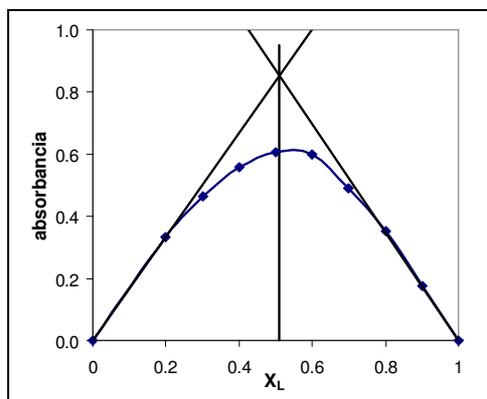


Fig. 3.3. Determinación de la estequiometría del complejo  $\text{Ni}^{2+}-(\text{BZ3})_n$ .

Experimentalmente  $X_{\text{máx}}$  resultó ser 0.51, lo que ocasiona que  $n$  sea igual a 1.04. Por tanto se puede deducir que la estequiometría del complejo  $\text{Ni}^{2+}-\text{BZ3}$  es 1:1. De este modo, las restantes posiciones de coordinación del ion están ocupadas por moléculas de amoníaco. En la figura 3.4 se muestra una posible estructura para el complejo de coordinación en estudio.

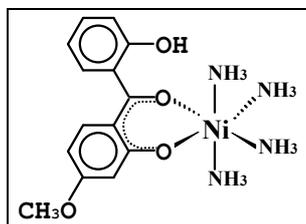


Fig. 3.4. Posible estructura del complejo  $\text{Ni}^{2+}$ -BZ3.

Teniendo en cuenta este resultado, en el procedimiento analítico propuesto se trabajará con una concentración de  $\text{Ni}^{2+}$  0.01 M, asegurando así tener un exceso cuantitativo de  $\text{Ni}^{2+}$  respecto a BZ3, evitando así una variación del blanco de medida. Además se trabajará con una concentración de amoníaco 0.5 M necesario para estabilizar al ion  $\text{Ni}^{2+}$  y mantener un pH elevado adecuado para que se produzca la reacción de una manera rápida y cuantitativa.

#### Selectividad de la reacción:

Aunque es fácil encontrar BZ3 sola como principio activo en los productos cosméticos para la protección solar, también es usual encontrarla combinada con otro filtro UV como es el octil metoxicinamato (OMC) y en menor medida con el octil dimetil PABA (ODP), que presentan gran poder de absorción en la zona UVB. No obstante estos componentes no presentan la reacción y por tanto no interfieren en su determinación.

Otro filtro UV denominado butil metoxidibenzoilmetano (BDM) tampoco presenta la reacción, pero presenta absorción en la misma zona del complejo  $\text{Ni}^{2+}$ -BZ3 con lo que lograría interferir, pero no es usual combinarlo con BZ3 debido a que solo presenta absorción en la zona UVA.

Otros filtros UV como la benzofenona-4 (BZ4), octil salicilato (OS) y homosalato (HS) sí que reaccionan con  $\text{Ni}^{2+}$  en medio amoniacal, pero no suelen combinarse con BZ3 porque el primero presenta las mismas propiedades espectrales que ésta, y los otros dos además de no presentar absorción en la zona del UVA presentan menor absorción en el UVB que la propia BZ3.

Por otra parte, otros componentes habitualmente utilizados en este tipo de formulaciones, tales como conservantes, emulgentes, aromas, hidratantes, etc. no presentan absorbancia en la zona de medida ni presentan la reacción.

### 3.3.2.2. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo continuo:

Se ensayaron dos estrategias: montaje monocanal y bicanal.

#### a) Montaje monocanal:

El montaje utilizado se esquematiza en la figura 3.5.

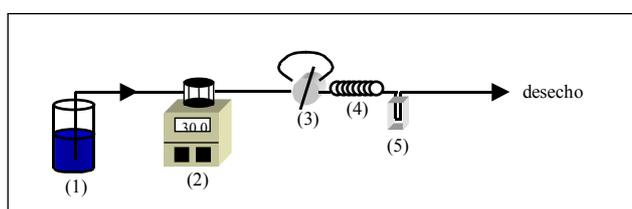


Fig. 3.5. Esquema del montaje FIA monocanal utilizado. (1) Portador: disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M y  $\text{Ni}^{+2}$  0.01 M en EtOH:agua 80:20 (v/v), (2) bomba peristáltica, (3) válvula de inyección de seis vías con bucle de inyección de 200  $\mu\text{l}$ , (4) tubo de reacción, (5) celda de flujo.

#### Estudio de las variables instrumentales:

Se estudiaron las variables instrumentales que afectaban a la señal analítica. Dado que el analito está en concentración relativamente alta en las muestras, la sensibilidad no plantea problemas, por lo que la selección de los valores de las variables instrumentales se realizó basándose en la repetibilidad de la señal analítica.

Las variables estudiadas fueron el caudal de portador y la longitud del tubo de reacción. Para ello se probaron tres longitudes de tubo de reacción con cinco caudales diferentes. Los resultados se muestran en las figuras 3.6 y 3.7 a modo de gráfico, resaltándose en la tabla 3.3 los coeficientes de variación (CV) obtenidos. El bucle de inyección empleado en todas las experiencias fue el menor posible, con una capacidad de 200  $\mu\text{l}$ , ya que en experiencias previas se observó que con volúmenes mayores se producía un ensanchamiento de los picos aumentando así el tiempo de análisis.

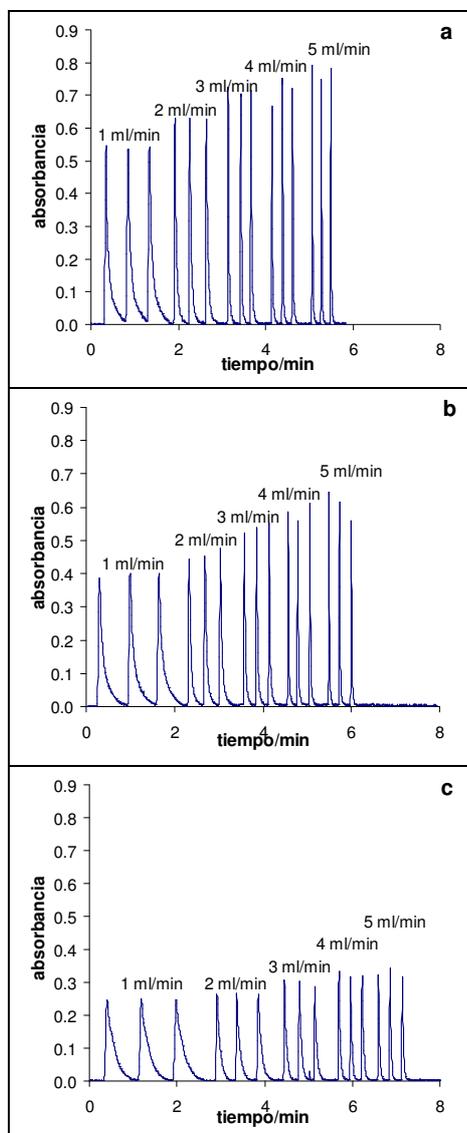


Fig. 3.6. Diagramas obtenidos a diferentes caudales empleando distintas longitudes de tubo de reacción: a) 10 cm, b) 25 cm, c) 50 cm.

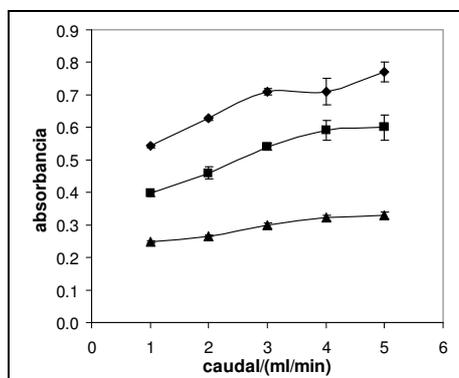


Fig. 3.7. Valores promedio de la señal de absorción y su desviación estándar para longitudes de tubo de reacción de 10 (◆) 25 (■) y 50 cm (▲) en función del caudal de portador.

Tabla 3.3. Efecto de la longitud del tubo de reacción (horizontal) y del caudal de portador (vertical).

	10*	25	50
1**	0.542±0.006 CV=1.1 %	0.396±0.008 CV=2.1 %	0.248±0.003 CV=1.0 %
2	0.628±0.005 CV=0.8 %	0.46±0.02 CV=3.5 %	0.266±0.002 CV=0.8 %
3	0.71±0.01 CV=1.5 %	0.54±0.01 CV=2.7 %	0.298±0.009 CV=3.1 %
4	0.71±0.04 CV=5.0 %	0.59±0.03 CV=4.6 %	0.322±0.009 CV=2.8 %
5	0.77±0.03 CV=3.9 %	0.60±0.04 CV=7.2 %	0.33±0.01 CV=3.3 %

\* en cm

\*\* en ml/min

Como se observa, trabajando con caudales bajos se obtiene una excelente repetibilidad en la medida de la señal de absorción, pero el tiempo de análisis es mayor. A partir de 3 ml/min se observa una considerable reducción del tiempo de análisis, pero caudales superiores proporcionan mayor imprecisión. Por este motivo se escogió un caudal de 3 ml/min.

En cuanto a la otra variable en estudio, cabe indicar que a mayor longitud del tubo de reacción se obtiene menor sensibilidad, ya que se produce mayor dispersión del bolo de muestra, lo que también repercute en el tiempo de análisis. Así, se observa que con una longitud de 50 cm el tiempo de análisis es considerablemente mayor que para los otros dos valores ensayados. Una longitud entre 10 y 25 cm sería adecuada para llevar a cabo los análisis. Se escogió una longitud de 25 cm porque junto con un caudal de 3 ml/min proporcionaba una adecuada dilución del bolo de muestra inyectado.

A modo de resumen, los valores seleccionados de las variables instrumentales estudiadas para llevar a cabo el análisis empleando el sistema FIA monocanal se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Valores seleccionados de las variables instrumentales del sistema FIA monocanal estudiado.

Variable	Valor seleccionado
Caudal de portador/(ml/min)	3
Longitud del tubo de reacción/cm	25
Bucle de inyección/ $\mu\text{l}$ <sup>a</sup>	200

<sup>a</sup> por razones técnicas 200  $\mu\text{l}$  es el menor volumen posible.

***Procedimiento propuesto para la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría molecular (VIS) empleando un sistema de inyección en flujo continuo monocanal:***

Se pesa, por triplicado, entre 0.02-0.12 g de muestra comercial, se disuelve en etanol y se afora a 25 ml.

Se prepara una disolución patrón de BZ3 de 1000  $\mu\text{g/ml}$  en EtOH, y a partir de ella una escala de calibrado de 0 a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Cada una de estas disoluciones se inyecta por triplicado en el sistema FIA monocanal descrito en la figura 3.5 a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, empleando las condiciones señaladas en la tabla 3.4. La detección se efectúa a 376 nm.

**Parámetros analíticos del método FIA monocanal propuesto:***i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 3.5, siendo **a** la ordenada en el origen (y **s<sub>a</sub>** su desviación estándar), **b** la pendiente (y **s<sub>b</sub>** su desviación estándar), **r<sup>2</sup>** el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado.

Tabla 3.5. Parámetros de la recta de calibrado obtenida para la determinación de BZ3 mediante un sistema de inyección en flujo continuo monocanal.

Longitud de onda/nm	Intervalo de trabajo*(μg/ml)	a±s <sub>a</sub>	b±s <sub>b</sub> /(ml/μg)	r <sup>2</sup>	N
376	0-50	(1.65±0.03).10 <sup>-1</sup>	(0.93±0.01).10 <sup>-2</sup>	0.997	7

\* coincide con el intervalo lineal

*ii) Sensibilidad:*

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de la recta de calibrado es del orden de 10<sup>-2</sup> ml/μg.

*iii) Límite de detección:*

El límite de detección instrumental estimado como **3.s<sub>y/x</sub>/b**, donde **s<sub>y/x</sub>** es la desviación de la recta de calibrado y **b** la pendiente, es de 2.7 μg/ml.

*iv) Exactitud:*

Para evaluar la exactitud del método ensayado, en primer lugar se prepararon calibrados de adición estándar para cada una de las muestras, y las pendientes obtenidas se compararon con la pendiente del calibrado normal, obteniéndose el coeficiente de recuperación **R** como:

$$R (\%) = (b_{a.e.} / b) \cdot 100$$

siendo **b<sub>a.e.</sub>** la pendiente obtenida en el calibrado de adición estándar y **b** la pendiente del calibrado normal.

En la tabla 3.6 se muestran los coeficientes de recuperación obtenidos en cada una de las muestras.

Tabla 3.6. Coeficientes de recuperación obtenidos en las muestras comerciales empleando el sistema FIA monocal.

Muestra	R/%
A	101±4
B	101±6
C	104±3
D	102±6
E	99±5

Los valores cercanos al 100 % indican la ausencia de errores proporcionales a la concentración del analito ocasionados por la matriz de las muestras.

A continuación se determinó el contenido de BZ3 en las muestras comerciales empleando el sistema FIA monocal propuesto. Los resultados de la determinación se muestran en la tabla 3.7 como media de tres réplicas, así como los resultados obtenidos por el método de referencia (descrito en el apartado 3.2).  $C$  es la concentración media obtenida de BZ3 y  $s$  es la desviación estándar de los resultados,  $C_{ref}$  es la concentración media obtenida por el método de referencia y  $s_{ref}$  la desviación estándar de estos resultados.

Los resultados obtenidos por el método propuesto se compararon con los obtenidos por el método de referencia (figura 3.8) mediante un modelo de regresión lineal aplicando el contraste de *t de Student* (Apéndice II).

Tabla 3.7. Resultados obtenidos en la determinación de BZ3 en muestras reales.

Muestra	$C \pm s$ % (m/m)	$C_{ref} \pm s_{ref}$ % (m/m)
A	1.60±0.06	1.57±0.02
B	0.99±0.03	0.95±0.03
C	3.1±0.1	2.97±0.04
D	0.50±0.01	0.50±0.02
E	2.76±0.07	2.54±0.02

El resultado del ajuste fue el siguiente:

$$C = (-0.04 \pm 0.05) + (1.07 \pm 0.03) \cdot C_{ref};$$

$$r^2 = 0.998; N = 5$$

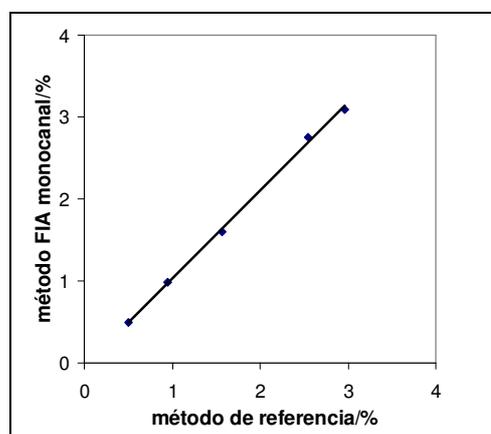


Fig. 3.8. Comparación del método FIA monocal propuesto con el método de referencia.

El valor de  $(t_{cal})_a$  fue de 0.73 mientras que el de  $(t_{cal})_b$  fue de 2.62. Teniendo en cuenta que el valor crítico del parámetro de *t de Student* para un nivel de significación de 5 % y  $N-2=3$  grados de libertad es 3.18,

se concluye que los resultados obtenidos por el método ensayado son estadísticamente comparables a los obtenidos por el método de referencia.

v) *Precisión:*

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto oscilan entre 2-4 %, siendo por tanto adecuados para llevar a cabo la determinación de una manera precisa.

vii) *Velocidad de muestreo:*

El tiempo consumido entre lecturas de una misma disolución es de 15 s, mientras que el tiempo llevado a cabo para realizar un ciclo completo en el que cada disolución se mide por triplicado es de 50 s, por lo que la velocidad de muestreo es de 72 muestras/hora.

**b) Montaje bicanal:**

Se utilizaron disoluciones de  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$  el doble de concentradas que en el montaje monocanal, ya que al confluir se diluyen a la mitad, alcanzándose las proporciones utilizadas en el montaje monocanal.

El montaje utilizado se esquematiza en la figura 3.9.

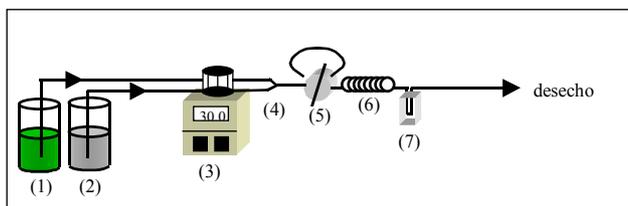


Fig. 3.9. Esquema del montaje FIA bicanal empleado. (1) Disolución de  $\text{Ni}^{+2}$  0.02 M y (2) disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1.0 M en EtOH:agua 80:20 (v/v), (3) bomba peristáltica, (4) conector en forma de Y, (5) válvula de inyección de seis vías con bucle de inyección de 200  $\mu\text{l}$ , (6) tubo de reacción, (7) celda de flujo.

**Estudio de las variables instrumentales:**

Se estudió el caudal total de portador y la longitud del tubo de reacción. Para ello se probaron tres longitudes de tubo de reacción con cinco caudales totales diferentes pero iguales para cada reactivo, siendo el total la suma de los individuales. Los resultados se muestran en las figuras 3.10 y 3.11 y en la tabla 3.8

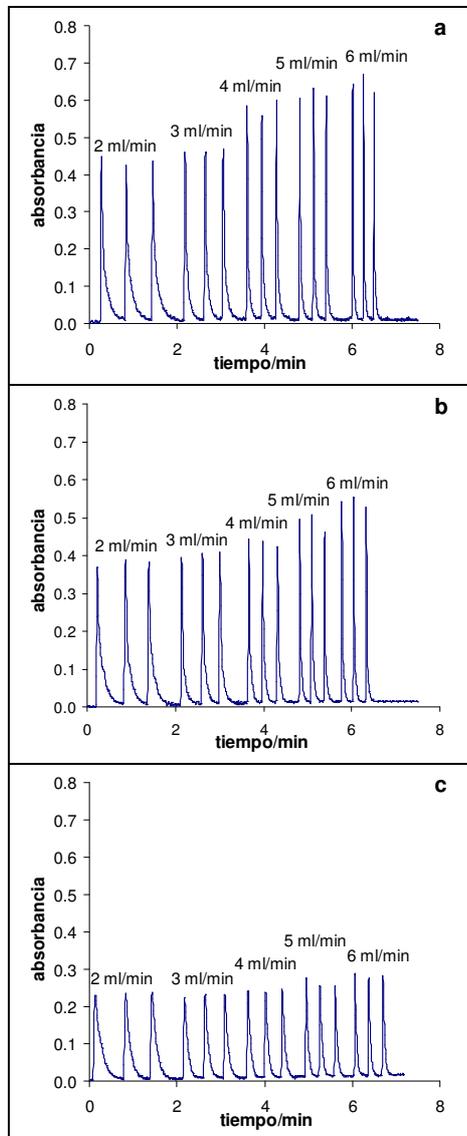


Fig. 3.10. Diagramas obtenidos a diferentes caudales empleando distintas longitudes de tubo de reacción: a) 10 cm, b) 25 cm, c) 50 cm.

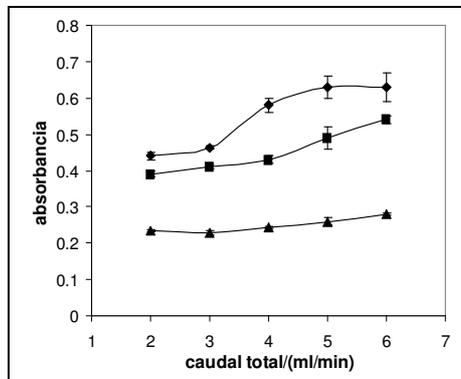


Fig. 3.11. Valores promedio de la señal de absorbancia y su desviación estándar para longitudes de tubo de reacción de 10 (◆) 25 (■) y 50 cm (▲) en función del caudal de portador.

Tabla 3.8. Efecto de la longitud del tubo de reacción (horizontal) y del caudal de portador total (vertical).

	10*	25	50
2**	0.44±0.01 CV=2.2 %	0.390±0.008 CV=2.1 %	0.234±0.004 CV=1.5 %
3	0.463±0.005 CV=1.1 %	0.411±0.007 CV=1.7 %	0.229±0.006 CV=2.7 %
4	0.58±0.02 CV=3.2 %	0.43±0.01 CV=2.7 %	0.243±0.003 CV=1.4 %
5	0.63±0.03 CV=4.9 %	0.49±0.03 CV=5.2 %	0.26±0.01 CV=3.9 %
6	0.63±0.04 CV=5.6 %	0.54±0.01 CV=2.2 %	0.281±0.003 CV=1.1 %

\* en cm

\*\* en ml/min

Al igual que en el montaje monocanal anteriormente estudiado, se escogió un caudal total de 3 ml/min y una longitud de tubo de reacción de 25 cm, debido a que la repetibilidad, tiempo de análisis y sensibilidad eran adecuados para llevar a cabo la determinación de BZ3 en muestras reales.

A modo de resumen, los valores seleccionados de las variables instrumentales implicadas para el análisis mediante el sistema FIA bicanal se muestran en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Valores seleccionados de las variables instrumentales implicadas para el análisis mediante el sistema FIA bicanal.

Variable	Valor a emplear
Caudal de portador/(ml/min)	3 <sup>a</sup>
Longitud del tubo de reacción/cm	25
Bucle de inyección/ $\mu$ l <sup>b</sup>	200

<sup>a</sup> 1.5 ml/min de cada uno de los reactivos.

<sup>b</sup> por razones técnicas 200  $\mu$ l es el menor volumen posible.

***Procedimiento propuesto para la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría de absorción molecular (VIS) empleando un sistema de inyección en flujo continuo bicanal:***

Se pesa por triplicado entre 0.02-0.12 g de muestra comercial, se disuelve en etanol y se afora a 25 ml.

Se prepara una disolución patrón de BZ3 de 1000  $\mu$ g/ml en EtOH, y a partir de ella una escala de calibrado de 0 a 50  $\mu$ g/ml.

Cada una de estas disoluciones se inyecta por triplicado en el sistema FIA bicanal descrito en la figura 3.9 a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro, empleando las condiciones señaladas en la tabla 3.9. La detección se efectúa a 376 nm.

***Parámetros analíticos del método FIA bicanal propuesto:***

*i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 3.10 siendo **a** la ordenada en el origen (y **s<sub>a</sub>** su desviación estándar), **b** la pendiente (y **s<sub>b</sub>** su desviación estándar), **r<sup>2</sup>** el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado.

Tabla 3.10. Parámetros de la recta de calibrado obtenida para la determinación de BZ3 mediante un sistema de inyección en flujo continuo bicanal.

Longitud de onda/nm	Intervalo de trabajo*( $\mu\text{g/ml}$ )	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ /( $\text{ml}/\mu\text{g}$ )	$r^2$	N
376	0-50	$(0.99 \pm 0.03) \cdot 10^{-1}$	$(1.15 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	0.9990	7

\* coincide con el intervalo lineal

*ii) Sensibilidad:*

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de la recta de calibrado es del orden de  $10^{-2}$  ml/ $\mu\text{g}$ .

*iii) Límite de detección:*

El límite de detección instrumental estimado como  $3 \cdot s_{y/x}/b$ , donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y  $b$  la pendiente, es de 1.9  $\mu\text{g/ml}$ .

*iv) Exactitud:*

Del mismo modo que en el sistema FIA monocanal, se prepararon calibrados de adición estándar para cada una de las muestras. Los coeficientes de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 3.11.

Tabla 3.11. Coeficientes de recuperación obtenidos en las muestras comerciales empleando el sistema FIA bicanal.

Muestra	R/%
A	95 $\pm$ 3
B	96 $\pm$ 3
C	98 $\pm$ 7
D	101 $\pm$ 4
E	97 $\pm$ 5

Los valores cercanos al 100 % demuestran la inexistencia de errores proporcionales a la concentración de analito.

A continuación se determinó el contenido de BZ3 en las muestras comerciales empleando el sistema FIA bicanal ensayado. Los resultados de la determinación (**C**) se muestran en la tabla 3.12 como media de tres réplicas, así como los resultados obtenidos por el método de referencia (**C<sub>ref</sub>**) (apartado 3.2.).

Se representaron los resultados obtenidos por el método propuesto frente a los obtenidos por el método de referencia (figura 3.12), y se compararon ambas series de resultados mediante un modelo de regresión lineal aplicando el contraste de *t de Student* (Apéndice II) al igual que en el método FIA monocanal visto con anterioridad.

Tabla 3.12. Resultados obtenidos en la determinación de BZ3 en muestras reales.

Muestra	$C \pm s$ % (m/m)	$C_{ref} \pm s_{ref}$ % (m/m)
A	1,51±0,05	1,57±0,02
B	0,96±0,03	0,95±0,03
C	3,03±0,05	2,97±0,04
D	0,50±0,01	0,50±0,02
E	2,65±0,09	2,54±0,02

El resultado del ajuste fue el siguiente:

$$C = (-0.04 \pm 0.05) + (1.04 \pm 0.03) \cdot C_{ref};$$

$$r^2 = 0.998; N = 5$$

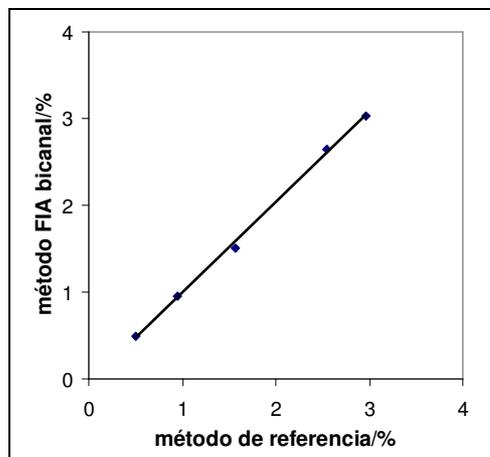


Fig. 3.12. Comparación del método FIA bicanal propuesto con el método de referencia.

El valor de  $(t_{cal})_a$  fue de 0.78 mientras que el de  $(t_{cal})_b$  fue de 1.40. Teniendo en cuenta que el valor crítico del parámetro de *t de Student* para un nivel de significación de 5 % y  $N-2=3$  grados de libertad es 3.18, se observa que la diferencia entre los resultados proporcionados por ambos métodos no es significativa al nivel del 5 %.

v) *Precisión:*

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto oscilan entre 1.5-3.5 %, siendo por tanto adecuados para llevar a cabo la determinación de una manera precisa.

vi) *Robustez del método propuesto frente a la variación en la concentración de los reactivos:*

Se variaron un  $\pm 20$  % las concentraciones de las disoluciones de reactivos, para evaluar si el método propuesto era robusto frente a esta variable. Para ello se midieron las disoluciones patrón de analito y las de una muestra de concentración intermedia (muestra A) por triplicado, manteniendo constante la concentración de uno de los reactivos y modificando la del otro. Los resultados del análisis se compararon entre sí mediante el test ANOVA de un factor (*Apéndice II*). Los resultados se muestran en las tablas 3.13 y 3.14.

Tabla 3.13. Resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Exp	$[\text{NH}_4\text{OH}]/\text{M}$	$[\text{Ni}^{2+}]/\text{M}$	conc. BZ3/%
1	0.8	0.020	1.64±0.09
2	1.0	0.020	1.63±0.07
3	1.2	0.020	1.58±0.06
			$X_{\text{inter}} = 1.62 \pm 0.03$

$$s_{\text{inter}}^2 = 0.0081 \text{ (2 grados de libertad)}$$

$$s_{\text{intra}}^2 = 0.0056 \text{ (24 grados de libertad)}$$

$$F_{\text{cal}} = 1.46$$

Tabla 3.14. Resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$ .

Exp	$[\text{NH}_4\text{OH}]$	$[\text{Ni}^{2+}]$	conc. BZ3/%
1	1.0	0.016	1.62±0.05
2	1.0	0.020	1.58±0.05
3	1.0	0.024	1.58±0.04
			$X_{\text{inter}} = 1.59 \pm 0.02$

$$s_{\text{inter}}^2 = 0.0036 \text{ (2 grados de libertad)}$$

$$s_{\text{intra}}^2 = 0.0022 \text{ (24 grados de libertad)}$$

$$F_{\text{cal}} = 1.64$$

Teniendo en cuenta que el valor crítico de  $F_{(95\%, 2, 24)}$  es 3.42, los resultados son estadísticamente comparables entre sí, por lo que se puede considerar que el método es robusto para la variación de la concentración de los reactivos.

#### vii) Velocidad de muestreo:

El tiempo consumido entre lecturas de una misma disolución es de 15 s, mientras que el tiempo necesario para realizar un ciclo completo en el que cada disolución se mide por triplicado es de 50 s, por lo que la velocidad de muestreo es de 72 muestras/hora.

#### 3.3.2.3. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección secuencial:

El montaje utilizado se esquematiza en la figura 3.13.

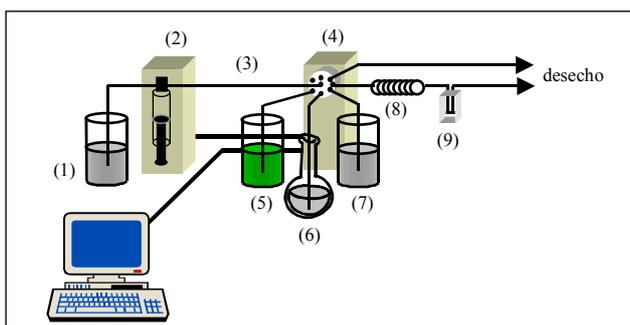


Fig. 3.13. Esquema del montaje SIA empleado. (1) Portador: EtOH, (2) bureta automática con jeringa de 10 ml, (3) tubo de almacenamiento, (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución de  $\text{Ni}^{2+}$  0.01 M en EtOH:agua 80:20 (v/v), (6) disolución de muestra o patrón, (7) disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M en EtOH:agua 80:20 (v/v), (8) tubo de reacción, (9) celda de flujo.

### Estudio de las variables instrumentales:

Se estudiaron las variables instrumentales que afectaban a la señal analítica, para seleccionar los valores que proporcionaban mejor repetibilidad.

Para ello se preparó una disolución de 20  $\mu\text{g/ml}$  de BZ3 en EtOH y se aspiró por triplicado en el sistema SIA modificando los valores de la variable en estudio y manteniendo constantes el resto de parámetros.

La detección se llevó a cabo en todos los casos a 376 nm corrigiendo la señal con los valores obtenidos de las lecturas tomadas a 700 nm para minimizar el efecto de las variaciones del índice de refracción (*efecto Schlieren*).

#### i) Estudio de la estructura del sándwich:

Los resultados a modo de gráfico se muestran en las figuras 3.14 y 3.15, y en la tabla 3.15 se muestran los coeficientes de variación (CV) obtenidos en cada caso.

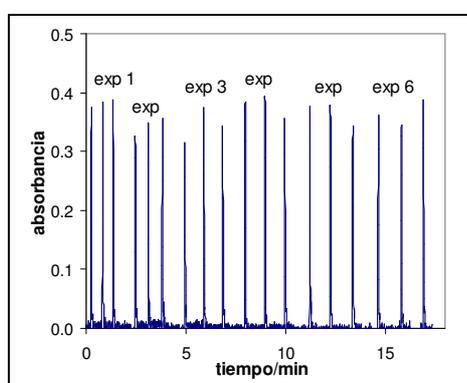


Fig. 3.14. Influencia de la estructura del sándwich.

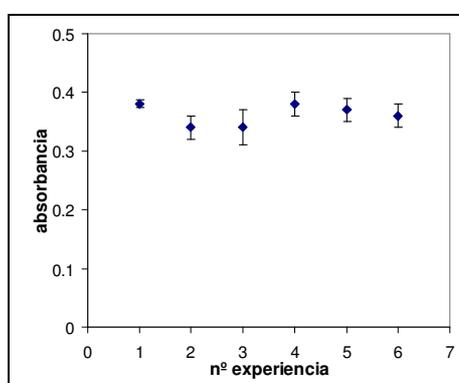


Fig. 3.15. Valores promedio de la señal de absorbancia y su desviación estándar para cada una de las combinaciones ensayadas.

Tabla 3.15. Efecto de la estructura del sándwich sobre la señal de absorbancia.

Experiencia	Secuencia	A±s	CV/%
1	Ni <sup>2+</sup> -BZ3-NH <sub>4</sub> OH	0.381±0.007	1.9
2	NH <sub>4</sub> OH -BZ3-Ni <sup>2+</sup>	0.34±0.02	4.6
3	NH <sub>4</sub> OH -Ni <sup>2+</sup> -BZ3-Ni <sup>2+</sup> -NH <sub>4</sub> OH	0.34±0.03	8.8
4	Ni <sup>2+</sup> -NH <sub>4</sub> OH -BZ3-NH <sub>4</sub> OH -Ni <sup>2+</sup>	0.38±0.02	4.9
5	NH <sub>4</sub> OH -Ni <sup>2+</sup> -BZ3-NH <sub>4</sub> OH -Ni <sup>2+</sup>	0.37±0.02	5.1
6	Ni <sup>2+</sup> -NH <sub>4</sub> OH -BZ3-Ni <sup>2+</sup> -NH <sub>4</sub> OH	0.36±0.02	5.8

200 µl de disolución de muestra, 100 µl de la disolución de cada reactivo, velocidad de propulsión 7.5 ml/min, velocidad de aspiración 75 ml/min, longitud del tubo de reacción 25 cm y longitud del tubo de almacenamiento 150 cm.

Como puede observarse, la señal analítica es similar para cualquiera de las estructuras ensayadas, pero los resultados obtenidos empleando la secuencia indicada en la experiencia 1 proporcionaban mayor repetibilidad en la señal, manifestándose en el valor del CV obtenido. Por tanto se seleccionó esta estructura de sándwich para las posteriores experiencias.

*ii) Influencia del volumen de muestra aspirado:*

Los resultados a modo de gráfico se muestran en las figuras 3.16 y 3.17, y en la tabla 16 se muestran los coeficientes de variación (CV) correspondientes.

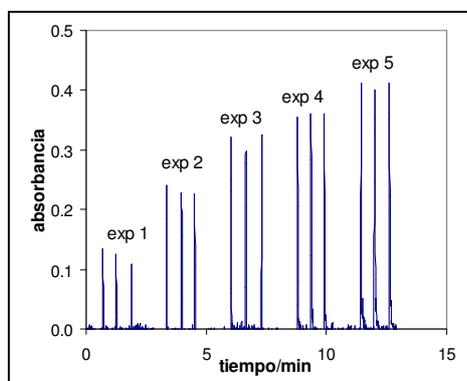


Fig. 3.16 Influencia del volumen de muestra aspirado.

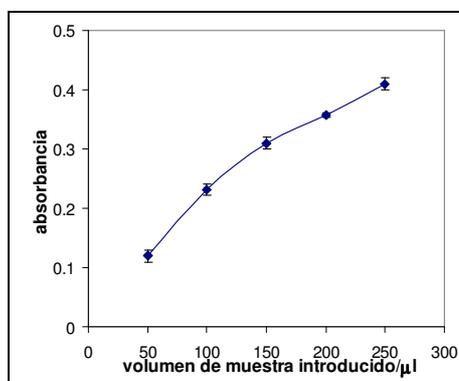


Fig. 3.17. Valores promedio de la señal de absorbancia y su desviación en función del volumen de muestra aspirado.

Tabla 3.16. Efecto del volumen de muestra aspirado sobre la señal de absorbancia.

exp.	$V_m/\mu\text{l}$	$A\pm s$	CV/%
1	50	$0.12\pm 0.01$	11
2	100	$0.231\pm 0.009$	3.8
3	150	$0.31\pm 0.01$	4.7
4	200	$0.358\pm 0.004$	1.1
5	250	$0.41\pm 0.01$	2.6

Estructura sándwich  $\text{Ni}^{2+}$ -BZ3- $\text{NH}_4\text{OH}$ , 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de cada reactivo, velocidad de propulsión 7.5 ml/min, velocidad de aspiración 75 ml/min, longitud del tubo de reacción 25 cm y longitud del tubo de almacenamiento 150 cm.

La sensibilidad aumenta con el volumen de muestra pero se escogió un volumen de inyección de muestra de 200  $\mu\text{l}$ , ya que proporcionaba la menor imprecisión en la señal.

iii) *Influencia del volumen de reactivos aspirado:*

Se aspiraron diferentes volúmenes de disolución de reactivos (e iguales entre sí), con el fin de escoger el más adecuado.

Los resultados se muestran en las figuras 3.18 y 3.19, indicándose los coeficientes de variación (CV) en la tabla 3.17.

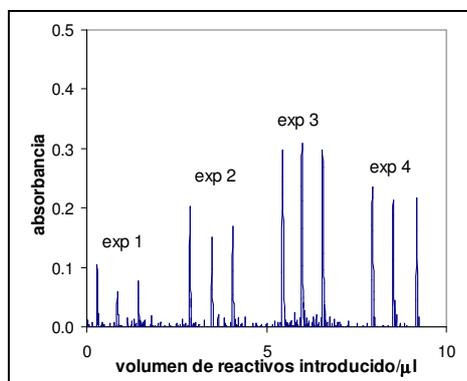


Fig. 3.18 Influencia del volumen de reactivos aspirado.

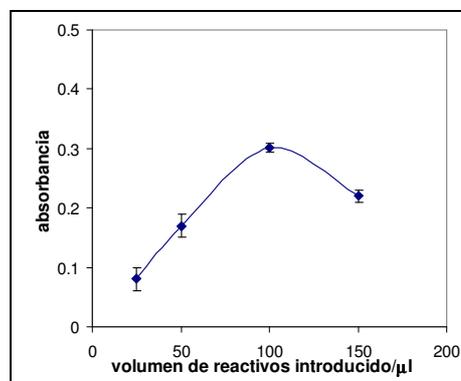


Fig. 3.19. Valores promedio de la señal de absorbancia y su desviación en función del volumen de reactivos aspirado.

Tabla 3.17. Efecto del volumen de reactivos aspirado sobre la señal de absorbancia.

exp.	$V_r/\mu\text{l}$	$A\pm s$	CV/%
1	25	$0.08\pm 0.02$	28
2	50	$0.17\pm 0.02$	14
3	100	$0.302\pm 0.007$	2.2
4	150	$0.22\pm 0.01$	5.0

Estructura sándwich  $\text{Ni}^{2+}$ -BZ3- $\text{NH}_4\text{OH}$ , 200  $\mu\text{l}$  de la disolución de muestra o patrón, velocidad de propulsión 7.5 ml/min, velocidad de aspiración 75 ml/min, longitud del tubo de reacción 25 cm y longitud del tubo de almacenamiento 150 cm.

Un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de cada uno de los reactivos proporcionaba la máxima sensibilidad y la menor imprecisión.

*iv) Influencia de la velocidad de propulsión:*

Por razones técnicas la velocidad de aspiración permaneció constante e igual a 75 ml/min. Se ensayaron diferentes valores de velocidad de propulsión.

Hay que tener en cuenta que la reacción es instantánea y no depende del tiempo, pero la velocidad de propulsión puede influir en el mezclado y por ello puede verse afectada la señal.

Los resultados a modo de gráfico se muestran en las figuras 3.20 y 3.21, y en la tabla 3.18 se muestran los coeficientes de variación (CV) obtenidos.

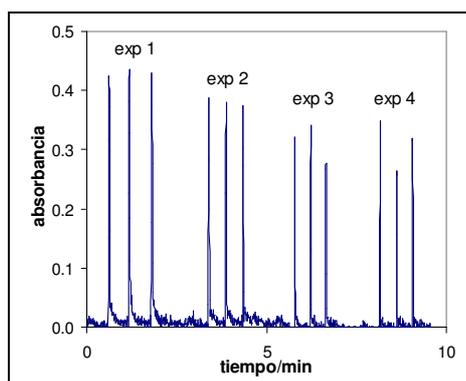


Fig. 3.20. Influencia de la velocidad de propulsión.

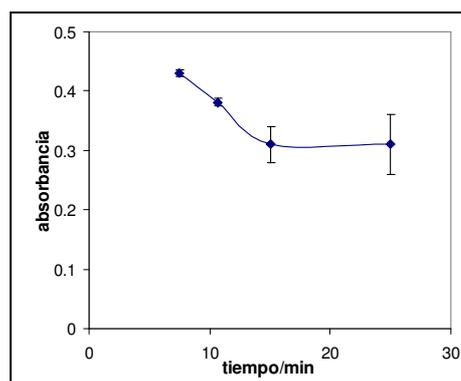


Fig. 3.21. Valores promedio de la señal de absorbancia y su desviación en función de la velocidad de propulsión.

Tabla 3.18. Efecto de la velocidad de propulsión sobre la señal de absorbancia.

exp.	$v_{prop}/(ml/min)$	A $\pm$ s	CV/%
1	7.5	0.430 $\pm$ 0.006	1.4
2	10.7	0.381 $\pm$ 0.006	1.6
3	15	0.31 $\pm$ 0.03	10
4	25	0.31 $\pm$ 0.05	15

Estructura sándwich Ni<sup>2+</sup>-BZ3-NH<sub>4</sub>OH, 200  $\mu$ l de la disolución de muestra o patrón, 100  $\mu$ l de la disolución de cada reactivo, velocidad de aspiración 75 ml/min, longitud del tubo de reacción 25 cm y longitud del tubo de almacenamiento 150 cm.

Se escogió una velocidad de propulsión de 7.5 ml/min, ya que no sólo proporcionaba una alta repetibilidad, sino también una mayor sensibilidad.

v) *Influencia de la longitud del tubo de reacción:*

Se ensayaron diferentes longitudes de tubo de reacción con el fin de escoger la más adecuada. La longitud del tubo de almacenamiento se mantuvo constante (150 cm), ya que sólo se requiere que sea suficientemente grande para almacenar todo el volumen que se aspira.

Los resultados a modo de gráfico se muestran en las figuras 3.22 y 3.23, indicándose los coeficientes de variación (CV) obtenidos en la tabla 3.19.

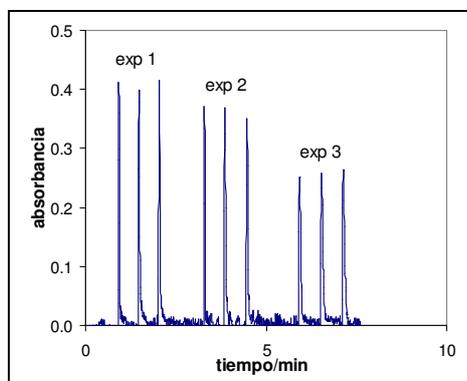


Fig. 3.22. Influencia de la longitud del tubo de reacción.

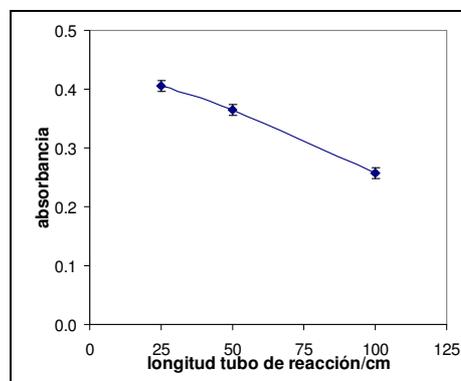


Fig. 3.23. Valores promedio de la señal de absorbancia y su desviación en función de la longitud del tubo de reacción.

Tabla 3.19. Efecto de la longitud del tubo de reacción sobre la señal de absorbancia.

exp.	L/cm	A $\pm$ s	CV/%
1	25	0.406 $\pm$ 0.009	2.2
2	50	0.365 $\pm$ 0.009	2.5
3	100	0.257 $\pm$ 0.005	2.0

Estructura sándwich Ni<sup>2+</sup>-BZ3-NH<sub>4</sub>OH, 200  $\mu$ l de la disolución de muestra o patrón, 100  $\mu$ l de la disolución de cada reactivo, velocidad de propulsión 7.5 ml/min, velocidad de aspiración 75 ml/min y longitud del tubo de almacenamiento 150 cm.

Al aumentar la longitud del tubo de reacción disminuye considerablemente la sensibilidad, debido a la dispersión del bolo de muestra, haciendo que el tiempo de análisis sea mayor, mientras que la precisión obtenida es comparable. Se escogió una longitud de 25 cm que proporcionaba la máxima sensibilidad y menor tiempo de análisis. Valores menores no fueron posibles debido a la configuración del sistema.

A modo de resumen, los valores de las variables instrumentales que proporcionaban los mejores resultados en la señal analítica se muestran en la tabla 3.20.

Tabla 3.20. Valores de las variables instrumentales seleccionados para el análisis mediante el sistema SIA.

Variable	Valor seleccionado
estructura del sándwich	Ni <sup>2+</sup> (0.01 M) - BZ3 - NH <sub>4</sub> OH(0.5 M)
volumen inyección de BZ3/ $\mu$ l	200
volumen inyección de reactivos/ $\mu$ l	100
velocidad de propulsión/(ml/min) <sup>a</sup>	7.5
longitud del tubo de reacción/cm <sup>b</sup>	25

<sup>a</sup> velocidad de aspiración 75 ml/min

<sup>b</sup> longitud del tubo de almacenamiento 150 cm

***Procedimiento propuesto para la determinación de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría de absorción molecular (VIS) empleando un sistema de inyección secuencial:***

Se pesa por triplicado entre 0.02-0.12 g de muestra comercial, se disuelve en EtOH y se afora a 25 ml. Las muestras que contienen TiO<sub>2</sub> se pasan a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m de diámetro o se filtran empleando papel Whatman 42.

Se prepara un disolución patrón de BZ3 de 1000  $\mu$ g/ml en EtOH, y a partir de ella una escala de calibrado de 8 a 40  $\mu$ g/ml.

Cada una de estas disoluciones se aspiran por triplicado en el sistema SIA descrito en la figura 3.13, empleando las condiciones señaladas en la tabla 3.20. La detección se efectúa a 376 nm, corrigiéndose con el valor de absorbancia a 700 nm.

El ciclo a emplear en la determinación de BZ3 es el siguiente:

- 1) aspiración de 5000  $\mu\text{l}$  de portador
- 2) aspiración de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  0.01 M
- 3) aspiración de 200  $\mu\text{l}$  de la disolución patrón o muestra
- 4) aspiración de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M
- 5) propulsión de 1500  $\mu\text{l}$  hacia el detector a través del tubo de reacción

(Esta secuencia se realiza por triplicado para cada una de las disoluciones patrón o muestra. A continuación se realiza una etapa de limpieza con la siguiente disolución a medir, aspirándose 100  $\mu\text{l}$  por triplicado de la nueva disolución y propulsando 1000  $\mu\text{l}$  por el tubo de desecho).

### Parámetros analíticos del método SIA propuesto:

#### *i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 3.21, siendo **a** la ordenada en el origen y **b** la pendiente de las rectas de calibrado y **s<sub>a</sub>** y **s<sub>b</sub>** sus respectivas desviaciones estándar, **r<sup>2</sup>** el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado obtenidas.

Tabla 3.21. Parámetros de la recta de calibrado obtenida para el análisis mediante inyección secuencial.

longitud de onda/nm *	intervalo de trabajo**( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$a \pm s_a$	$b \pm s_b / (\text{ml}/\mu\text{g})$	$r^2$	N
376	0-40	$(-1.1 \pm 0.9) \cdot 10^{-2}$	$(1.84 \pm 0.04) \cdot 10^{-2}$	0.995	5

\* corregida con el valor a 700 nm

\*\* coincide con el intervalo lineal

#### *ii) Sensibilidad:*

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de la recta de calibrado es del orden de  $10^{-2}$  ml/ $\mu\text{g}$ .

#### *iii) Límite de detección:*

El límite de detección instrumental estimado aplicando el criterio  $3 \cdot s_{y/x} / b$ , donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y **b** la pendiente, es de 2.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### *iv) Exactitud:*

Del mismo modo que en los sistemas FIA descritos con anterioridad, se prepararon calibrados de adición estándar para cada una de las

muestras. Los coeficientes de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 3.22.

Tabla 3.22. Coeficientes de recuperación obtenidos en las muestras comerciales empleando el sistema SIA.

Muestra	R/%
A	103±6
B	102±5
C	98±4
D	102±4
E	101±4

Los valores cercanos al 100 % demuestran la inexistencia de errores proporcionales a la concentración de analito.

A continuación se determinó el contenido de BZ3 en las muestras comerciales empleando el sistema SIA ensayado. Los resultados de la determinación (**C**) se muestran en la tabla 3.23 como media de tres réplicas, así como los resultados obtenidos por el método de referencia (**C<sub>ref</sub>**) (*apartado 3.2.*), y del mismo modo que en los casos anteriores, los resultados se compararon aplicándose el contraste de *t de Student* (*Apéndice II*).

Tabla 3.23. Resultados obtenidos en la determinación de BZ3 en muestras reales.

Muestra	C±s % (m/m)	C <sub>ref</sub> ±S <sub>ref</sub> % (m/m)
A	1.52±0.08	1.57±0.02
B	0.95±0.03	0.95±0.03
C	3.1±0.2	2.97±0.04
D	0.59±0.02	0.50±0.02
E	2.6±0.2	2.54±0.02

El resultado del ajuste fue el siguiente:

$$C = (0.00 \pm 0.07) + (1.03 \pm 0.04) \cdot C_{ref};$$

$$r^2 = 0.996; N = 5$$

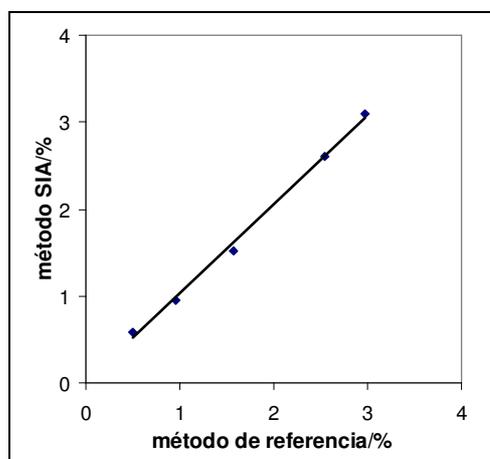


Fig. 3.24. Comparación del método SIA propuesto con el método de referencia.

El valor de  $(t_{cal})_a$  fue de 0.02 mientras que el de  $(t_{cal})_b$  fue de 0.71. Teniendo en cuenta que el valor crítico del parámetro de *t de Student* para un nivel de significación de 5 % y  $N-2=3$  grados de libertad es 3.18, se puede concluir que los resultados obtenidos por el método ensayado no difieren significativamente de los obtenidos por el método de referencia.

v) *Precisión:*

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto oscilan entre 3-8 %, siendo por tanto adecuados para llevar a cabo la determinación de una manera precisa.

vi) *Robustez del método propuesto frente a la variación en la concentración de los reactivos:*

Para evaluar la robustez frente a la variación en la concentración de los reactivos empleados, se variaron un  $\pm 20$  % sus concentraciones. Para ello se midieron las disoluciones patrón de analito y las de una muestra de concentración intermedia (muestra A) por triplicado, manteniendo constante la concentración de uno de los reactivos y modificando la del otro. Los resultados del análisis se compararon entre sí mediante el test ANOVA de un factor descrito con anterioridad (*Apéndice II*). Los resultados se muestran en las tablas 3.24 y 3.25.

Tabla 3.24. Resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Exp	$[\text{NH}_4\text{OH}]/\text{M}$	$[\text{Ni}^{2+}]/\text{M}$	conc. BZ3/%
1	0.4	0.010	1.61 $\pm$ 0.06
2	0.5	0.010	1.55 $\pm$ 0.05
3	0.6	0.010	1.57 $\pm$ 0.09
			$X_{\text{inter}} = 1.57 \pm 0.03$

$$s_{\text{inter}}^2 = 0.0081 \text{ (2 grados de libertad)}$$

$$s_{\text{intra}}^2 = 0.0047 \text{ (24 grados de libertad)}$$

$$F_{\text{cal}} = 1.72$$

Tabla 3.25. Resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$ .

Exp	$[\text{NH}_4\text{OH}]/\text{M}$	$[\text{Ni}^{2+}]/\text{M}$	conc. BZ3/%
1	0.5	0.008	1.54 $\pm$ 0.08
2	0.5	0.010	1.55 $\pm$ 0.05
3	0.5	0.012	1.61 $\pm$ 0.11
			$X_{\text{inter}} = 1.56 \pm 0.04$

$$s_{\text{inter}}^2 = 0.0144 \text{ (2 grados de libertad)}$$

$$s_{\text{intra}}^2 = 0.0070 \text{ (24 grados de libertad)}$$

$$F_{\text{cal}} = 2.05$$

Teniendo en cuenta que el valor crítico de  $F_{\text{tab}(95\%, 2, 24)}$  es 3.42, los resultados son estadísticamente comparables entre sí, por lo que se concluye que el método es robusto para la variación de la concentración de los reactivos.

vii) *Velocidad de muestreo:*

El tiempo consumido entre lecturas de una misma disolución es de 34 s, mientras que el tiempo necesario para realizar un ciclo completo en el que cada disolución se mide por triplicado y se lleva a cabo una etapa de limpieza es de 150 s, por lo que la velocidad de muestreo es de 24 muestras/hora.

### **3.4. CONCLUSIONES**

Se han puesto a punto diversos métodos analíticos automatizados que permiten la determinación directa de benzofenona-3 en productos cosméticos para la protección solar. Se basan en la reacción de complejación entre la benzofenona-3 y el níquel en medio amoniacal, formando un complejo cuya absorbancia en el visible puede utilizarse con fines analíticos.

Los procedimientos propuestos permiten la determinación directa sin una separación previa, y las determinaciones se llevan a cabo en línea de una manera rápida y sencilla.

Los dos sistemas de inyección en flujo continuo y el sistema de inyección secuencial propuestos permiten obtener unas buenas características analíticas (linealidad, límite de detección, precisión, exactitud, robustez, frecuencia de muestreo).

El sistema de inyección secuencial proporciona una sensibilidad mayor que los métodos de inyección en flujo continuo, y límites de detección similares, pero la precisión es ligeramente menor.

La frecuencia de muestreo de los sistemas de inyección en flujo continuo fue tres veces superior que la del sistema de inyección secuencial.

La mayor ventaja del sistema de inyección secuencial respecto a los sistemas de inyección en flujo continuo es la del bajo consumo de reactivos, lo que ocasiona una disminución del volumen de residuos generado, así como un mayor grado de automatización debido a la programación de las etapas del análisis mediante un sencillo programa informático.

En todos los casos se ha utilizado etanol como disolvente y portador, evitando el uso de disolventes orgánicos de mayor toxicidad.



## **CAPÍTULO 4**

### **DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FENIL BENCIMIDAZOL SULFÓNICO Y BENZOFENONA-4 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR (UV) EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN SECUENCIAL**

El contenido de este Capítulo ha sido publicado en *Anal Chim Acta* (2002) 464:295-301, y presentado como cartel en las 10<sup>as</sup> *Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona, 2002.



## 4.1. INTRODUCCIÓN

### 4.1.1. Interés de la determinación de ácido fenilbencimidazol sulfónico y benzofenona-4 en productos cosméticos para la protección solar:

La mayor parte de los productos cosméticos para la protección solar se formulan en forma de cremas y lociones oleosas en las que muchos de los filtros orgánicos se incorporan disueltos en la fase oleosa de la formulación, pero recientemente han aparecido en el mercado lociones acuosas en forma de *spray*. Este tipo de formulaciones incorpora filtros hidrosolubles como el ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS) y la benzofenona-4 (BZ4), que presentan un grupo sulfónico en su estructura fácil de disociar (ver apartado 1.3.1) y que les confiere su solubilidad en la fase acuosa.

La combinación de estos dos filtros en las formulaciones permite obtener una buena protección de la radiación solar en una amplia zona del espectro, como puede deducirse de sus espectros de absorción (figura 4.1).

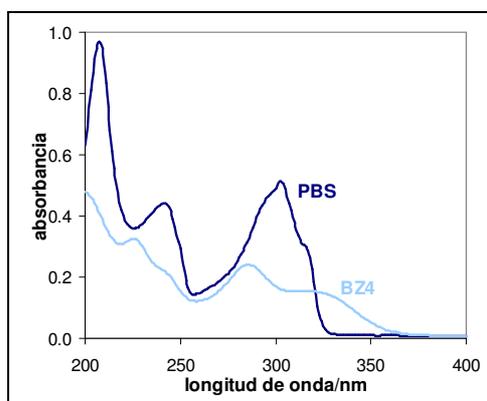


Fig. 4.1. Espectro UV de disoluciones de 5  $\mu\text{g/ml}$  de PBS y BZ4 en agua.

Esto, unido a la facilidad de aplicación del *spray* sobre la piel y la mayor confortabilidad, hace que este tipo de formulaciones solares esté proliferando en el mercado actual.

Según la normativa europea (*tabla 1.2, Capítulo 1 de esta memoria*), puede emplearse hasta un 8 % de PBS en el producto acabado, mientras que sólo un 5 % de BZ4. No obstante, se han descrito algunas reacciones alérgicas y de fotosensibilización (*Schauder e Ippen, 1997; Alanko et al., 2001*).

En el presente capítulo se pretende poner a punto un método analítico para su determinación en productos cosméticos para la protección solar mediante espectrometría UV.

#### **4.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:**

*No existe ningún método oficial para la determinación de estos dos compuestos. En la bibliografía analítica se pueden encontrar pocos artículos en los que se determinan cuantitativamente ambos filtros de forma simultánea en muestras reales empleando técnicas cromatográficas o afines. Así, se han propuesto varios métodos basados en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Eiden y Tittel, 1981 a; Eiden y Tittel, 1981 b; König y Ryschka, 1983; König, 1984; Gagliardi et al., 1989; Wallner, 1993; Schneider et al., 1996) y tan sólo uno basado en la cromatografía micelar electrocinética (MEKC) (Pietta et al., 1995). Por otra parte, Rastogi y Jensen (1998) proponen un método de análisis cualitativo para la determinación de 20 filtros UV en productos solares (entre los que se encuentran PBS y BZ4) basado en la comparación del tiempo de retención y del espectro UV de las muestras con una base de datos hallada previamente con disoluciones patrón de los filtros UV. Tan sólo existe un trabajo en el que se emplean técnicas espectrométricas, publicado por Azevedo et al. (1999), empleando espectros derivados, aplicado al análisis de una sola muestra y en el que se determinan ambos analitos por separado.*

#### **4.1.3. Justificación del objetivo de trabajo:**

En el presente capítulo se pretende poner a punto un método analítico que permita la determinación simultánea de ambos filtros UV en muestras de protectores solares mediante espectrometría en el UV, realizando una extracción en fase sólida en línea empleando una microcolumna de intercambio aniónico.

Con el fin de automatizar el proceso, se emplea un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA), cuyas ventajas se han comentado anteriormente.

En las bases bibliográficas consultadas durante la realización de este trabajo no se encontró ningún antecedente de la determinación simultánea de estos dos filtros UV mediante espectrometría de absorción UV.

## **4.2. MÉTODO DE REFERENCIA: DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FENILBENCIMIDAZOL SULFÓNICO Y BENZOFENONA-4 MEDIANTE CROMATOGRFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

Se determinó el contenido de PBS y BZ4 en ocho muestras de aguas solares comerciales. Estas experiencias se realizaron para poder evaluar posteriormente la exactitud del método propuesto. El procedimiento experimental se basa en un método propuesto por *Wallner (1993)*, ya que no existen métodos analíticos oficiales para el análisis de este tipo de productos.

### **4.2.1. Método de referencia. Parte experimental:**

#### **4.2.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un cromatógrafo de HPLC marca Hitachi con bucle de inyección de 20 µl, con bomba de alta presión Hitachi modelo L-7100 y con detector UV/VIS Hitachi modelo L-7420. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> (LiChrospher® RP-18 (12.5 cm x 4 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm)) de la casa comercial Merck.

#### **4.2.1.2. Reactivos y muestras:**

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: Acetato amónico (Probus, Badalona (Barcelona)), acetonitrilo (Scharlab, Barcelona) y agua desionizada (empleando un sistema NANOpureII de Barnstead (Boston, EEUU)) se emplearon para la preparación de la fase móvil. Ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS) 99 % (Guinama, Valencia) y benzofenona-4 (BZ4) 99.9 % (Roig Farma S.A., Terrasa (Barcelona)) se emplearon como patrones.

Las muestras comerciales analizadas fueron las siguientes: Agua Solar Babe FPS 4 (*muestra A*), Agua Solar Babe FPS 8 (*muestra B*) y Agua Solar Babe FPS 12 (*muestra C*) (Laboratorios RNB S.L., Paterna, (Valencia)). Agua Solar Babaria FPS 8 (*muestra D*), Agua Solar Babaria FPS 12 (*muestra E*) y Agua Solar Babaria FPS 4 (*muestra H*) (Laboratorios Berioska S.L., Cheste (Valencia)). Agua Solar Nievina FPS 2 (*muestra F*) y Agua Solar Nievina FPS 2 (*muestra G*) (Laboratorios Vigmar, Valencia).

Se prepararon dos muestras en nuestro laboratorio de acuerdo con el protocolo seguido por la empresa Berioska S.L. (*muestra I*) y por la empresa RNB S.L. (*muestra J*), tal y como se detalla en el *Anexo 4.1* de este capítulo.

#### 4.2.1.3. Procedimiento experimental:

Las muestras se prepararon pesando por triplicado entre 0.01-0.06 g y aforando a 10 ml con fase móvil.

De igual modo se prepararon disoluciones patrón multicomponente de PBS (20-100  $\mu\text{g/ml}$ ) y BZ4 (8-40  $\mu\text{g/ml}$ ).

Tanto las disoluciones patrón como las de las muestras se inyectaron en el sistema cromatográfico empleando un bucle de inyección de 20  $\mu\text{l}$ .

Se trabajó a un caudal constante de 0.75 ml/min empleándose tampón acetato amónico  $5 \cdot 10^{-3}$  M (pH 3.8):acetonitrilo 75:25 (v/v) como fase móvil. La detección se efectuó a 286 nm.

#### 4.2.2. Método de referencia. Resultados:

En experiencias anteriores al análisis se inyectaron por separado disoluciones de ambos analitos, con el fin de conocer el tiempo de retención en las condiciones de trabajo para posteriormente poder asignar los picos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Tiempos de retención de los analitos.

componente	tiempo de retención/min
PBS	1.53
BZ4	2.35

En la figura 4.2 se muestra a modo de ejemplo un cromatograma de una disolución patrón conteniendo 20  $\mu\text{g/ml}$  de PBS y 8  $\mu\text{g/ml}$  de BZ4. Los cromatogramas de las muestras se realizaron en las mismas condiciones que las de los patrones. En la figura 4.3 se muestra un cromatograma correspondiente a la muestra A.

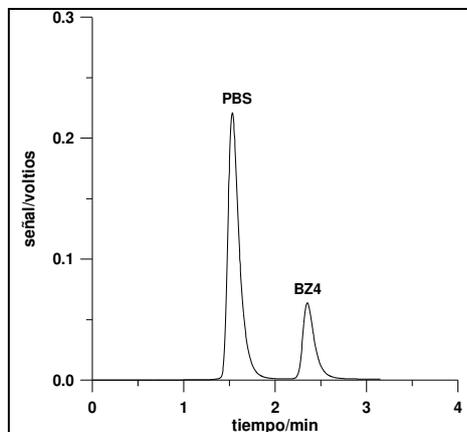


Fig. 4.2. Cromatograma de una disolución patrón conteniendo 20 µg/ml de PBS y 8 µg/ml de BZ4.

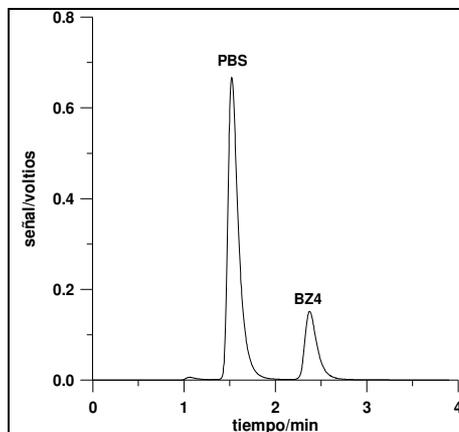


Fig. 4.3. Cromatograma correspondiente a la disolución de la muestra A.

La recta de calibrado de los dos analitos se obtuvo representando el área del pico correspondiente frente a su concentración, de modo que:

$$A_{\text{PBS}} = (4 \pm 2) \cdot 10^5 + (84 \pm 3) \cdot 10^3 \cdot C_{\text{PBS}}; \quad r^2 = 0.9995; \quad N = 5$$

$$A_{\text{BZ4}} = -(0.2 \pm 0.2) \cdot 10^5 + (66.4 \pm 0.8) \cdot 10^3 \cdot C_{\text{BZ3}}; \quad r^2 = 0.9994; \quad N = 5$$

siendo **A** el área y **C** la concentración en µg/ml, respectivamente.

Los resultados de la determinación, como media de tres réplicas, se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Concentración de los analitos en las muestras comerciales obtenida por el método de referencia.

Muestra	$C_{\text{ref}} \pm s_{\text{ref}} / \% \text{ (m/m)}^*$	
	PBS	BZ4
A	1.62±0.02	0.55±0.01
B	3.20±0.03	1.10±0.01
C	4.25±0.02	1.6±0.2
D	3.32±0.03	1.10±0.01
E	5.30±0.04	1.71±0.02
F	N.D.**	0.53±0.01
G	0.43±0.01	N.D.
H	0.91±0.02	N.D.

\* No detectable

Estos resultados se toman como referencia y se utilizarán posteriormente para compararlos con el método propuesto, con el fin de evaluar su exactitud.

### **4.3. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FENILBENCIMIDAZOL SULFÓNICO Y BENZOFENONA-4 MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR (UV) EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN SECUENCIAL**

#### **4.3.1. Método propuesto. Parte experimental:**

##### **4.3.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un espectrofotómetro UV/VIS de fila de diodos marca Hewlett-Packard modelo Diode 8453 y una cubeta de flujo Hellma® modelo QS 1000 (18 µl de volumen interno).

El sistema SIA estuvo constituido por una bureta automática Crison 2031 provista de una jeringa de 5 ml y una válvula automática de 8 vías marca Crison 2030 conectada a un ordenador mediante una interfase RS 232C y controlada mediante un programa informático no comercial diseñado para este sistema. Se empleó tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno.

Se preparó una microcolumna de intercambio aniónico cargando 150 mg de relleno SAX LiChrolut® (cloruro de trimetilaminopropilo) (Merck, Darmstadt (Alemania)) en tubo de teflón de 20 x 3 mm d.i., que se acondicionó con 0.5 ml de etanol grado HPLC (Scharlab, Barcelona) en cada sesión de trabajo.

También se empleó un pHmetro Crison modelo micropH 2001.

##### **4.3.1.2. Reactivos y muestras:**

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: hidróxido sódico (Probus, Badalona (Barcelona)), ácido clorhídrico 37 % (Scharlab, Barcelona), ácido acético glacial d=1.05 g/ml (Panreac, Barcelona) todos ellos de calidad "*para análisis*", y agua desionizada.

Ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS) 99 % (Guinama, Valencia) y benzofenona-4 (BZ4) 99.9 % (Roig Farma S.A., Terrasa (Barcelona)) se emplearon como patrones.

Las muestras de aguas solares estudiadas fueron las citadas en el apartado 4.2.1.2.

#### **4.3.1.3. Metodología de trabajo:**

La metodología seguida en la realización del presente capítulo ha sido la siguiente:

En primer lugar se realizaron estudios previos de las condiciones de retención/elución selectiva de cada uno de los analitos en la microcolumna. Posteriormente se estudiaron parámetros como los volúmenes de elución y concentración de HCl necesarios para provocar la retención/elución selectiva de ambos analitos.

A continuación se realizaron estudios para proceder al tratamiento de la muestra en línea, mediante la formación de estructuras sándwich con tampón para seleccionar el pH más adecuado para llevar a cabo la retención.

Finalmente se aplicó el método al análisis de dos muestras de aguas solares preparadas en el laboratorio según protocolos de empresas del sector<sup>‡</sup> para evaluar su exactitud, aplicando finalmente el método al análisis de ocho muestras comerciales, comparando los resultados con los obtenidos por un método HPLC utilizado como referencia.

En el *apartado 4.3.2* se detallan todos los estudios realizados y los resultados obtenidos en cada uno de ellos, así como el procedimiento propuestos y sus parámetros analíticos.

#### **4.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:**

Estudios preliminares demostraron que tanto PBS como BZ4 quedan retenidos en el relleno SAX, de forma que PBS puede ser eluido con HCl 0.1 M, mientras que BZ4 precisa mayor concentración de HCl. Por ello se estudiaron las condiciones necesarias para conseguir la elución selectiva de ambos componentes.

##### **4.3.2.1. Estudio de la elución selectiva de PBS:**

Se prepararon disoluciones de PBS de 10 µg/ml y de BZ4 de 20 µg/ml por separado, así como una disolución mezcla conteniendo las mismas cantidades, en medio tampón acetato 0.5 M pH=4. Tanto estas

---

<sup>‡</sup> La colaboración establecida entre el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral y diversas empresas valencianas del sector cosmético, así como la realización de un curso de iniciación a la cosmética, permitió la familiarización en la preparación de los productos solares a escala de laboratorio.

disoluciones como una disolución blanco se aspiraron al interior del sistema SIA con el fin de estudiar el efecto del volumen de HCl 0.1 M en la elución. Tras cargar la microcolumna se pasaron diferentes volúmenes (500-1000  $\mu\text{l}$ ) de HCl 0.1 M. Posteriormente, se pasaron otros 500  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M y finalmente 500  $\mu\text{l}$  de disolución de HCl 1.0 M para asegurar la total elución. En la figura 4.4 se observan los siagramas obtenidos a 300 nm para cada una de las experiencias realizadas.

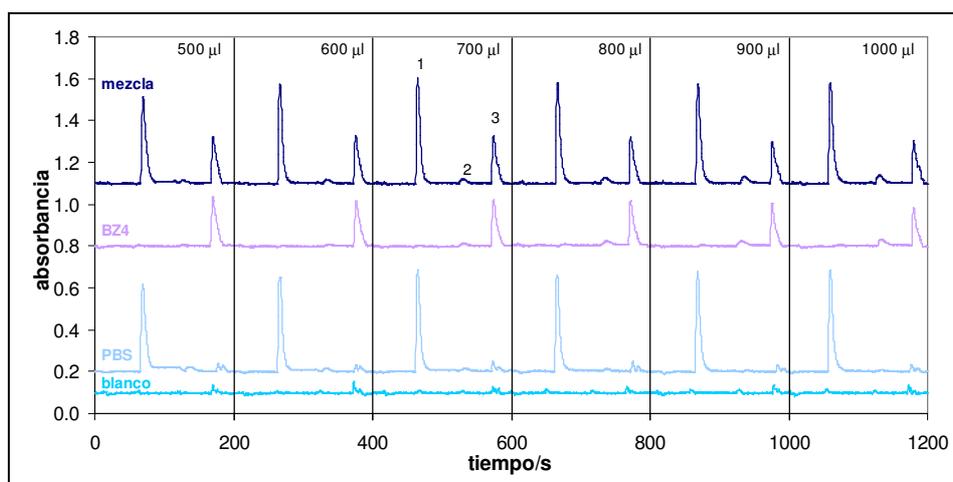


Fig. 4.4. Siagramas obtenidos empleando diferentes volúmenes de HCl 0.1 M en el primer lavado.

<sup>1</sup> primer lavado (volumen variable de HCl 0.1 M)

<sup>2</sup> segundo lavado (500  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M)

<sup>3</sup> tercer lavado (500  $\mu\text{l}$  de HCl 1.0 M)

PBS y BZ4 quedan retenidos al pasar a través de la microcolumna. El primer lavado permitió la separación completa de PBS utilizando un volumen de HCl 0.1 M superior a 800  $\mu\text{l}$ . El segundo lavado con HCl 0.1 M no permitió la elución total de BZ4, que precisó un tercer lavado empleando HCl 1.0 M.

#### 4.3.2.2. Estudio de la elución selectiva de BZ4:

Con el fin de conseguir la elución de BZ4 en un solo lavado, se realizaron las siguientes experiencias:

Tras fijar el volumen del primer lavado en 900  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M, se pasaron 500  $\mu\text{l}$  de HCl de diferente concentración (0.1-1.0 M) para estudiar el efecto de este segundo lavado sobre la elución de BZ4. En la figura 4.5 se muestran los siagramas obtenidos midiendo la absorbancia a 300 nm.

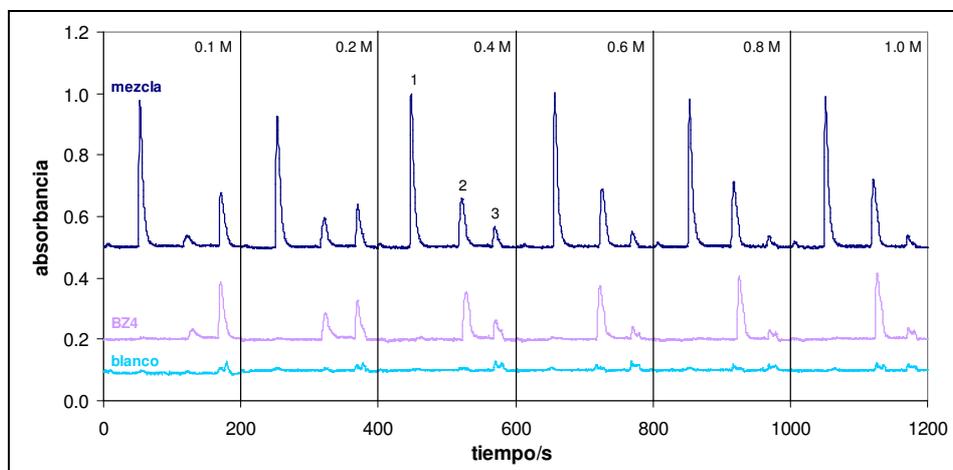


Fig. 4.5. Siagramas obtenidos empleando diferentes concentraciones de HCl en el segundo lavado.

<sup>1</sup> primer lavado (900  $\mu$ l de HCl 0.1 M)

<sup>2</sup> segundo lavado (500  $\mu$ l de HCl de concentración variable)

<sup>3</sup> tercer lavado (500  $\mu$ l de HCl 1.0 M)

Como puede observarse, al aumentar la concentración de HCl en el segundo lavado se produce un aumento de la cantidad de BZ4 eluida. Debido a ello se fijó la concentración de HCl en 1.0 M para llevar a cabo el segundo lavado, y se procedió a variar el volumen de HCl 1.0 M en este segundo lavado con el fin de asegurar la elución total de BZ4. En la figura siguiente se muestran los siagramas correspondientes a esta experiencia medidos a 300 nm.

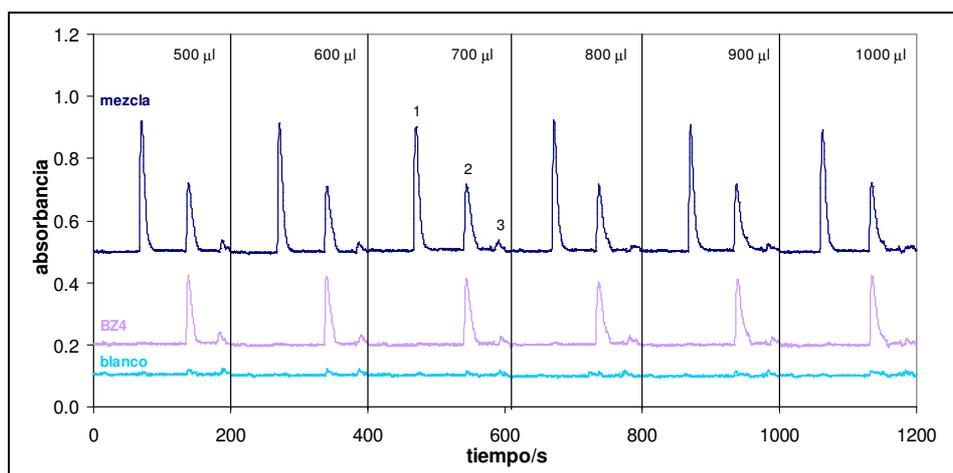


Fig. 4.6. Siagramas obtenidos empleando diferentes volúmenes de HCl 1.0 M en el segundo lavado.

<sup>1</sup> primer lavado (900  $\mu$ l de HCl 0.1 M)

<sup>2</sup> segundo lavado (HCl 1.0 M de volumen variable)

<sup>3</sup> tercer lavado (500  $\mu$ l de HCl 1.0 M)

Como puede observarse, no se produce ninguna variación en la señal de BZ4 correspondiente al segundo lavado al aumentar el volumen de lavado.

En la figura 4.7 se muestra una representación en la que se observa la señal de BZ4 obtenida al eluir con 500  $\mu\text{l}$  de HCl de concentración variable y el efecto que provoca la elución con volumen variable de una disolución de HCl 1.0 M.

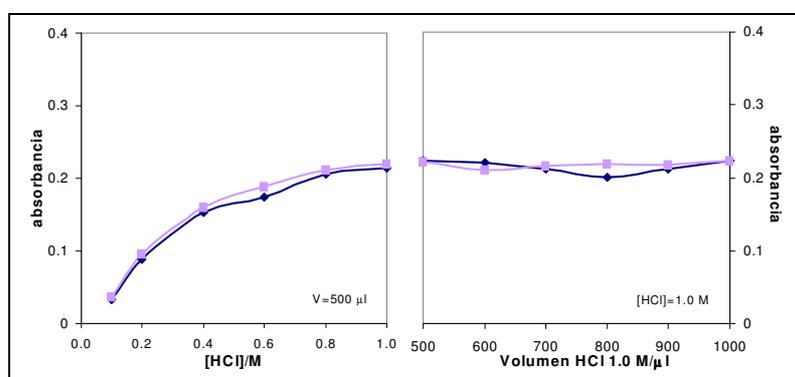


Fig. 4.7. Efecto de la concentración de HCl y del volumen en la elución de BZ4, tanto para la disolución de BZ4 ( $\blacklozenge$ ) como para la disolución mezcla ( $\blacksquare$ ).

Se puede asegurar que con 500  $\mu\text{l}$  de HCl 1.0 M se consigue la elución total de BZ4, por lo que no es necesario realizar el tercer lavado.

Por tanto, tras cargar la microcolumna con las disoluciones de interés se procede a un primer lavado con 900  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M para conseguir la elución de PBS, y posteriormente un segundo lavado con 500  $\mu\text{l}$  de HCl 1.0 M para conseguir la elución de BZ4.

#### 4.3.2.3. Tamponación en línea. Efecto del pH de retención:

Con el fin de aumentar el grado de automatización se realizaron estudios para efectuar la tamponación en línea. Para ello se preparó una disolución mezcla de PBS y BZ4 de 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente en tampón acetato 0.5 M pH=4 aspirándose 200  $\mu\text{l}$  por triplicado al interior del sistema SIA y eluyendo con las condiciones fijadas en el estudio anterior. De igual forma se aspiraron por triplicado 200  $\mu\text{l}$  de una

disolución mezcla de PBS y BZ4 de 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  preparada en agua, pero que se tamponó en línea aspirando 200  $\mu\text{l}$  de tampón, siguiendo tres secuencias diferentes y cuyos siagramas se muestran en la figura 4.8.

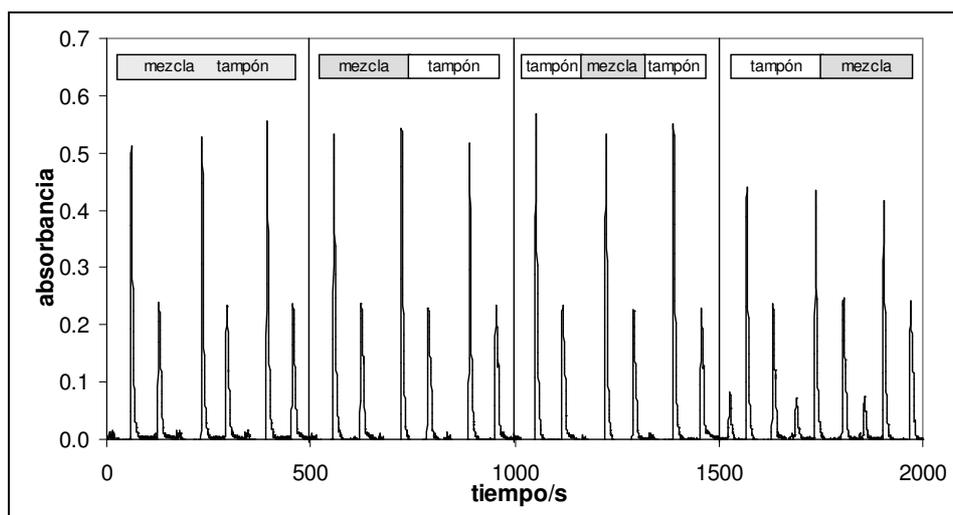


Fig. 4.8. Siagramas obtenidos empleando diferentes secuencias de introducción del bolo de muestra.

Como puede observarse, se produce el mismo comportamiento realizando la tamponación previa o en línea, a excepción de la secuencia en la que se aspira primero el tampón, que provoca pérdidas de PBS al cargar la microcolumna. Debido a ello cualquiera de las otras dos estrategias sería válida para efectuar la tamponación en línea, por lo se escogió la secuencia mezcla-tampón por ser más sencilla.

A continuación se estudió el pH de retención variando el pH del tampón. En la figura 4.9 se muestran los siagramas obtenidos.

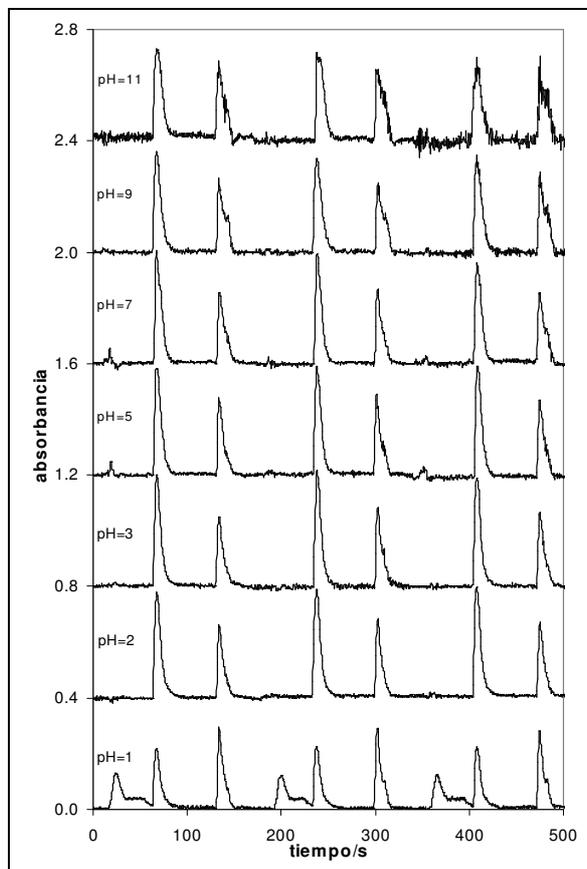


Fig. 4.9. Siagramas obtenidos a diferentes valores de pH.

Como puede observarse, al emplear  $\text{pH}=1$  se producen pérdidas de PBS al cargar la microcolumna. A partir de  $\text{pH}=2$  se evitan estas pérdidas de PBS, mientras que a  $\text{pH}$  superiores a 7 se obtienen picos más anchos, además de aumentar el ruido de fondo.

El comportamiento de BZ4 no se ve afectado por el valor del  $\text{pH}$ .

En la figura 4.10 se representan los valores de señal de PBS y BZ4 obtenidos tras su elución, donde se observa que al emplear  $\text{pH}=1$  la señal obtenida para PBS es menor. A partir de  $\text{pH}=2$  se alcanza un valor de la señal que se mantiene hasta  $\text{pH}=7$ , mientras que a  $\text{pH}$  superiores vuelve a disminuir.

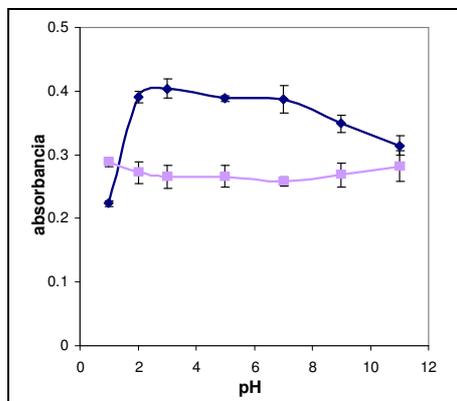


Fig. 4.10. Señal de PBS (♦) y BZ4 (■) obtenidas tras eluir, empleando diferentes valores del pH de retención.

Por todo ello se escogió un pH=3 para llevar a cabo el procedimiento de análisis.

***Procedimiento propuesto para la determinación simultánea de ácido fenilbencimidazol sulfónico y benzofenona-4 en aguas solares mediante espectrometría de absorción molecular (UV) empleando un sistema de inyección secuencial:***

Se pesa por triplicado entre 0.01-0.06 g y aforando a 25 ml con agua desionizada.

Se preparan disoluciones patrón de PBS (500 µg/ml) y BZ4 (400 µg/ml) en agua desionizada (para preparar la disolución de PBS es necesario añadir 2-3 gotas de NaOH al 10 %), y a partir de ellas disoluciones patrón multicomponente conteniendo PBS (10-50 µg/ml) y BZ4 (4-20 µg/ml) en agua desionizada.

A continuación se realiza el siguiente ciclo empleando el montaje indicado en la figura 4.11.

- 1) aspiración de 2900 µl de portador
- 2) aspiración de 200 µl de disolución mezcla patrón o muestra
- 3) aspiración de 200 µl de tampón acetato 0.5 M pH=3
- 4) propulsión de 1700 µl a través de la microcolumna (*carga de la microcolumna*)
- 5) aspiración de 900 µl de disolución de HCl 0.1 M
- 6) propulsión de 2500 µl de portador a través de la microcolumna (*elución de PBS*)
- 7) aspiración de 2000 µl de portador
- 8) aspiración de 500 µl de HCl 1.0 M
- 9) propulsión de 2500 µl de portador a través de la microcolumna (*elución de BZ4*)

(Esta secuencia se realiza por triplicado para cada una de las disoluciones patrón o muestra. A continuación se realiza una etapa de limpieza con la siguiente disolución a medir, aspirándose 100 µl por triplicado de la nueva disolución y propulsando 1000 µl por el tubo de desecho).

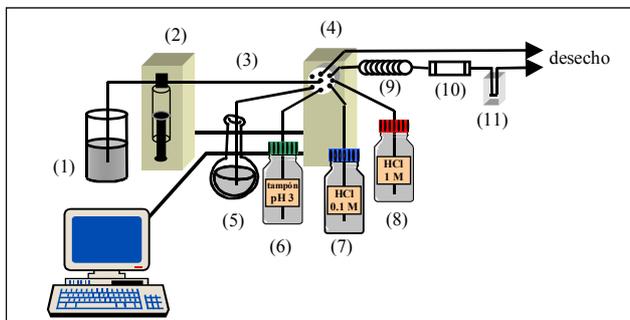


Fig. 4.11. Sistema SIA empleado. (1) Portador: agua, (2) bureta automática con jeringa de 5 ml, (3) tubo de almacenamiento (2 m), (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución acuosa de patrón o muestra, (6) disolución de tampón acetato 0.5 M pH=3, (7) disolución de HCl 0.1 M, (8) disolución de HCl 1.0 M, (9) tubo de mezclado (25 cm), (10) microcolumna con relleno SAX, (11) celda de flujo.

### Parámetros analíticos del método SIA propuesto:

#### i) Linealidad:

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 4.3, siendo **a** la ordenada en el origen y **b** la pendiente, (y **s<sub>a</sub>** y **s<sub>b</sub>** sus respectivas desviaciones estándar), **r<sup>2</sup>** el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado obtenidas.

Tabla 4.3. Parámetros de las rectas de calibrado obtenidas en la determinación de PBS y BZ4.

analito	$\lambda/\text{nm}^*$	Intervalo de trabajo	$a \pm s_a$	$b \pm s_b / (\text{ml}/\mu\text{g})$	$r^2$	N
PBS	300	10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{**}$	$0.01 \pm 0.03$	$0.042 \pm 0.001$	0.9990	5
BZ4	286	4-20 $\mu\text{g}/\text{ml}^{***}$	$0.030 \pm 0.003$	$0.0159 \pm 0.0003$	0.9992	5

\* corregida con el valor de 400 nm

\*\* lineal hasta 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$

\*\*\* lineal hasta 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$

#### ii) Sensibilidad:

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de las rectas de calibrado es del orden de  $10^{-2}$  ml/ $\mu\text{g}$  para la determinación de ambos analitos, si bien para PBS la sensibilidad es de casi tres veces superior a la de BZ4.

iii) *Límite de detección:*

El límite de detección instrumental para PBS, estimado como  $3 \cdot s_{y/x} / b$  donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y  $b$  la pendiente, es de 1.6  $\mu\text{g/ml}$ . Para BZ4 es de 0.6  $\mu\text{g/ml}$ .

iv) *Exactitud:*

Para contrastar la exactitud del método propuesto se realizaron varios ensayos.

En primer lugar se aplicó el método descrito a dos muestras sintéticas de aguas solares preparadas a escala de laboratorio (*muestras I y J*) siguiendo el protocolo de fabricación de dos empresas del sector (detallado en el *Anexo 4.1* de este capítulo), de modo que la cantidad exacta de cada uno de los analitos presente en las muestras era conocida. En la tabla 4.4 se muestran los resultados obtenidos, siendo  $C$  la concentración hallada y  $\mu$  la concentración real.

Tabla 4.4. Comparación de los valores obtenidos en el análisis de dos muestras sintéticas con los valores reales.

Muestra	PBS		BZ4	
	C $\pm$ s/%	$\mu$ /%	C $\pm$ s/%	$\mu$ /%
I	1.94 $\pm$ 0.01	1.99	0.77 $\pm$ 0.01	0.70
J	5.4 $\pm$ 0.2	5.39	2.23 $\pm$ 0.05	2.26

Como puede observarse, se obtienen resultados concordantes con los reales.

A continuación se aplicó el método propuesto al análisis de 8 muestras comerciales. En un primer ensayo se prepararon calibrados de adición estándar de cada uno de los analitos en cada una de las muestras en las que se encontraba presente, y las pendientes obtenidas se compararon con las de los calibrados normales, obteniéndose el coeficiente de recuperación ( $R$ ) como:

$$\%R = (b_{a.e.} / b) \cdot 100$$

siendo  $b_{a.e.}$  la pendiente obtenida en el calibrado de adición estándar y  $b$  la pendiente del calibrado normal.

Los resultados para cada uno de los analitos y muestra, se indican en la siguiente tabla.

Tabla 4.5. Coeficientes de recuperación obtenidos aplicando el método propuesto.

Muestra	% R	
	PBS	BZ4
A	102±2	111±6
B	98±1	110±6
C	99±1	109±6
D	93±1	103±6
E	98±3	107±6
F	-	110±6
G	102±1	-
H	102±2	-

Como puede observarse los valores oscilan entre 93-102 % para PBS y entre 103-111 % para BZ4, lo que indica la inexistencia de errores proporcionales a la concentración de los analitos ocasionados por la matriz de las muestras.

Finalmente se determinó la concentración presente de los analitos en las muestras comerciales, y los resultados se compararon mediante un modelo de regresión lineal aplicándose el contraste de *t de Student* (Apéndice II) con los obtenidos por el método de referencia (descrito en el apartado 4.2). Los resultados se muestran en la tabla 4.6 y en las figuras 4.12 y 4.13, donde **C** es la concentración media obtenida aplicando el método propuesto, **s** es la desviación estándar de los resultados, **C<sub>ref</sub>** es la concentración media obtenida por el método de referencia y **s<sub>ref</sub>** la desviación estándar de estos resultados.

Tabla 4.6. Resultados obtenidos en el análisis de muestras reales por el método propuesto y por el método de referencia.

Muestra	PBS		BZ4	
	C±s/%	C <sub>ref</sub> ±s <sub>ref</sub> /%	C±s/%	C <sub>ref</sub> ±s <sub>ref</sub> /%
A	1.50±0.02	1.62±0.02	0.53±0.02	0.55±0.01
B	2.94±0.04	3.20±0.03	1.22±0.02	1.10±0.01
C	4.3±0.2	4.25±0.02	1.6±0.2	1.59±0.01
D	3.1±0.2	3.32±0.03	1.2±0.1	1.10±0.01
E	5.1±0.1	5.30±0.04	1.82±0.04	1.71±0.02
F	N.D.*	N.D.	0.51±0.01	0.53±0.01
G	0.44±0.02	0.43±0.01	N.D.	N.D.
H	0.85±0.01	0.91±0.02	N.D.	N.D.

\* No detectable

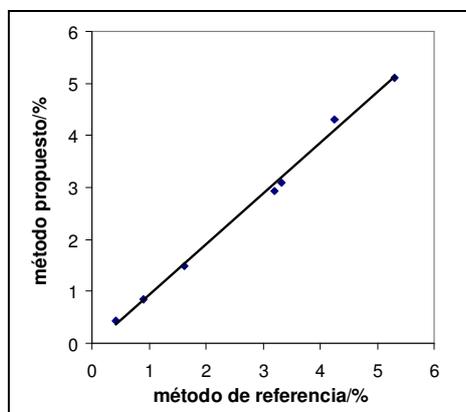


Fig. 4.12. Comparación de los resultados para la determinación de PBS.

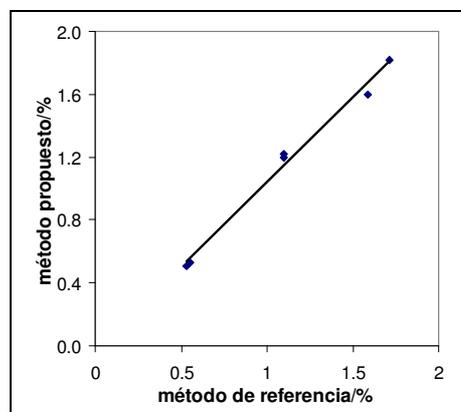


Fig. 4.13. Comparación de los resultados para la determinación de BZ4

El resultado del ajuste fue:

$$C = (-0.05 \pm 0.08) + (0.98 \pm 0.03) \cdot C_{\text{ref}}; \quad r^2 = 0.996; \quad N = 7 \text{ para PBS}$$

$$C = (-0.03 \pm 0.07) + (1.07 \pm 0.06) \cdot C_{\text{ref}}; \quad r^2 = 0.990; \quad N = 6 \text{ para BZ4}$$

El valor de  $(t_{\text{cal}})_a$  fue de 0.53 y 0.52, mientras que el de  $(t_{\text{cal}})_b$  fue de 0.90 y 0.14 para PBS y BZ4 respectivamente. Teniendo en cuenta que el valor crítico del parámetro de *t de Student* para un nivel de significación de 5 % y  $N-2=5$  grados de libertad es 2.57 y para  $N-2=4$  grados de libertad es 2.78, se observa que no existen diferencias a un nivel de significación de 5 %.

#### v) Precisión:

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto oscilan entre 1-6 % para la determinación de PBS y entre 1-12 % para la determinación de BZ4.

#### vi) Velocidad de muestreo:

El tiempo requerido para llevar a cabo una secuencia completa en la que se carga la microcolumna, y se eluyen selectivamente los dos analitos es de 180 s, por lo que si se realiza por triplicado supone una velocidad de 7 muestras/h, realizándose todo el proceso de tratamiento de la muestra en línea.

#### **4.4. CONCLUSIONES**

La determinación simultánea de ácido fenilbencimidazol sulfónico y de benzofenona-4 puede llevarse a cabo en línea mediante el uso de un sistema de inyección secuencial, que permite realizar la extracción en fase sólida necesaria para la determinación selectiva de ambos analitos.

El método propuesto es preciso y exacto, no presentando interferencias de otros compuestos presentes en la matriz de las muestras, y la sensibilidad y límite de detección son adecuados para el contenido de ambos analitos presentes en las muestras.

El sistema de inyección secuencial utilizado permite un alto grado de automatización de todo el proceso de análisis mediante la programación de la secuencia deseada con un sencillo programa informático.

**ANEXO 4.1: Elaboración de aguas solares según el protocolo de empresas del sector cosmético.**

Se elaboraron a escala de laboratorio dos muestras de aguas solares siguiendo el protocolo de fabricación que emplean dos empresas del sector, de forma que en la composición final se encontrasen los dos filtros UV estudiados en una concentración dentro de los intervalos permitidos por la legislación vigente. A continuación se detalla la composición y el modo de preparación.

**Componentes:** *Agua* (es el constituyente principal de la matriz) , *Polisorbato-80* (se trata de un emulgente no iónico sintético), *Perfume* (su función es la proporcionar un olor agradable), *Kathon* (disolución acuosa de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, cuya función es la de conservante), *Dimeticona copoliol* (mezcla de polímeros entre los que se encuentra la dimetilsilicona y dimetilsiloxano, cuya misión es la de proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto, además de actuar como vehículo de componentes activos), *Aloe vera* (actúa como nutriente de la piel), *Acelerador del bronceado* (preparado rico en tirosina y riboflavina que favorece el proceso de formación de melanina en la piel), *PEG-7 Gliceril cocoato* (actúa como vehículo para la solución de aceites y principios activos liposolubles), *EDTA* (su función es la de capturar iones libres que puedan estar presentes para evitar así la formación de complejos coloreados), *Glicerina* (proporciona suavidad y una película protectora sobre la piel).

*Nota: estos componentes fueron proporcionados por las propias empresas para la elaboración de las aguas solares.*

**MUESTRA SINTÉTICA I:**

**Protocolo de fabricación de la empresa Berioska S.L.**

Fase A)	Polisorbato-80 .....	2 %
	Perfume .....	0.2 %
	Agua .....	20 %
Fase B)	Kathon .....	0.2 %
	Dimeticona copoliol .....	0.5 %
	Aloe vera. ....	0.2 %
	Acelerador del bronceado .....	1 %
	PEG-7 Gliceril cocoato .....	2 %
	Disolución de EDTA % .....	0.2 %
	Glicerina .....	5 %
	Agua c.s.p.....	100 %

Fase C)	Ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS).....	2 %
	Benzofenona-4 (BZ4) .....	0.7 %
	Agua .....	20 %
	Trietanolamina.....	c.s.p.

#### **Elaboración del agua solar:**

- 1) Preparar la fase A en vaso de precipitados, agitando fuertemente cuando se mezclan los dos componentes oleosos con el agua.
- 2) Preparar la fase B en vaso de precipitados.
- 3) Preparar la fase C en un vial de la siguiente forma: se pesan los dos filtros y se añade el agua, y se adiciona la trietanolamina necesaria para la disolución total de los filtros.
- 4) Añadir la fase A y B sobre la C.
- 5) Comprobar que pH está entre 7-7.5, y de no ser así ajustar con trietanolamina.

#### **MUESTRA SINTÉTICA J:**

##### **Protocolo de fabricación de la empresa RNB S.L.**

Fase A)	Kathon .....	0.1 %
	Dimeticona copoliol .....	0.75 %
	EDTA sal disódica .....	0.1 %
	Glicerina .....	0.75 %
	Agua c.s.p.....	100 %
Fase B)	Ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS).....	5.5 %
	Benzofenona-4 (BZ4) .....	2 %
	Agua .....	25 %
	Disolución de NaOH al 10 %.....	c.s.p.
Fase C)	Acelerador del bronceado .....	0.25 %
Fase D)	Polisorbato-80 .....	0.5 %
	Perfume .....	0.1 %

#### **Elaboración del agua solar:**

- 1) Preparar la fase A y D en vaso de precipitados.
- 2) Preparar la fase B en vaso de precipitados, de forma que se añada disolución de NaOH al 10 % hasta la completa disolución de los filtros.
- 3) Mezclar las fases A, C y D, y adicionar sobre la B.
- 4) Ajustar pH entre 7-7.5 con disolución de NaOH al 10 %.

## CAPÍTULO 5

### **DETERMINACIÓN DE OCTIL DIMETIL PABA MEDIANTE QUIMIOLUMINIMETRÍA EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO CONTINUO**

Parte del contenido de este Capítulo ha sido publicado en *Anal Chim Acta* (2002) 462:209-215, y presentado como cartel en el *X International Symposium on Luminescence Spectrometry*, Granada, 2002.



## 5.1. INTRODUCCIÓN

### 5.1.1. Interés de la determinación de octil dimetil PABA en productos cosméticos para la protección solar:

El octil dimetil PABA (ODP), es un filtro UV que tiene un elevado poder absorbente en la zona UVB como puede observarse de su espectro de absorción mostrado en la figura 5.1.

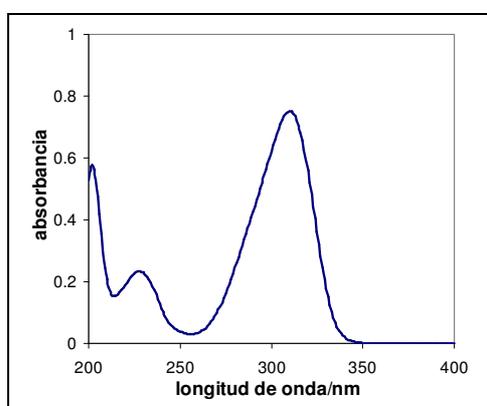


Fig. 5.1. Espectro UV de una disolución de 7 µg/ml de ODP en etanol.

Se han descrito algunos problemas dermatológicos ocasionados por formulaciones que contienen este filtro UV (*Schauder e Ippen, 1997; Ricci et al., 1997*). De acuerdo con la legislación europea (*tabla 1.2, Capítulo 1 de esta memoria*) y estadounidense (*FDA, 1999*), ODP puede ser usado en formulaciones cosméticas para la protección solar en un 8 % como máximo, mientras que la legislación japonesa (*Japanese SCI, 1985*) autoriza hasta un 10 %.

Por ello es necesario desarrollar métodos analíticos adecuados para su control.

En el presente capítulo se pretende poner a punto un método analítico para su determinación en productos cosméticos para la protección solar mediante quimioluminimetría.

### **5.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:**

La determinación cuantitativa de ODP en muestras de cosméticos, se ha realizado principalmente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (*Tan et al., 1984; Gagliardi et al., 1987; Oshima y Saito, 1987; Gagliardi et al., 1989; Ikeda et al., 1989; DiNunzio y Gadde, 1990; Hild, 1993; Schneider et al., 1996; Yao et al., 1998; Scalia, 2000; Wang y Cheng, 2000; Li et al., 2000; Masse y Herpol-Borremans, 2001; Rastogi, 2002*), si bien se han encontrado artículos en la bibliografía en los que ODP ha sido determinado empleando técnicas como la cromatografía de gases (GC) (*Cumpelik, 1982; Ikeda et al., 1990*), cromatografía líquida micelar (MLC) (*Tomasella et al., 1991*), cromatografía en capa fina (TLC) (*Mussial y Sherma, 1997*), cromatografía micelar electrocinética (MECK) (*Wang y Cheng, 2000*) y resonancia magnética nuclear (NMR) (*Mon et al., 1997*).

### **5.1.3. Justificación del objetivo del trabajo:**

En el presente capítulo se pretende poner a punto un método analítico, exacto y rápido, para la determinación de ODP en productos solares comerciales que permita el control de la composición de estos productos.

El método que se propone se basa en la capacidad de ODP de proporcionar quimioluminiscencia cuando es oxidado por permanganato potásico en medio ácido. *Zhang et al. (1995)* demostraron que el grupo amino que poseen los ésteres del ácido p-aminobenzoico y otros compuestos produce quimioluminiscencia al ser oxidado por el permanganato. El permanganato potásico, de hecho se ha utilizado ampliamente como agente oxidante en determinaciones quimioluminimétricas. Su gran aplicabilidad en quimioluminiscencia (*Hindson y Barnett, 2001*), y mecanismo que provoca la emisión de luz (*Barnett et al., 2002*) han sido descritos recientemente.

La quimioluminiscencia ha sido utilizada en multitud de aplicaciones, especialmente empleando sistemas FIA que permiten la rápida y precisa monitorización de la quimioluminiscencia generada por un determinado analito en una reacción (*Townshend 1985; Townshend, 1990; Garcia-Campaña y Baeyens, 2000; Campins-Falcó et al., 2001*). En los últimos años se han publicado diferentes artículos en los que se describen las ventajas de la quimioluminimetría como técnica de detección acoplada con sistemas FIA (*Bowie et al., 1996; Baeyens et al., 1998; Fletcher et al., 2001; Garcia-Campaña y Baeyens, 2000*).

En las bases de datos bibliográficas consultadas durante la realización de este trabajo, no se encontró ningún antecedente de la determinación de ODP ni de ningún otro filtro UV mediante el uso de técnicas luminiscentes.

El método se ha automatizado empleando un sistema de inyección en flujo continuo (FIA).

## **5.2. MÉTODO DE REFERENCIA: DETERMINACIÓN DE OCTIL DIMETIL PABA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

Como se ha resaltado en varias ocasiones a lo largo de esta memoria, no existen métodos analíticos oficiales para la determinación de ODP ni de ningún otro filtro UV que puedan emplearse como métodos de referencia, por lo que en este caso se empleó un método desarrollado con anterioridad a la realización de este trabajo. El método se basa en la disolución de las muestras en etanol y su posterior análisis mediante HPLC, según se describe en la *Tercera Parte, Capítulo 6*, de esta memoria.

Las dos muestras comerciales analizadas fueron Leche Solar Nievina de FPS 8 (*muestra A*) y FPS 16 (*muestra B*), de Laboratorios Vigmar (Valencia).

Otras dos muestras (*muestras C y D*) se prepararon en el laboratorio de acuerdo con el protocolo facilitado por Guinama S.L. (Valencia), tal y como se detalla en el *Anexo 5.1* de este capítulo.

Los resultados de la determinación, como media de tres réplicas ( $C_{ref}$ ), y su desviación estándar se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Concentración de ODP en las muestras analizadas por el método de referencia.

Muestra	$C_{ref} \pm S_{ref} / \% (m/m)$
A	2.23±0.02
B	3.50±0.01
C	4.10±0.04
D	4.23±0.02

Estos resultados se toman como referencia y se utilizarán posteriormente para compararlos con el método propuesto, con el fin de evaluar su exactitud.

### **5.3. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE OCTIL DIMETIL PABA MEDIANTE QUIMIOLUMINIMETRÍA EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO CONTÍNUO**<sup>\*</sup>

#### **5.3.1. Método propuesto. Parte experimental:**

##### **5.3.1.1. Instrumentación:**

Se utilizó una bomba peristáltica marca Gilson<sup>®</sup> modelo Minipuls-2, una válvula de seis vías marca Rheodyne y tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno para construir un montaje FIA bicanal.

El detector de quimioluminiscencia se fabricó en los laboratorios de Universidad de Hull (Reino Unido), y consistía en una pieza en forma de T donde confluían los dos canales del sistema FIA acoplada a una celda de vidrio en forma de espiral situada delante de un fotomultiplicador modelo 9789QB (Electron Tubes Ltd., Ruislip, London), todo ello dentro de una carcasa sellada para evitar la entrada de luz.

##### **5.3.1.2. Reactivos y muestras:**

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: permanganato potásico 99 %, ácido sulfúrico 98 % d=1.84 g/ml, ácido acético glacial, ácido clorhídrico 37 % d=1.18 g/ml, ácido nítrico 70 % d=1.42 g/ml, ácido ortofosfórico, ácido fórmico 90 %, peróxido de hidrógeno 100 vol. y etanol absoluto (EtOH) de Fisher Chemicals (Leicester, Reino Unido), hexanitratocerato (IV) amónico > 99 %, sulfato de hierro (II) heptahidrato > 99.5 %, ácido etilendiaminotetracético sal disódica dihidrato (EDTA) > 99.5 %, nitrato de cobre (II) trihidrato, sulfato de níquel (II) heptahidrato > 99 %, cloruro de manganeso (II) tetrahidrato > 98 % y cloruro de cromo (III) > 95 % de BDH (Poole, Reino Unido), iodato potásico 98 %, persulfato potásico 98 %, hexacianoferrato (III) potásico > 98 %, sodio n-dodecil sulfato (SDS) 99 % y Triton X-100 de Lancaster (Eastgate, Reino Unido), ácido perclórico 70 % de FSA (Loughborough, Reino Unido), rodamina-B P.M.=479.05 g/mol, glutaraldehído d=1.06 g/mol y 8-hidroxiquinolina de Aldrich (Dorset, Reino Unido), rodamina-6G de Sigma (St. Louis, EEUU), formaldehído 35 % d=1.08 g/ml de Prolabo (Fontenay, Francia), sulfato de cobalto (II) de Fisons (Loughborough, Reino Unido), Tween 80 y cloruro de hexadeciltrimetilamonio (HTAC) 25 % en agua de Fluka Chemika (Buchs, Suiza).

---

<sup>\*</sup> El desarrollo de este método fue realizado en la Universidad de Hull durante una estancia bajo la dirección del Prof. A. Townshend.

Octil dimetil PABA (ODP) 100±2 % de Roig Farma, S.A. (Terrassa, Barcelona) se empleó como patrón.

Las muestras de protectores solares fueron las descritas en el *apartado 5.2.* de este capítulo.

### **5.3.1.3. Metodología de trabajo:**

La metodología seguida en la realización del presente capítulo fue la siguiente:

En primer lugar se realizaron estudios previos con el fin de seleccionar el oxidante y el medio más adecuado para conseguir la oxidación y posterior quimioluminiscencia de ODP. A continuación se seleccionaron las concentraciones de oxidante y de ácido.

Posteriormente se estudiaron los parámetros propios de los métodos automatizados.

Finalmente se estudiaron estrategias para aumentar la sensibilidad mediante uso de sensibilizadores, tensioactivos e iones metálicos.

También se realizó un estudio para evaluar la selectividad del método frente a otros filtros UV que pudieran estar presentes en las formulaciones cosméticas que contienen ODP.

Una vez puesto a punto el método, se determinó el contenido de ODP en dos muestras comerciales y dos muestras sintéticas preparadas en el laboratorio. Finalmente se compararon los resultados con los obtenidos por el método de referencia descrito con anterioridad.

En el *apartado 5.3.2* se detallan todos los estudios realizados y los resultados obtenidos en cada uno de ellos, así como el procedimiento propuesto y sus parámetros analíticos de interés.

### **5.3.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:**

#### **5.3.2.1. Estudio del oxidante y del medio en el que se realiza la reacción de oxidación:**

Se probaron diferentes oxidantes comunes con el fin de escoger el más adecuado para llevar a cabo la oxidación y posterior quimioluminiscencia de ODP. Para ello se empleó un montaje en flujo

continuo bicanal. Por uno de los canales circulaba una disolución de ODP de 100  $\mu\text{g/ml}$  en EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) (2 ml/min) y por el otro la disolución acuosa del oxidante en diferentes medios (2 ml/min). En la siguiente tabla se muestran los oxidantes y los medios en los que se encontraban, así como su concentración.

Tabla 5.2. Oxidantes y medios estudiados.

Oxidante	Medio <sup>a</sup>
KMnO <sub>4</sub> 5.10 <sup>-5</sup> M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.05 M
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.01 M	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.01 M	NaOH 0.1 M
Ce(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> 0.01 M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.05 M
KIO <sub>4</sub> 0.01 M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1 M
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 0.01 M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1 M
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 0.01 M	NaOH 0.1 M
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.01 M	Fe(II) 0.001 M <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.01 M	Fe(II) 0.001 M/EDTA 0.001 M <sup>b</sup>

<sup>a</sup> en todos los casos se trata de disolución acuosa

<sup>b</sup> mezclado con el oxidante en línea

Tan sólo se observó quimioluminiscencia cuando se empleaba KMnO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

A continuación se estudió la concentración de permanganato (entre 6.4.10<sup>-5</sup>-5.10<sup>-4</sup> M) en ácido sulfúrico 1 M. Para ello se inyectaron por triplicado 200  $\mu\text{l}$  de una disolución de ODP de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  en EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) empleando un sistema de inyección en flujo continuo bicanal por el que circulaba EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) (2 ml/min) hasta confluir con la disolución de oxidante (2 ml/min). La potencia del fotomultiplicador utilizada fue 0.4 kV. Los resultados se muestran en la figura 5.2.

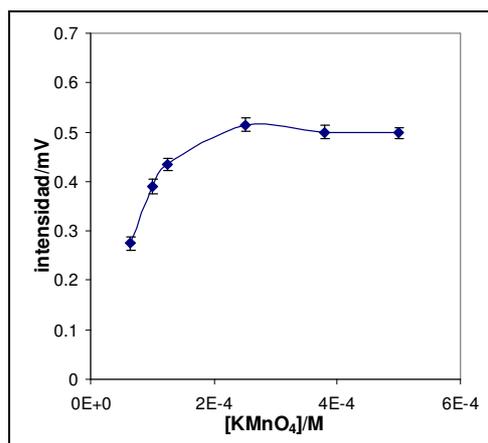


Fig. 5.2. Efecto de la concentración de permanganato sobre la señal de quimioluminiscencia de ODP.

Como se observa, la señal aumenta al aumentar la concentración de permanganato hasta  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M, disminuyendo ligeramente a concentraciones superiores. Se seleccionó  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M para posteriores estudios.

De la misma forma se estudió la concentración de ácido sulfúrico entre 0.25-3.0 M tal y como se muestra en la figura 5.3.

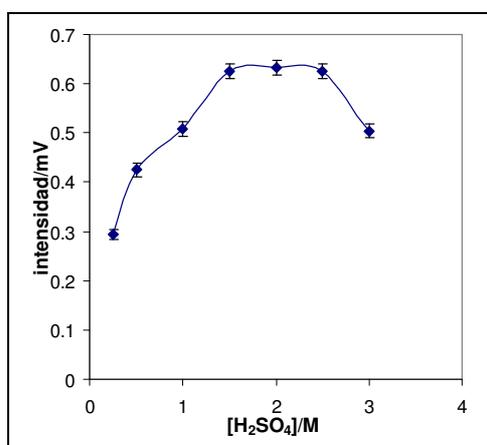


Fig. 5.3. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la señal de quimioluminiscencia de ODP.

La máxima sensibilidad se obtiene en el intervalo 1.5-2.5 M, por lo que se seleccionó una concentración de ácido sulfúrico 2.0 M.

Con el fin de aumentar la sensibilidad, se estudiaron diferentes ácidos en concentraciones 1 y 2 M. Los ácidos fórmico, clorhídrico y acético no resultaron adecuados porque eran oxidados por el permanganato. El ácido nítrico y el perclórico disminuían la señal comparados con el ácido sulfúrico, y con el ácido ortofosfórico se obtenía el mismo comportamiento que con el ácido sulfúrico.

### 5.3.2.2. Estudio de las variables instrumentales:

En un primer ensayo se estudió la influencia del caudal sobre la señal de quimioluminiscencia de ODP. Se ensayaron caudales totales entre 2-8 ml/min (1-4 ml/min por cada canal). Como puede observarse en la figura 5.4, la señal aumenta con el caudal, por lo que se seleccionó un caudal de 8 ml/min que era el valor máximo posible de acuerdo con la configuración del sistema.

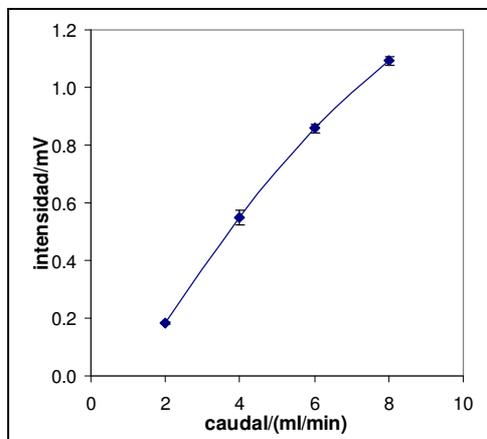


Fig. 5.4. Efecto del caudal sobre la señal de ODP obtenida.

De igual forma se estudió el volumen de disolución de muestra inyectado entre 50-500  $\mu\text{l}$ . Como se observa en la figura 5.5 la señal aumenta con el volumen de muestra inyectado hasta 400  $\mu\text{l}$ , y por encima de este valor permanece prácticamente constante. Por tanto, se escogió 400  $\mu\text{l}$  como el volumen de disolución de muestra a inyectar.

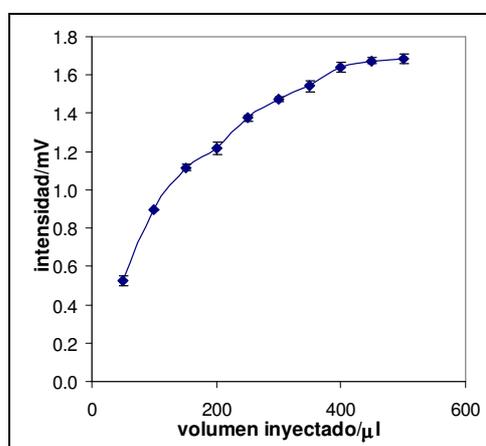


Fig. 5.5. Efecto del volumen de muestra inyectado sobre la señal de ODP obtenida.

### 5.3.2.3. Estudio de la influencia de sensibilizadores, iones metálicos y tensioactivos:

Se estudió la influencia que podían tener algunos compuestos sobre la quimioluminiscencia de ODP. Para ello se disolvió cada uno de ellos

en el portador EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) y se vio el efecto que tenían sobre la señal de una disolución de ODP de 2.5 µg/ml (10<sup>-5</sup> M). Los compuestos estudiados fueron: ácido fórmico (0.1-5.0 M), formaldehído (0.1-5.0 M), glutaraldehído (0.01-1.00 M), rodamina-B (10<sup>-6</sup>-10<sup>-5</sup> M), rodamina-B en ácido fórmico 1.0 M (10<sup>-6</sup>-10<sup>-5</sup> M), 8-hidroxiquinolina (10<sup>-6</sup>-10<sup>-4</sup> M) y rodamina-6G (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M). Todos ellos disminuyeron la señal de ODP, posiblemente debido al consumo parcial del oxidante sin provocar quimioluminiscencia estimulada por los compuestos estudiados.

De igual forma se estudió la influencia de algunos iones metálicos que podrían actuar como catalizadores de la reacción de oxidación y provocar un aumento de la quimioluminiscencia generada. Así se estudiaron Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Cr<sup>3+</sup> en concentración 10<sup>-3</sup> M. Ninguno de ellos generó un cambio significativo en la señal excepto el Mn<sup>2+</sup>, provocando una disminución del 80 %.

El efecto de diferentes tensioactivos fue también estudiado, disolviendo el tensioactivo en estudio en el portador en concentraciones 1, 2.5 y 5 %. Los tensioactivos estudiados fueron: SDS, Triton X-100, Tween 80 y HTAC. Los tres primeros disminuyeron la señal en ≈13, 40 y 100 % respectivamente, y el último causó un incremento en la sensibilidad de sólo un 12 % que no fue considerado relevante para el tipo de muestra a analizar.

#### **5.3.2.4. Estudio de la potencia del fotomultiplicador:**

Se observó que esta variable ejercía una gran influencia en el aumento de la señal, ya que se conseguía aumentar la sensibilidad del detector. Se estudiaron valores entre 0.4-0.7 kV (máx. recomendado por el fabricante), inyectando 10 veces una disolución de 0.2 µg/ml de ODP y una disolución blanco. Como se muestra en la figura 5.6, tanto la señal analítica como el ruido se incrementaba con la potencia, pero la relación señal/ruido alcanzaba un máximo a 0.6 kV, seleccionándose dicho valor.

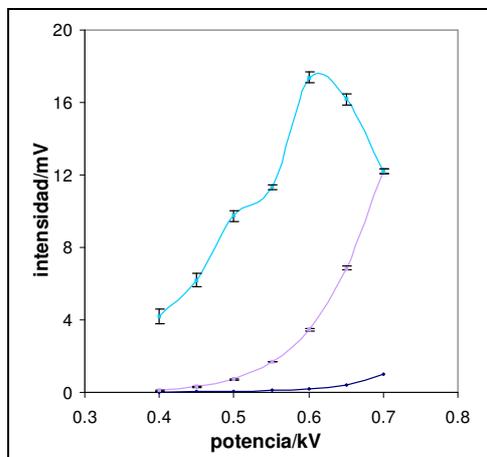


Fig. 5.6. Efecto de la potencia del fotomultiplicador. (—) ruido, (—) disolución de ODP de 0.2 µg/ml, (—) relación señal/ruido.

### 5.3.2.5. Efecto de la desgasificación:

Con la finalidad de evitar las burbujas de aire en el interior del sistema y por tanto aumentar la repetibilidad de la señal, tanto la disolución de portador como la de oxidante fueron desgasificadas. Para ello se emplearon dos sistemas de desgasificación: baño de ultrasonidos o burbujeo de nitrógeno.

Al emplear ultrasonidos se observó un aumento de la señal de fondo, mientras que si se empleaba nitrógeno no se observaba ninguna anomalía. Este fenómeno fue investigado con mayor profundidad y se observó que ocurría cuando se desgasificaba con ultrasonidos la disolución de portador EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v). *Makino et al. (1983)*, demostraron la formación de radicales hidrógeno e hidroxilo procedentes de la descomposición térmica del agua causada por los ultrasonidos, y posteriormente demostraron la formación de radicales procedentes del etanol en mezclas de etanol-agua causados por la abstracción del hidrógeno de las moléculas de etanol (*Murali-Krishna et al., 1989*). Más tarde *Mizukoshi et al. (1999)*, demostraron que al aplicar ultrasonidos a alcoholes se genera hidrógeno, metano, etileno, monóxido de carbono y varios compuestos aldehídicos.

Se estudió el efecto del tiempo de sonicación de la disolución de portador. En la figura 5.7 se muestra esta experiencia.

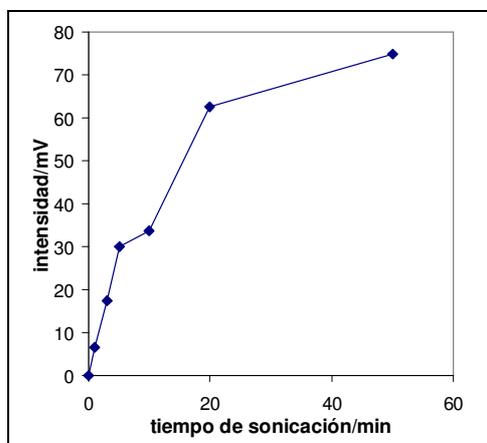


Fig. 5.7. Efecto del tiempo de sonicación sobre la señal de fondo.

Como puede observarse, la señal aumenta al aumentar el tiempo de sonicación, lo que sugiere la formación de compuestos que generan quimioluminiscencia, y que el rendimiento de la reacción de formación aumenta también con el tiempo de sonicación.

Con el fin de estudiar si estos posibles compuestos formados eran estables, se estudió el efecto del tiempo transcurrido desde la sonicación sobre la señal de fondo. Para ello se sometió la disolución de EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) a 2 min. de ultrasonidos y se midió la señal a diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la figura 5.8.

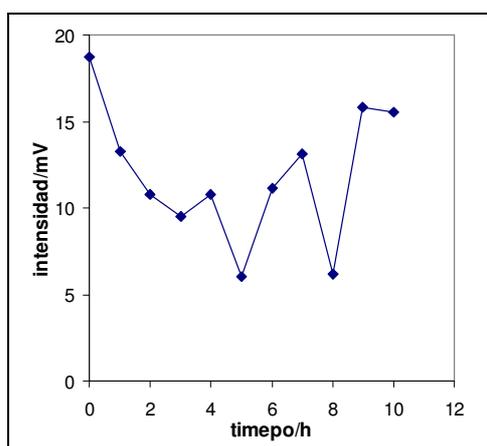


Fig. 8. Evolución con el tiempo de la señal de fondo empleando como portador una disolución de EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) sometida a 2 min de sonicación.

Como puede observarse, la señal no parece seguir ninguna tendencia, sino más bien un comportamiento fluctuante, lo que sugiere que los compuestos formados son estables 10 h como mínimo.

Como resumen, se puede concluir que los ultrasonidos inducen la formación de compuestos quimioluminiscentes en la disolución de portador. La concentración generada aumenta cuando el tiempo de sonicación es mayor, y son estables al menos durante 10 h. Por todo ello, se decidió emplear nitrógeno en lugar de ultrasonidos para desgasificar las disoluciones y así evitar burbujas en el interior del sistema FIA, evitando fluctuaciones y aumentando la repetibilidad.

Finalmente se volvieron a ensayar diferentes caudales con el fin de asegurar una buena repetibilidad, sensibilidad y frecuencia de muestreo, así como una línea base constante. Finalmente se seleccionó un caudal de 6 ml/min para llevar a cabo el análisis de muestras solares comerciales.

#### 5.3.2.6. Estudio de interferentes:

Con el fin de asegurar la selectividad del método en la determinación de ODP, se estudió la influencia que otros filtros UV autorizados a nivel internacional, y que podrían estar mezclados con ODP en las formulaciones cosméticas, podía tener sobre la determinación de ODP.

En la tabla 5.3 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la tolerancia del método respecto a la presencia de compuestos potencialmente interferentes. Los valores de tolerancia se obtuvieron en base a la relación interferente/ODP (m/m) necesaria para que la señal analítica de una disolución de 1 µg/ml de ODP se modificase un 5 %.

Tabla 5.3. Tolerancia del método de determinación de ODP respecto a diferentes compuestos potencialmente interferentes.

Compuesto	Tolerancia
Benzofenona-3 (BZ3)	2
Octil metoxicinamato (OMC)	15
Homosalato (HS)	15
Octil salicilato (OS)	15
Butil metoxidibenzoilmetano (BDM)	20
Benzofenona-4 (BZ4)	>30

Teniendo en cuenta la tolerancia y la composición real de las muestras, se puede concluir que no son de esperar interferencias importantes en la determinación de ODP en muestras reales.

***Procedimiento propuesto para la determinación de octil dimetil PABA en productos cosméticos para la protección solar mediante quimioluminimetría empleando un sistema de inyección en flujo continuo:***

Se pesan, por triplicado, entre 0.05-0.10 g de muestra y se disuelven en EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v), previamente desgasificado burbujando nitrógeno, aforando a 25 ml con la misma disolución. Se toma 1 ml (previamente filtrado con papel Whatman 42 si fuera necesario para eliminar componentes de la matriz no solubles) y se diluye a 25 ml con la misma disolución EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v).

Las disoluciones patrón de ODP (2-10 µg/ml) se preparan del mismo modo.

Empleando el montaje descrito en la figura 5.9 se inyectan por quintuplicado 400 µl tanto de disoluciones patrón como muestra con un caudal total de 6 ml/min, trabajando con una potencia del fotomultiplicador de 0.6 kV.

Se puede emplear tanto una ecuación cuadrática como logarítmica para llevar a cabo la construcción de la curva de calibrado y posterior cuantificación de ODP.

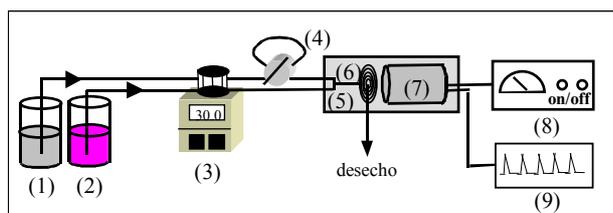


Fig. 5.9. Montaje FIA bicanal empleado: (1) Portador: disolución de EtOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v), (2) disolución de KMnO<sub>4</sub> 2.5.10<sup>-4</sup> M en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 M, (3) bomba peristáltica, (4) válvula de inyección de seis vías con bucle de inyección de 400 µl, (5) pieza en forma de T, (6) celda de vidrio en forma de espiral, (7) fotomultiplicador, (8) fuente de alimentación del fotomultiplicador, (9) registrador.

**Parámetros analíticos del método FIA propuesto:****i) Calibración:**

Al igual que con muchos de los métodos basados en detección quimioluminimétrica, el calibrado no es lineal para este sistema, y la tendencia está mejor descrita por una ecuación de segundo grado o bien logarítmica. En la tabla 5.4 se muestran los parámetros de interés.

Tabla 5.4. Parámetros de interés de las curvas de calibrado.

Ecuación de segundo grado	Ecuación logarítmica
$I = -0.30 + 11.89C + 8.04C^2$ $r^2 = 0.9996$ ; N=5 Intervalo de trabajo* 0.025-10 µg/ml	$\log I = 0.72 + 1.27 \log C$ $r^2 = 0.9992$ ; N=5 Intervalo de trabajo* 0.3-10 µg/ml

\* coincide con el intervalo dinámico

**ii) Límite de detección:**

El límite de detección instrumental estimado mediante el criterio **3.s**, donde **s** es la desviación estándar del blanco obtenida a partir de 10 lecturas, resultó ser 25 ng/ml.

**iii) Exactitud:**

En un primer ensayo se prepararon calibrados de adición estándar para las dos muestras comerciales (muestras A y B) y para las dos sintéticas preparadas en el laboratorio (muestras C y D). Los coeficientes de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Coeficientes de recuperación obtenidos.

Muestra	% R	
	ec. segundo grado	ec. logarítmica
A	101±1	101±5
B	104±1	101±2
C	96±2	96±3
D	102±1	102±2

Por tanto se puede concluir que no se observan errores proporcionales a la concentración de los analitos ocasionados por la matriz de las muestras.

Finalmente se aplicó el método a la determinación de ODP en las cuatro muestras, y los resultados se compararon con los valores obtenidos mediante el contraste de *t de Student* empleando un modelo

de regresión lineal (Apéndice II) con los obtenidos por el método de referencia descrito en el apartado 5.2. Los resultados se muestran como media de tres réplicas junto su desviación estándar en la tabla 5.6, donde  $C$  es la concentración obtenida con el método propuesto y  $C_{ref}$  la obtenida con el método de referencia.

Tabla 5.6. Resultados obtenidos en la determinación de ODP.

Muestra	$C_{ref} \pm s_{ref} / \%$	$C \pm s / \%$	
		Calibrado segundo orden	Calibrado logarítmico
A	2.23±0.02	2.24±0.02	2.24±0.02
B	3.50±0.01	3.62±0.03	3.66±0.03
C	4.10±0.04	4.23±0.05	4.23±0.05
D	4.23±0.02	4.23±0.05	4.22±0.04

Los ajustes correspondientes a la comparación del método propuesto (empleando los dos tipos de calibrado) con el de referencia fueron:

$$C = (-0.0 \pm 0.2) + (1.02 \pm 0.05) C_{ref}; \quad r^2 = 0.995, \quad N = 4 \quad (\text{calibrado de segundo orden})$$

$$C = (-0.0 \pm 0.2) + (1.02 \pm 0.06) C_{ref}; \quad r^2 = 0.992, \quad N = 4 \quad (\text{calibrado logarítmico})$$

Los valores de  $(t_{cal})_a$  fueron 0.12 y 0.01, mientras que los de  $(t_{cal})_b$  fueron 0.48 y 0.33. Teniendo en cuenta que el valor crítico de  $t$  para un nivel de significación de 5 % y  $N-2=2$  grados de libertad es 4.30, se demuestra que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por el método propuesto (empleando cualquiera de los dos métodos de calibración) y los obtenidos por el método de referencia.

#### iv) Precisión:

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto oscilan entre 0.8-1.2 %.

#### v) Velocidad de muestreo:

El tiempo requerido para llevar a cabo una medida es de 40 s, lo que indica una frecuencia de análisis de  $18 \text{ h}^{-1}$  si se llevan a cabo 5 inyecciones por disolución.

#### **5.4. CONCLUSIONES**

La quimioluminiscencia del octil dimetil PABA inducida por el permanganato puede ser empleada para determinar este filtro UV en formulaciones cosméticas para la protección solar.

No es necesaria una etapa previa de separación, y la determinación se realiza de un modo rápido y sencillo, llevándose a cabo de forma automatizada.

Bajo las condiciones experimentales seleccionadas el límite de detección, exactitud, precisión y velocidad de muestreo resultan adecuadas para llevar a cabo el análisis de este tipo de muestras.

El bajo límite de detección del método propuesto sugiere la posibilidad de la determinación de trazas de octil dimetil PABA en otro tipo de muestras (restos de fabricación de cosméticos, restos en agua de baño (piscinas, playa), trazas de fluidos biológicos de usuarios de productos para la protección solar, etc), en cuyo interés se centra una línea de investigación recientemente iniciada en el grupo en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral (véase *Capítulo 9* de esta memoria).

### **ANEXO 5.1: Elaboración de cremas solares conteniendo ODP y otros filtros UV**

Se elaboraron dos muestras de cremas solares siguiendo el protocolo de fabricación proporcionado por los laboratorios Guinama S.L. (Valencia). A continuación se detalla la composición y el modo de preparación.

**Componentes:** **Base PFC o/w** (crema base para elaboración de emulsiones aceite/agua, compuesta por una mezcla de miristato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila), **Aceite de aguacate** (su función principal es la de sobreengrasante de la piel y dermoprotector, se trata de una mezcla natural de ácidos grasos saturados, oléico y linoléico), **Dimeticona 350** (se trata de una mezcla de polímeros entre los que se encuentra la dimetilsilicona y dimetilsiloxano, y su función es la de ayudar a la elaboración de emulsiones y proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto, además de actuar como vehículo de componentes activos), **Vitamina E** (su función es la de actuar como antioxidante), **Propilenglicol** (su función es la de emulgente, impidiendo la desecación de la capa córnea de la epidermis), **Hidrovitón** (se trata de un preparado a base de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes, cloruro sódico y humectantes, cuya función es la de hidratar la piel), **Phenonip** (mezcla de parabenos y fenoxietanol, cuya función es la de conservador).

*Nota: estos componentes utilizados para la elaboración de la crema fueron adquiridos en los laboratorios Guinama S.L.*

#### **MUESTRA SINTÉTICA C:**

Fase A)	Base PFC o/w .....	18 %
	Aceite de aguacate .....	5 %
	Dimeticona 350 .....	5 %
	Vitamina E .....	0.5 %
	Benzofenona-4 (BZ4) .....	2.5 %
	Benzofenona-3 (BZ3) .....	5 %
	Octil dimetil PABA (ODP) .....	4 %
	Octil metoxicinamato (OMC) .....	5 %
	Octil salicilato (OS) .....	2.5 %
	Homosalato (HS) .....	5 %

Fase B)	Propilenglicol .....	5 %
	Hidrovitón .....	4 %
	Agua c.s.p. ....	100 %
Fase C)	Phenonip .....	0.5 %

**MUESTRA SINTÉTICA D:**

Fase A)	Base PFC o/w .....	18 %
	Aceite de aguacate .....	5 %
	Dimeticona 350 .....	5 %
	Vitamina E .....	0.5 %
	Benzofenona-4 (BZ4) .....	2.5 %
	Benzofenona-3 (BZ3) .....	5 %
	Butil metoxidibenzoilmetano (BDM) .....	2.5 %
	Octil dimetil PABA (ODP) .....	4 %
	Octil metoxicinamato (OMC) .....	5 %
	Octil salicilato (OS) .....	2.5 %
	Homosalato (HS) .....	5 %
Fase B)	Propilenglicol .....	5 %
	Hidrovitón .....	4 %
	Agua c.s.p. ....	100 %
Fase C)	Phenonip .....	0.5 %

**Elaboración de la crema:**

- 6) Pesar los componentes de las fases A y B en dos vasos de precipitados, tapar con vidrio de reloj y poner a baño María hasta que funda la fase A (aprox. 70°C).
- 7) Verter la fase B sobre la A muy lentamente y bajo agitación continua.
- 8) Sacar del baño María y sin dejar de agitar dejar enfriar hasta temperatura ambiente, adicionando la fase C a unos 30-35°C. Seguir agitando hasta homogeneización.

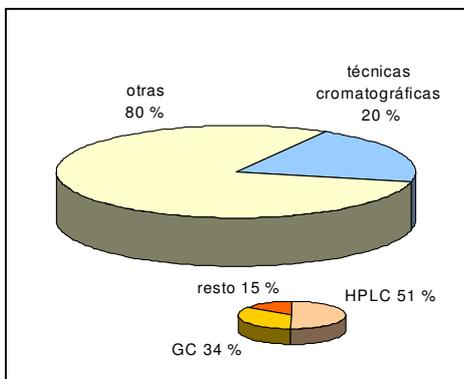
## **TERCERA PARTE:**

### **MÉTODO LÍMPIOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE FILTROS UV MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

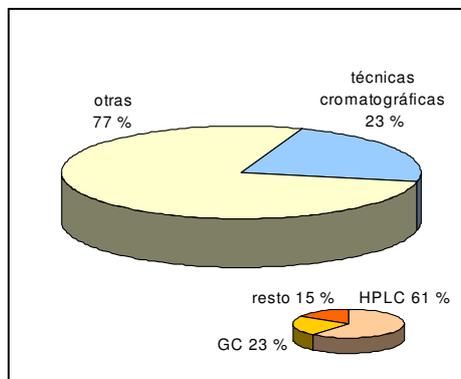


En una búsqueda informatizada en la base de datos “*Analytical Abstracts*” (1980-2002), se puede comprobar que las técnicas cromatográficas constituyen el 20 % del total de artículos publicados. Solamente la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) constituye el 51 % de las técnicas cromatográficas empleadas, mientras la cromatografía de gases se ha empleado en el 34 % de los casos.

Esta proporción se mantiene cuando se revisan los artículos publicados sobre productos cosméticos en general, si bien el empleo de HPLC ha sido ligeramente superior en el caso de los productos cosméticos, tal y como se observa en las siguientes figuras.

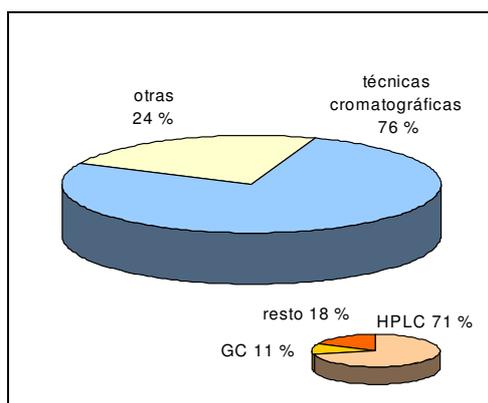


Uso de las técnicas cromatográficas en general.



Uso de las técnicas cromatográficas en el análisis de productos cosméticos.

Sin embargo la tendencia se invierte cuando se revisan los artículos publicados en los que se determinan filtros UV, tal y como se muestra en la siguiente figura.



Uso de las técnicas cromatográficas en la determinación de filtros UV.

Esta tendencia invertida se debe a que la mayoría de los filtros UV son compuestos orgánicos fácilmente liposolubles, que aparecen habitualmente mezclados en los productos cosméticos para la protección solar, de modo que su determinación por medida directa no es posible si no se lleva a cabo una etapa previa de separación. Además, alguno de ellos presenta alto punto de ebullición, por lo que se requiere realizar una etapa previa de derivatización (generalmente una silylación) si se pretende determinar por cromatografía de gases. Por ello, el uso de la cromatografía líquida está más extendido en la determinación de filtros UV que la cromatografía de gases.

En la presente memoria se proponen algunos métodos de análisis basados en la cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de filtros UV en productos cosméticos para la protección solar.

## **CAPÍTULO 6**

### **DETERMINACIÓN DE LOS FILTROS UVB AUTORIZADOS A NIVEL INTERNACIONAL MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

El contenido de este Capítulo ha sido publicado en *Fresenius' J Anal Chem* (2001) 369:638-641, y presentado como cartel en *Euroanalysis XI*, Lisboa, 2000.



## 6.1. INTRODUCCIÓN

### 6.1.1. Interés de la determinación simultánea de filtros químicos internacionalmente autorizados en productos cosméticos para la protección solar:

En la actualidad existen del orden de 40 compuestos orgánicos que pueden emplearse como filtros UV en las formulaciones cosméticas para la protección solar, pero sólo 8 de ellos están simultáneamente permitidos en la actualidad por las normativas europea, estadounidense y japonesa, por lo que se puede considerar que el uso de estos 8 filtros UV está autorizado a nivel internacional, y en consecuencia su determinación es de gran interés.

Siete de estos filtros químicos actúan principalmente frente a la radiación UVB que es la radiación solar más dañina que llega a la Tierra, mientras que el butil metoxidibenzoilmetano (BDM) puede ser considerado como UVA neto. En la tabla 6.1 se muestra el contenido máximo permitido para los filtros UVB según la normativa aplicada.

Tabla 6.1. Filtros UVB permitidos a nivel internacional.

Denominación INCI	Abreviatura empleada	% permitido		
		UE	EEUU	Japón
PABA	PAB	5	15	4
Benzofenona-4	BZ4	5	10	10
Benzofenona-3	BZ3	10	6	5
Octil dimetil PABA	ODP	8	8	10
Octil metoxicinamato	OMC	10	7.5	10
Octil salicilato	OS	5	5	10
Homosalato	HS	10	15	10

En el presente capítulo se pretende poner a punto un método analítico para la determinación simultánea de los filtros UVB permitidos a nivel internacional mediante cromatografía líquida de alta resolución.

### 6.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:

Como se ha indicado en varias ocasiones a lo largo de esta Tesis Doctoral, no existe ningún método oficial para la determinación de estos compuestos, y aunque en la bibliografía analítica existen varios métodos propuestos por autores para la determinación de filtros UV en productos cosméticos, ninguno de ellos realiza la determinación simultánea de estos 7 filtros UVB.

Es de destacar que los problemas dermatológicos ocasionados por PAB (*Dromgoole y Mailbach, 1990; Mackie y Mackie, 1999*) y sus posibles efectos carcinogénicos (*Shaw et al., 1992; de las Heras y Ledo, 1996*), han provocado una drástica reducción del uso de este filtro UVB por parte de los fabricantes de cosméticos hasta el punto de indicar “Libre de Paba” en la etiqueta del producto con fines mercantilísticos.

Por ello, algunos autores excluyen PAB de sus estudios. Así, por ejemplo, *Schneider et al. (1996)* publicaron un método para la determinación de varios filtros UV entre los que se encuentran los otros 6 filtros UVB anteriormente mencionados. El método se basa en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de espectrometría ultravioleta/visible (UV/VIS) empleando metanol (MeOH), acetonitrilo (AcCN) y disolución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) en gradiente como fase móvil, que tan sólo se aplicó al análisis de una muestra. Más tarde *Rastogi y Jensen (1998)* publicaron un método para la identificación de 20 filtros UV entre los que se encuentran los 6 filtros UVB considerados, también empleando HPLC (con detector UV/VIS de fila de diodos) y AcCN, tetrahidrofurano (THF) y tampón citrato pH=9 como fase móvil mediante elución en gradiente.

Otros autores también han propuesto métodos para la determinación de varios filtros UV entre los que se encuentran algunos de los filtros UVB aquí considerados, (ver *tabla 1.4, Capítulo 1* de esta memoria), pero en todos ellos se emplean fases móviles conteniendo disolventes de elevada toxicidad para el analista o el medio ambiente.

### **6.1.3. Justificación del objetivo de trabajo:**

En el presente trabajo se pretende poner a punto un método analítico que permita cuantificar simultáneamente estos seis componentes de una forma rápida y sencilla, empleando una instrumentación básica de cromatografía líquida y disolventes de baja o nula toxicidad, como son el etanol y agua.

En la bibliografía consultada no existe ningún artículo en el que se describa una metodología analítica que permita la determinación simultánea de los seis filtros UVB autorizados a nivel internacional que pueda ser considerado como un método de análisis limpio.

## **6.2. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE LOS FILTROS UVB AUTORIZADOS A NIVEL INTERNACIONAL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

### **6.2.1. Método propuesto. Parte experimental:**

#### **6.2.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un cromatógrafo de HPLC marca Hitachi con bucle de inyección de 20 µl, con bomba de alta presión Hitachi modelo L-7100 y con detector UV/VIS Hitachi modelo L-7420. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> (LiChrospher® RP-18 (12.5 cm x 4 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm)) de la casa comercial Merck.

#### **6.2.1.2. Reactivos y muestras:**

Benzofenona-4 (BZ4) 99.9 %, octil dimetil PABA (ODP) 100±2 % y octil metoxicinamato (OMC) 99.8 % (Roig Farma S.A., Terrassa (Barcelona)), benzofenona-3 (BZ3) 98 % y octil salicilato (OS) 99 % (Aldrich, Barcelona), homosalato (HS) 98 % (Chemir S.A., Barcelona) se emplearon para preparar las disoluciones patrón. 4-metilbenciliden canfor 99.7 % (Guinama S.A., Valencia) se empleó como patrón interno (PI). Los disolventes utilizados fueron: etanol (EtOH) grado HPLC (Scharlab, Barcelona), ácido acético glacial (AcOH) para análisis (Panreac, Barcelona) y agua desionizada (empleando un sistema NANOpurell de Barnstead (Boston, EEUU)).

Las muestras comerciales analizadas fueron las siguientes: Leche Solar Nievina FPS 8 (*muestra A*) (Laboratorios Vigmar, Valencia), Leche Solar Hawaiian Tropic FPS 15 (*muestra B*) (Hawaiian Tropic, Hawaii, EEUU), Loción Solar Clinique FPS 6 (*muestra C*) y Loción Solar Clinique FPS 15 (*muestra D*) (Clinique Laboratoires, París, Francia).

Se preparó una muestra en el laboratorio (*muestra E*) de acuerdo con el protocolo facilitado por Guinama S.L. (Valencia), tal y como se detalla en el *Anexo 6.1* de este capítulo).

#### **6.2.1.3. Metodología de trabajo:**

La metodología seguida en la realización del presente trabajo ha sido la siguiente:

En primer lugar se estudió la composición y caudal de la fase móvil. A continuación se realizaron experiencias para evaluar la repetibilidad de los tiempos de retención de los analitos y del área de los picos cromatográficos y posteriormente se estudió la linealidad. Finalmente se aplicó el método a una muestra sintética de concentración conocida y a cuatro muestras comerciales de protectores solares, determinando el contenido de cada uno de los analitos presente en las muestras y estudiando el porcentaje de recuperación para cada uno de ellos.

En el *apartado 6.2.2* se detallan todos los estudios realizados y los resultados obtenidos en cada uno de ellos, así como el procedimiento propuesto y sus parámetros analíticos.

### **6.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:**

Estudios preliminares demostraron que el orden de elución de los analitos empleando una fase móvil de naturaleza hidroetanolica fue el siguiente: BZ4, BZ3, ODP, OMC, HS (primer pico), OS y HS (segundo pico).

El homosalato (HS) presenta dos centros quirales en su estructura (figura 6.1), lo que provoca que existan cuatro estereoisómeros. Estos cuatro isómeros se pueden agrupar en dos grupos de diastereoisómeros, y por tanto al presentar diferentes propiedades fisicoquímicas son susceptibles de separarse en dos grupos (que denominaremos HS-1 y HS-2) empleando una columna cromatográfica que no tenga propiedades quirales. Los isómeros que forman cada uno de los grupos no pueden separarse con una columna de estas características debido a que entre ellos son enantiómeros, por lo que para su separación sería necesario una fase estacionaria con propiedades quirales adecuadas. En la figura 6.1 se muestran los estereoisómeros de HS.

Puesto que la estructura de la molécula responsable de la absorción es la parte aromática, se deduce que ambos grupos de diastereoisómeros tendrán el mismo coeficiente de absorción molar, ya que en esta zona no difieren, y por tanto el que un pico sea más intenso que el otro se deberá exclusivamente a la diferente proporción en que existen al realizar la síntesis.

Debido a que HS-1 presenta repulsiones 1,3-diaxiales entre los grupos metilo, tendrá menor estabilidad que HS-2 que no las presenta, y por tanto su abundancia será menor, manifestándose en una menor

altura de pico cromatográfico. Teniendo en cuenta esta consideración, se tomó el pico correspondiente a HS-2 para la cuantificación de HS.

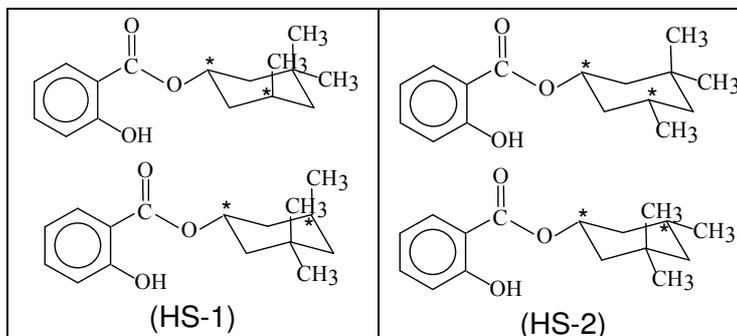


Fig. 6.1. Diastereoisómeros del homosalato. (\*) Centros quirales.

### 6.2.2.1. Estudio de las variables cromatográficas:

Con el fin de obtener una buena resolución entre los diferentes analitos en el menor tiempo posible empleando una fase móvil hidroetanólica, se estudió la relación agua/etanol y el caudal de la fase móvil. Teniendo en cuenta que ODP, OMC y HS-1 son eluidos consecutivamente y muy próximos, la resolución entre ellos se tomó como referencia para escoger las mejores condiciones cromatográficas. Para ello se inyectaron 20  $\mu$ l de una disolución patrón multicomponente conteniendo 14, 13.5 y 26.5  $\mu$ g/ml de ODP, OMC y HS en EtOH, variando el caudal entre 0.5 y 1.0 ml/min y la cantidad de EtOH entre 65 y 75 %. Se escogió 313 nm como longitud de onda de compromiso a la que realizar las medidas, obteniéndose una buena señal analítica para todos los filtros estudiados. El valor de la resolución cromatográfica (**Rs**) se calculó según la siguiente expresión (*Skoog et al., 1997, pág. 680*):

$$R_s = \frac{[(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_A/2 + W_B/2}$$

donde  $(t_r)_A$  y  $W_A$  son el tiempo de retención y la anchura del pico que eluye en primer lugar y  $(t_r)_B$  y  $W_B$  los del pico que eluye más tarde.

Los resultados se muestran en las figuras 6.2 y 6.3.

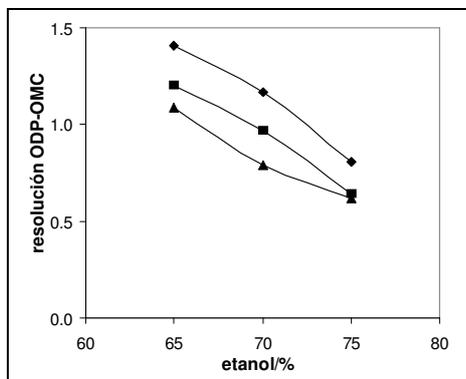


Fig. 6.2. Resolución entre ODP y OMC en función de la composición de la fase móvil y caudal. (◆) 0.5 (■) 0.75 y (▲) 1.0 ml/min.

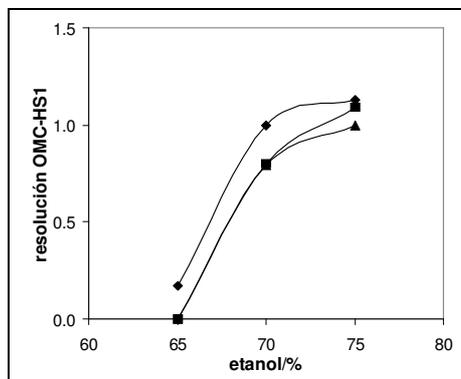


Fig. 6.3. Resolución entre ODP y HS-1 en función de la composición de la fase móvil y caudal. (◆) 0.5 (■) 0.75 y (▲) 1.0 ml/min.

La naturaleza de la fase móvil afecta de forma diferente a la movilidad de los analitos, y por tanto a la resolución entre ellos, mientras que un aumento del caudal provoca una disminución de la resolución. Una proporción del 70 % en EtOH y un caudal de 0.5 ml/min proporcionan los mejores resultados, permitiendo una buena separación entre los tres picos.

Según *DiNunzio y Gadde (1990)*, el empleo de una pequeña cantidad de AcOH en la fase móvil reduce el denominado efecto *arrastré* o *cola* de algunos picos, especialmente el de BZ3. En el presente trabajo se empleó una proporción de 0.5 % de AcOH en la fase móvil. En la figura 6.4 se muestra un cromatograma de los seis analitos y 4-metilbenciliden canfor como patrón interno (PI) empleando las condiciones anteriormente seleccionadas.

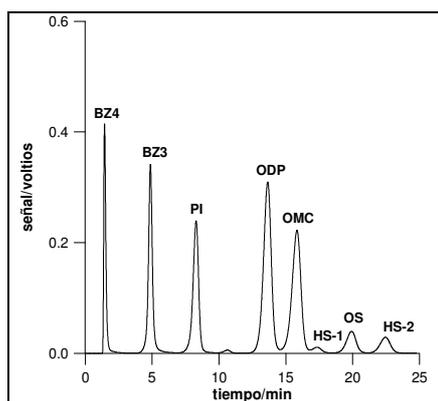


Fig. 6.4. Cromatograma de una disolución patrón conteniendo los seis analitos y 4-metilbenciliden canfor como patrón interno (PI) en EtOH.

### 6.2.2.2. Repetibilidad del tiempo de retención y del área de los picos cromatográficos:

Se inyectó por quintuplicado una disolución patrón conteniendo una mezcla de 70 µg/ml de los seis analitos en EtOH, y se estudió la repetibilidad del tiempo de retención ( $t_r$ ) y del área. Los resultados se muestran en la tabla 6.2.

Tabla 6.2. Estudio de la repetibilidad del  $t_r$  y del área.

Analito	$t_r \pm s$ / min	CV área / %
BZ4	1.44±0.01	0.72
BZ3	4.90±0.01	0.58
ODP	13.71±0.07	0.59
OMC	15.9±0.1	0.44
OS	20.2±0.1	0.48
HS	22.7±0.1	0.52

CV = coeficiente de variación

Como se observa, la precisión obtenida tanto en el tiempo de retención como en el área es adecuada para llevar a cabo este tipo de análisis.

### 6.2.2.3. Estudio de la linealidad:

Se prepararon disoluciones multicomponente de los seis analitos en EtOH (5-300 µg/ml), y se inyectaron en el sistema cromatográfico empleando EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) como fase móvil y un caudal de 0.5 ml/min. Se observó una tendencia lineal entre el área obtenida para cada uno de los analitos y su concentración aunque para algunos de ellos se desviaba para los patrones de mayor concentración, a excepción de BZ4, que no seguía un comportamiento lineal por debajo de 25 µg/ml. En la tabla 6.3 se muestra el límite superior de linealidad para cada uno de los analitos, y en la figura 6.5 se puede apreciar el comportamiento anómalo para BZ4.

Tabla 6.3. Límite superior de linealidad de los analitos

	BZ4	BZ3	ODP	OMC	HS	OS
Límite superior	250	250	225	250	≥300	≥300

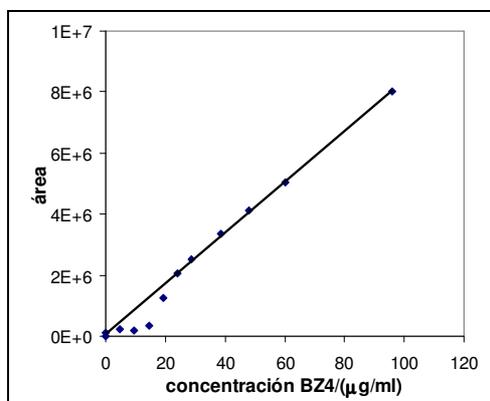


Fig. 6.5. Intervalo lineal de BZ4.

Este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta que este compuesto no se retiene en la columna cromatográfica bajo las condiciones empleadas y eluye con el frente de elución, de modo que para concentraciones bajas de BZ4 la fluctuación debida al frente de elución puede afectar considerablemente al valor del área. Por el contrario, para concentraciones mayores del analito el pico del frente de elución es despreciable frente al del analito, y la señal que predomina es la de éste, adquiriendo ya una tendencia lineal.

#### 6.2.2.4. Uso de patrón interno:

Se prepararon calibrados multicomponente de los seis analitos en EtOH (25-125 µg/ml), conteniendo 15 µg/ml de 4-metilbenciliden canfor, que tiene un tiempo de retención de 8.34 min en las condiciones de trabajo, empleando las condiciones cromatográficas seleccionadas anteriormente, obteniéndose las rectas de calibrado en presencia y ausencia de patrón interno, representándose el cociente de áreas entre analito/PI o el área del analito, respectivamente. Los parámetros de interés de las rectas de calibrado obtenidas que proporcionan información de la linealidad y de la precisión para cada uno de los analitos se muestran en la tabla 6.4, siendo  $s_{y/x}$  la desviación estándar de la recta de calibrado y  $r^2$  el coeficiente de regresión.

Tabla 6.4. Parámetros de las rectas de calibrado en presencia y ausencia de PI.

Analito	Calibrado en presencia de PI		Calibrado en ausencia de PI	
	$S_{y/x}$ norm*	$r^2$	$S_{y/x}$	$r^2$
BZ4	$6.02 \cdot 10^{+4}$	0.9994	$4.16 \cdot 10^{+4}$	0.9997
BZ3	$1.28 \cdot 10^{+5}$	0.9993	$2.07 \cdot 10^{+4}$	0.99998
ODP	$2.22 \cdot 10^{+5}$	0.9995	$1.62 \cdot 10^{+4}$	0.999997
OMC	$2.57 \cdot 10^{+5}$	0.9995	$2.93 \cdot 10^{+4}$	0.999993
OS	$4.60 \cdot 10^{+4}$	0.9993	$0.97 \cdot 10^{+4}$	0.99997
HS	$3.33 \cdot 10^{+5}$	0.9991	$1.45 \cdot 10^{+4}$	0.9998

\* Resultado de multiplicar la  $s_{y/x}$  de la recta obtenida por el área de PI, para poder establecer una comparación con los calibrados en ausencia de PI.

Como puede deducirse de los valores de  $s_{y/x}$ , el calibrado en ausencia de PI es más preciso, y de los valores de  $r^2$  se deduce que además presenta mayor grado de linealidad. Esto puede entenderse teniendo en cuenta que la instrumentación utilizada es de buenas prestaciones y no provoca gran imprecisión en las lecturas como consecuencia de fluctuaciones en el caudal o deriva, lo que hace que no sea necesaria la incorporación de un patrón interno, ya que esto equivale a que cada punto de la recta de calibrado provenga de dos picos (el del analito y el del patrón interno), traduciéndose en una mayor imprecisión derivada de la imprecisión en la preparación de la disolución y la del propio instrumento. Por el contrario, en instrumentos donde la imprecisión sea acusada, puede recomendarse el uso de este patrón interno, puesto que la imprecisión derivada del uso del patrón interno será, casi con total seguridad, despreciable frente a la del equipo. Por tanto, en el presente trabajo no se utilizará patrón interno.

***Procedimiento propuesto para la determinación cromatográfica de filtros UVB en productos cosméticos para la protección solar:***

Se pesan por triplicado entre 0.3-0.5 g de producto solar, y se disuelven en 25 ml de etanol. Se toma una alícuota de 1 ml (previamente filtrada si contiene  $TiO_2$ ) y se lleva a un aforado de 10 ml diluyendo con etanol.

Se preparan disoluciones patrón multicomponente, conteniendo de 25 a 150  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los analitos en etanol.

Tanto las disoluciones patrón como las de las muestras se inyectan en el sistema cromatográfico empleando un bucle de inyección de 20  $\mu\text{l}$ . Se emplea EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) como fase móvil y un caudal de 0.5 ml/min. La detección se efectúa a 313 nm.

***Parámetros analíticos del método propuesto:***

*i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 6.5, siendo **a** la ordenada en el origen (y  $s_a$  su desviación estándar), **b** la pendiente (y  $s_b$  su desviación estándar),  $r^2$  el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado.

Tabla 6.5. Parámetros de las rectas de calibrado de los analitos.

Analito	Intervalo de trabajo* ( $\mu\text{g/ml}$ )	$a \pm s_a$	$b \pm s_b / (\text{ml}/\mu\text{g})$	$r^2$ **
BZ4	25-150	$(36 \pm 7) \cdot 10^4$	$(751 \pm 9) \cdot 10^{+2}$	0.9997
BZ3	25-150	$(-7 \pm 2) \cdot 10^4$	$(1105 \pm 3) \cdot 10^{+2}$	0.99998
ODP	25-150	$(-2 \pm 2) \cdot 10^4$	$(2497 \pm 3) \cdot 10^{+2}$	0.999997
OMC	25-150	$(-2 \pm 3) \cdot 10^4$	$(2175 \pm 3) \cdot 10^{+2}$	0.999993
OS	25-150	$(-2 \pm 1) \cdot 10^4$	$(336 \pm 1) \cdot 10^{+2}$	0.99997
HS	25-150	$(-2 \pm 2) \cdot 10^4$	$(218 \pm 2) \cdot 10^{+2}$	0.9998

\* en el apartado 6.2.2.3 se muestra el intervalo lineal

\*\* N=5

*ii) Sensibilidad:*

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de la recta de calibrado varía en función del analito. La sensibilidad obtenida es de 21800 ml/ $\mu\text{g}$  para HS que es el menos sensible hasta 249700 ml/ $\mu\text{g}$  para ODP que es el más sensible, como se observa en la tabla 6.4.

*iii) Límite de detección:*

El límite de detección instrumental (**LD**) estimado mediante el criterio  $3 \cdot s_{y/x} / b$ , donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y **b** la pendiente, se muestra en la tabla 6.6. Como se indicó anteriormente, BZ4 no tiene comportamiento lineal por debajo de 25  $\mu\text{g/ml}$ , y por tanto no se ha aplicado este criterio, ya que supone una extrapolación de la recta de calibrado hasta su corte con el eje de ordenadas; no obstante, aunque por debajo de 25  $\mu\text{g/ml}$  no sigue comportamiento lineal, se puede observar en la figura 6.5 que a partir de 20  $\mu\text{g/ml}$  ya sería detectable.

Tabla 6.6. Límites de detección calculados para los diferentes analitos.

Analito	LD/ $(\mu\text{g/ml})$
BZ4	20 *
BZ3	0.6
ODP	0.2
OMC	0.4
OS	0.9
HS	2.0

\* no calculado matemáticamente

*iv) Exactitud:*

Con el fin de evaluar la exactitud del método, se preparó una muestra sintética (*muestra E*) de crema solar siguiendo el protocolo de los laboratorios Guinama S.L. (*Anexo 6.1* de este capítulo), de modo que la

cantidad exacta de cada uno de los analitos presente en la muestra era conocida. Se aplicó el método propuesto y se determinó el contenido de cada uno de los filtros en la muestra sintética. En la figura 6.6 se muestra un cromatograma correspondiente a una de las réplicas del análisis, y en la tabla 6.7 se muestran los resultados obtenidos, siendo **C** la concentración hallada y  $\mu$  la concentración real.

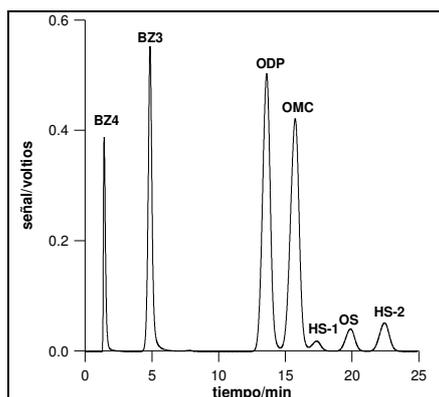


Fig. 6.6. Cromatograma correspondiente a la muestra sintética.

Tabla 6.7. Comparación de los valores obtenidos en el análisis de la muestra sintética (*muestra E*) con los reales.

	BZ4	BZ3	ODP	OMC	OS	HS
C $\pm$ s/%	2.7 $\pm$ 0.1	5.42 $\pm$ 0.05	4.17 $\pm$ 0.03	4.75 $\pm$ 0.02	2.63 $\pm$ 0.05	4.91 $\pm$ 0.03
$\mu$ /%	2.64	5.17	4.03	4.58	2.51	4.68

El error relativo cometido en la determinación es menor del 5 % en todos los casos, y por tanto se puede concluir que el método propuesto proporciona resultados exactos.

A continuación se prepararon calibrados de adición estándar de cada uno de los analitos en las muestras comerciales en las que se encontraba presente y en la muestra sintética, y las pendientes obtenidas se compararon con las de los calibrados normales, obteniéndose el coeficiente de recuperación (**R**) como:

$$\%R=(b_{a.e.}/b).100$$

siendo  $b_{a.e.}$  la pendiente obtenida en el calibrado de adición estándar y **b** la pendiente del calibrado normal.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6.8. Coeficientes de recuperación obtenidos para cada analito.

Muestra	% R					
	BZ4	BZ3	ODP	OMC	OS	HS
A	-	97±1	97±1	96±1	-	-
B	-	98±3	-	100±2	-	-
C	-	99±2	-	96±3	101±2	100±2
D	-	-	-	99±2	100±2	-
E	96±2	98±1	98±1	98±1	98±1	99±1

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar la inexistencia de errores proporcionales a la concentración de los analitos ocasionados por la matriz de las muestras.

Se determinó el contenido de los seis filtros UVB en estudio en las cuatro muestras comerciales de cremas solares. Los resultados se muestran en la tabla 6.9, siendo **C** la concentración media de tres determinaciones y **s** la desviación estándar obtenida. En la figura 6.7 se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma correspondiente a la muestra C.

Tabla 6.9. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras comerciales.

Muestra	C±s / % (m/m)					
	BZ4	BZ3	ODP	OMC	OS	HS
A	N.D.*	1.52±0.08	2.26±0.04	0.58±0.05	N.D.	N.D.
B	N.D.	2.57±0.02	N.D.	7.72±0.08	N.D.	N.D.
C	N.D.	5.24±0.03	N.D.	7.78±0.04	5.14±0.04	3.42±0.03
D	N.D.	N.D.	N.D.	4.22±0.03	4.09±0.03	N.D.

\* No detectable.

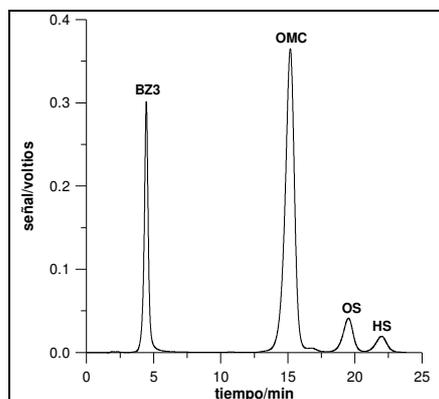


Fig. 6.7. Cromatograma correspondiente a la muestra C.

#### v) Precisión.

Los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de las cinco muestras oscilan entre 0.5-8 %.

*vi) Tiempo de análisis:*

Cada cromatograma puede realizarse en menos de 25 minutos, determinándose los 6 filtros estudiados.

**6.3. CONCLUSIONES**

Se ha puesto a punto un método cromatográfico para la determinación de los seis filtros UVB aprobados a nivel internacional.

El método propuesto presenta suficiente sensibilidad para efectuar los análisis de muestras de protectores solares comerciales.

La exactitud se ha estimado mediante el análisis de una muestra sintética, presentando errores inferiores al 5 % y coeficientes de recuperación cercanos a 100 %.

Los coeficientes de variación obtenidos oscilan entre 0.5-8 %, presentando por tanto una precisión adecuada para un método de control analítico.

Se pueden determinar los 6 filtros en menos de 25 minutos.

El disolvente empleado en la fase móvil ha sido etanol, evitándose por tanto el empleo de disolventes orgánicos de mayor toxicidad, por lo que se puede considerar que no existe toxicidad ambiental en el laboratorio durante la sesión de trabajo, y que el método propuesto es un método de análisis limpio.

### **ANEXO 6.1: Elaboración de una crema solar conteniendo los filtros UV determinados**

Se elaboró una muestra de crema solar siguiendo el protocolo de fabricación proporcionado por los laboratorios Guinama S.L. (Valencia). A continuación se detalla la composición y el modo de preparación.

**Componentes:** **Base PFC o/w** (crema base para elaboración de emulsiones aceite/agua, compuesta por una mezcla de miristato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila), **Aceite de aguacate** (su función principal es la de sobreengrasante de la piel y dermoprotector, se trata de una mezcla natural de ácidos grasos saturados, oléico y linoléico), **Dimeticona 350** (se trata de una mezcla de polímeros entre los que se encuentra la dimetilsilicona y dimetilsiloxano, y su función es la de ayudar a la elaboración de emulsiones y proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto, además de actuar como vehículo de componentes activos), **Vitamina E** (su función es la de actuar como antioxidante), **Propilenglicol** (su función es la de emulgente, impidiendo la desecación de la capa córnea de la epidermis), **Hidrovitón** (se trata de un preparado a base de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes, cloruro sódico y humectantes, cuya función es la de hidratar la piel), **Phenonip** (mezcla de parabenos y fenoxietanol, cuya función es la de conservador).

*Nota: estos componentes utilizados para la elaboración de la crema fueron adquiridos en los laboratorios Guinama S.L.*

#### **MUESTRA SINTÉTICA E:**

Fase A)	Base PFC o/w .....	18 %
	Aceite de aguacate .....	5 %
	Dimeticona 350 .....	5 %
	Vitamina E .....	0.5 %
	Benzofenona-4 (BZ4) .....	2.5 %
	Benzofenona-3 (BZ3) .....	5 %
	Octil dimetil PABA (ODP) .....	4 %
	Octil metoxicinamato (OMC) .....	5 %
	Octil salicilato (OS) .....	2.5 %
	Homosalato (HS) .....	5 %

Fase B)	Propilenglicol .....	5 %
	Hidrovitón .....	4 %
	Agua c.s.p. ....	100 %
Fase C)	Phenonip .....	0.5 %

**Elaboración de la crema:**

- 9) Pesar los componentes de las fases A y B en dos vasos de precipitados, tapar con vidrio de reloj y poner a baño María hasta que funda la fase A (aprox. 70°C).
- 10) Verter la fase B sobre la A muy lentamente y bajo agitación continua.
- 11) Sacar del baño María y sin dejar de agitar dejar enfriar hasta temperatura ambiente, adicionando la fase C a unos 30-35°C. Seguir agitando hasta homogeneización.



## CAPÍTULO 7

### **DETERMINACIÓN DE LOS FILTROS UVA Y UVB AUTORIZADOS A NIVEL INTERNACIONAL MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

El contenido de este Capítulo ha sido publicado en *J Chromatogr A* (2001) 921:207-215, y presentado como cartel en la *XXX Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques (GCTA)* y *I Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (SECyTA)*, Valencia, 2001.



## **7.1. INTRODUCCIÓN**

### **7.1.1. Interés de la determinación simultánea de todos los filtros químicos internacionalmente autorizados en productos cosméticos para la protección solar:**

En un anterior estudio (*Capítulo 6* de esta memoria) se puso a punto un método cromatográfico para el control de los seis filtros UVB internacionalmente autorizados de una manera rápida y sencilla, evitando el uso de disolventes orgánicos tóxicos. Sin embargo, se ha demostrado que la radiación UVA también resulta perjudicial para el ser humano (*Griffiths et al. 1998; Krutmann, 2000*), por lo que las industrias cosméticas han incrementado el uso del butil metoxidibenzoilmetano (BDM), que es el único filtro UVA autorizado a nivel internacional, en sus formulaciones debido a su alto nivel de protección en la zona UVA, y sería recomendable poner a punto métodos para el control simultáneo de estos siete filtros en las formulaciones cosméticas.

### **7.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:**

En la actualidad no existe ningún método analítico oficial para el control de este tipo de productos. Son muchos los filtros UV determinados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) empleando diferentes fases móviles constituidas por mezcla de disolventes orgánicos de elevada toxicidad (ver *tabla 1.4, Capítulo 1*). Sin embargo, en ninguno de los artículos citados se lleva a cabo la cuantificación de los siete filtros aprobados a nivel internacional, excepto en un trabajo de *Schneider et al. (1996)*, que requiere la realización de dos determinaciones independientes con dos sistemas de gradiente diferentes aún empleando detector de fila de diodos para llevar a cabo la cuantificación de 11 filtros UV, incluidos los 7 aquí considerados. Por otro lado, en un trabajo publicado por *Rastogi y Jensen (1998)* se logran separar 20 sustancias empleadas como filtros químicos con ayuda de elución en gradiente de fase móvil y caudal y con ayuda de un detector de fila de diodos, pero no se realiza su cuantificación, sino su identificación con ayuda de una base de datos que incluye el tiempo de retención y espectro de la sustancia.

Por otra parte, empleando las condiciones descritas en el *Capítulo 6* de esta memoria, tampoco es factible la separación de estos 7 filtros, ya que BDM y OS presentan el mismo tiempo de retención.

### **7.1.3. Justificación del objetivo de trabajo:**

En el presente trabajo se pretende poner a punto un método analítico que permita cuantificar simultáneamente los 7 filtros químicos utilizados a nivel internacional de una forma rápida y sencilla, empleando una instrumentación básica de cromatografía líquida y disolventes de baja o nula toxicidad.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, cuya estructura tridimensional forma una superficie hidrofílica y una cavidad apolar en la que pueden incrustarse moléculas de tamaño adecuado, lo que hace que aumente la solubilidad en agua de la molécula huésped (*Rajewski y Stella, 1996*). *Scalia et al. (1998)* demostraron la formación de un complejo 1:2 BDM:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, lo que provoca un aumento de la fotoestabilidad del BDM, así como un gran aumento de la solubilidad en agua mediante la inclusión de éste en la cavidad de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, y consecutivamente *Biloti et al. (1999)* demostraron que el BDM es susceptible de incrustarse en la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina reduciendo la posibilidad de reacciones adversas en la piel del consumidor.

Esta propiedad del BDM puede ser aprovechada analíticamente para modificar sus propiedades en un sistema cromatográfico donde la ciclodextrina se incorpora en la fase móvil. En la bibliografía se pueden encontrar diversos estudios en los que se emplean ciclodextrinas en la fase móvil con la finalidad de resolver mezclas de enantiómeros, ya que las ciclodextrinas presentan quiralidad (*Nowakowski et al., 1997; Herráez-Hernández y Campins-Falcó, 2000; Morin et al., 2000*).

## **7.2. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE LOS FILTROS UVA Y UVB AUTORIZADOS A NIVEL INTERNACIONAL MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

### **7.2.1. Método propuesto. Parte experimental:**

#### **7.2.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un cromatógrafo de HPLC marca Hitachi con bucle de inyección de 20  $\mu$ l, con bomba de alta presión Hitachi modelo L-7100 y con detector UV/VIS Hitachi modelo L-7420. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> (LiChrospher® RP-18 (12.5 cm x 4 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5  $\mu$ m)) de la casa comercial Merck.

### 7.2.1.2. Reactivos y muestras:

Benzofenona-4 (BZ4) 99.9 %, butil metoxidibenzoilmetano (BDM) 97.7 %, octil dimetil PABA (ODP)  $100\pm 2$  % y octil metoxicinamato (OMC) 99.8 % (Roig Farma S.A., Terrassa (Barcelona)), benzofenona-3 (BZ3) 98 % y octil salicilato (OS) 99 % (Aldrich, Barcelona) y homosalato (HS) 98 % (Chemir S.A., Barcelona) se emplearon para preparar las disoluciones patrón. 4-metilbenciliden canfor 99.7 % (Guinama S.A., Valencia) se empleó como patrón interno (PI).  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) 1135 g/mol, 99 % e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) con grado de sustitución medio de 0.4 y PM 1309 g/mol,  $\geq 97$  %, (Acros Organics, Geel, Belgium). Los disolventes utilizados fueron: etanol (EtOH) grado HPLC (Scharlab, Barcelona), ácido acético glacial (AcOH) para análisis (Panreac, Barcelona) y agua desionizada (empleando un sistema NANOpurell de Barnstead (Boston, EEUU)).

Las muestras comerciales analizadas fueron las siguientes: Leche Solar Nievina FPS 8 (*muestra A*) (Laboratorios Vigmar, Valencia), Loción Solar Clinique FPS 15 (*muestra B*) (Clinique Laboratoires, París, Francia), Agua Solar Nievina FPS 2 (*muestra C*) (Laboratorios Vigmar, Valencia), Leche Solar Christian Dior FPS 4 (*muestra D*) (Christian Dior, París, Francia), Leche Solar Babaria FPS 20 (*muestra E*) (Berioska S.L., Cheste, Valencia) y Leche Solar Isdin FPS 15 (*muestra F*) (Laboratorios Puig, Barcelona).

Una matriz de leche solar sin filtros UV proporcionada por Berioska S.L. también se empleó para realizar estudios de recuperación.

Se preparó una muestra en el laboratorio (*muestra G*) de acuerdo con el protocolo facilitado por Guinama S.L. (Valencia), tal y como se detalla en el *Anexo 7.1* de este capítulo.

### 7.2.1.3. Metodología de trabajo:

En primer lugar se estudió la composición y caudal de la fase móvil. Se realizaron experiencias para evaluar la repetibilidad de los tiempos de retención de los analitos y del área de los picos cromatográficos, y posteriormente se estudió la linealidad. Finalmente se aplicó el método a una muestra aditivada con los siete analitos, a una muestra sintética elaborada según un protocolo habitual de los laboratorios cosméticos, y a seis muestras comerciales de protectores solares determinando el porcentaje de recuperación y el contenido de cada uno de los analitos presente en las muestras.

En el *apartado 7.2.2* se detallan todos los estudios realizados, los resultados obtenidos en cada uno de ellos, el procedimiento propuesto y sus características analíticas.

### **7.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:**

Tal y como se demostró en el anterior estudio descrito en el *Capítulo 6* de esta memoria, mediante el empleo de una fase móvil hidroetánolica se podían separar y cuantificar los seis filtros químicos UVB más utilizados a nivel internacional, pero empleando aquellas condiciones no es posible determinar simultáneamente esos seis filtros UVB y BDM, ya que este último eluye al mismo tiempo que OS (fig. 1a). Modificando la composición de la fase móvil o caudal no se consiguen mejores resultados, ya que solapan otros picos.

Como ya se ha indicado anteriormente, *Scalia et al. (1998)* y consecutivamente *Biloti y col. (1999)*, demostraron que BDM es capaz de interaccionar con la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y con la  $\beta$ -ciclodextrina respectivamente. Este hecho sugiere la posibilidad de que introduciendo la cantidad adecuada de ciclodextrina en la fase móvil hidroetánolica, cambien las propiedades cromatográficas de BDM como consecuencia del aumento de su solubilidad en agua debido a su inclusión en el interior de la ciclodextrina (*Scalia et al., 1998; Biloti et al., 1999*). Teniendo en cuenta este hecho, se probaron las dos ciclodextrinas citadas anteriormente. En primer lugar se ensayó la  $\beta$ -ciclodextrina, pero se desestimó dada su baja solubilidad en etanol (componente principal de la fase móvil a emplear). Esta baja solubilidad de la  $\beta$ -ciclodextrina está documentada en un anterior estudio llevado a cabo por *Chastjigakis et al. (1992)*, en el que indican el inconveniente que conlleva al trabajar con la  $\beta$ -ciclodextrina en disolventes hidroorgánicos. Sin embargo, *Roussel y Favrou (1995)* advierten que la  $\beta$ -ciclodextrina derivatizada presenta un incremento de su solubilidad en disolventes hidroorgánicos, de forma que se ensayó la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, presentando una buena solubilidad en mezclas hidroetánolicas.

#### **7.2.2.1. Estudio de las variables cromatográficas:**

Como se indicó en el *Capítulo 6* de esta memoria, el homosalato (HS) presenta dos formas isoméricas en equilibrio que denominamos HS-1 y HS-2, y que presentan diferentes propiedades cromatográficas, manifestándose dos picos en el cromatograma, por lo que el estudio de las variables experimentales descrito a continuación se basa en la

obtención de las condiciones experimentales que proporcionan la mejor resolución entre todos los picos de los analitos.

Estudio de la concentración de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a emplear en la fase móvil

En un primer estudio se procedió a la optimización de la cantidad de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) a emplear en la fase móvil, empleando las condiciones seleccionadas en el anterior estudio. Así, se prepararon fases móviles EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) conteniendo diferentes cantidades de HP- $\beta$ -CD, y se inyectó una disolución etanólica multicomponente conteniendo los siete filtros objetos de estudio. La detección se realizó a 313 nm, y los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 7.1.

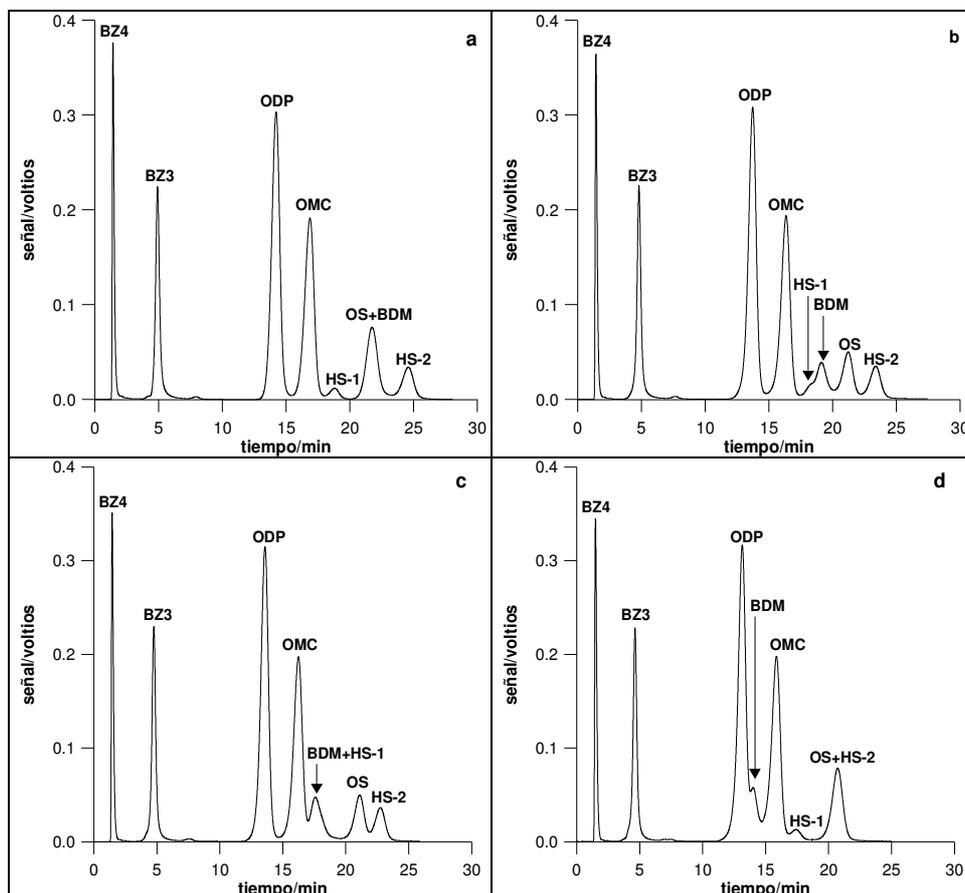


Fig. 7.1. Influencia de la concentración de HP- $\beta$ -CD en la resolución de los picos cromatográficos, empleando una fase móvil EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) conteniendo a) 0, b) 5.3, c) 10.5, d) 26.4, e) 52.7, f) 63.3, g) 65.4 y h) 68.5 mM de HP- $\beta$ -CD, a un caudal de 0.5 ml/min.

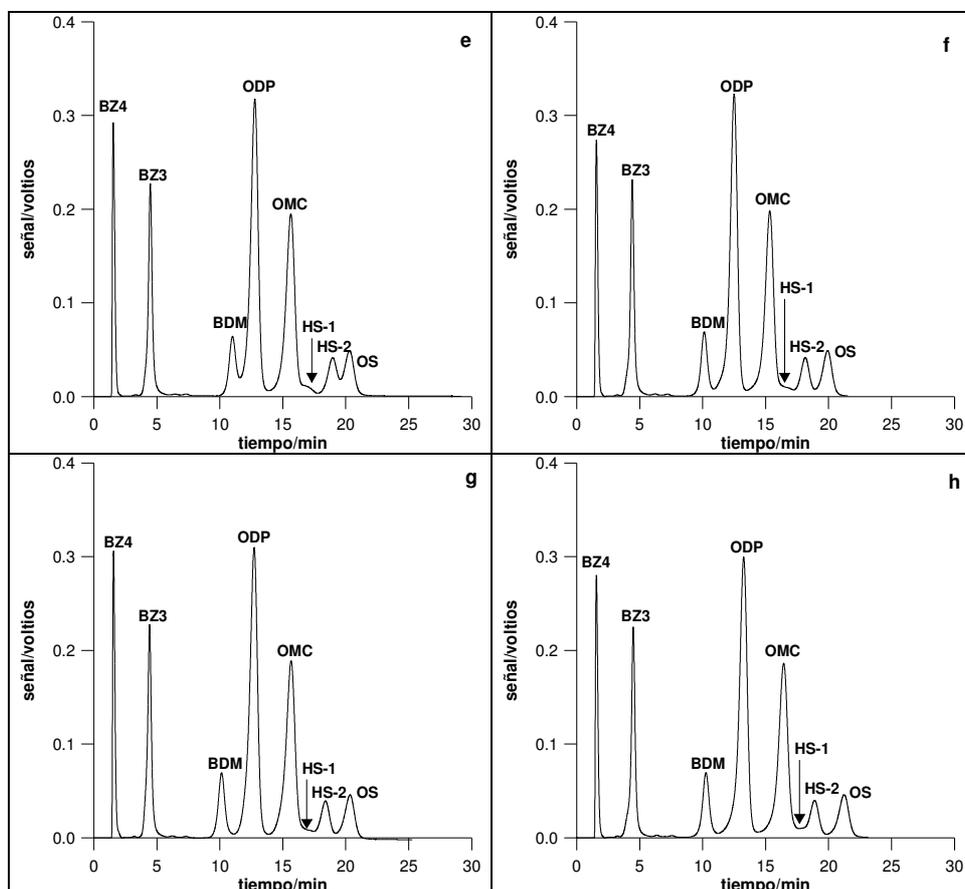


Fig. 7.1. (continuación)

Como puede observarse, al aumentar la concentración de HP- $\beta$ -CD se modifica el tiempo de retención de los analitos, acusándose en el caso de BDM y de uno de los isómeros del homosalato (HS-2). Concentraciones mayores a 65.4 mM de HP- $\beta$ -CD no mejoraban los resultados obtenidos, por lo que seleccionó 63.3 y 65.4 mM de HP- $\beta$ -CD para realizar posteriores estudios.

#### Estudio del caudal de fase móvil:

Se inyectó una disolución etanólica conteniendo 50  $\mu$ g/ml de los siete filtros UV empleando una fase móvil EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) conteniendo 63.3 y 65.4 mM de HP- $\beta$ -CD. Los resultados se muestran en la figura 7.2.

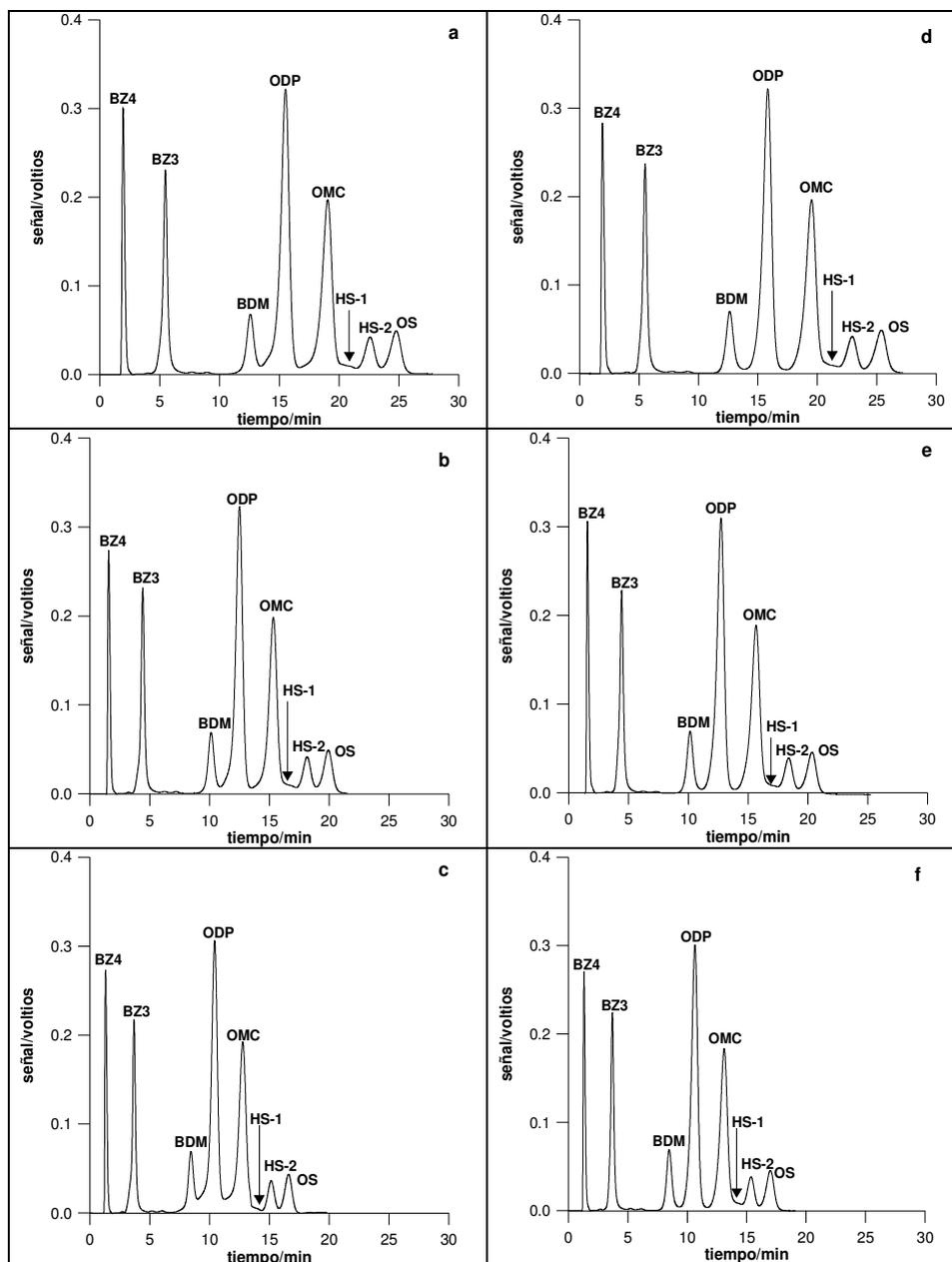


Fig. 7.2. Influencia del caudal de fase móvil empleando una fase móvil EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) conteniendo 63.3 mM de HP-β-CD para a) 0.4, b) 0.5 y c) 0.6 ml/min, y 65.4 mM de HP-β-CD para d) 0.4, e) 0.5 y f) 0.6 ml/min.

Como se observa en la figura 7.2, los mejores resultados se obtienen al emplear HP-β-CD en concentración 65.4 mM y un caudal de 0.6 ml/min, disminuyéndose además el tiempo de análisis.

### Estudio de la proporción de agua/etanol en la fase móvil:

Anteriormente se ha justificado que el empleo de una fase móvil EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) es debido a que en un anterior estudio (*Capítulo 6* de esta memoria) se demostró que proporcionaba los mejores resultados para la resolución de seis de los filtros UV aquí considerados. Ahora bien, al introducir un aditivo en la fase móvil se vio que no sólo BDM se veía afectado, sino que HS-2 también, y asimismo los demás filtros aunque en menor medida. Por este motivo se estimó oportuno estudiar la diferente proporción de agua/etanol en la fase móvil. Para ello se inyectó una disolución etanólica conteniendo 50 µg/ml de los siete filtros empleando una fase móvil EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH de diferente proporción agua/etanol conteniendo 65.4 mM de HP-β-CD y a un caudal de 0.6 ml/min. Los resultados se muestran en la figura 7.3.

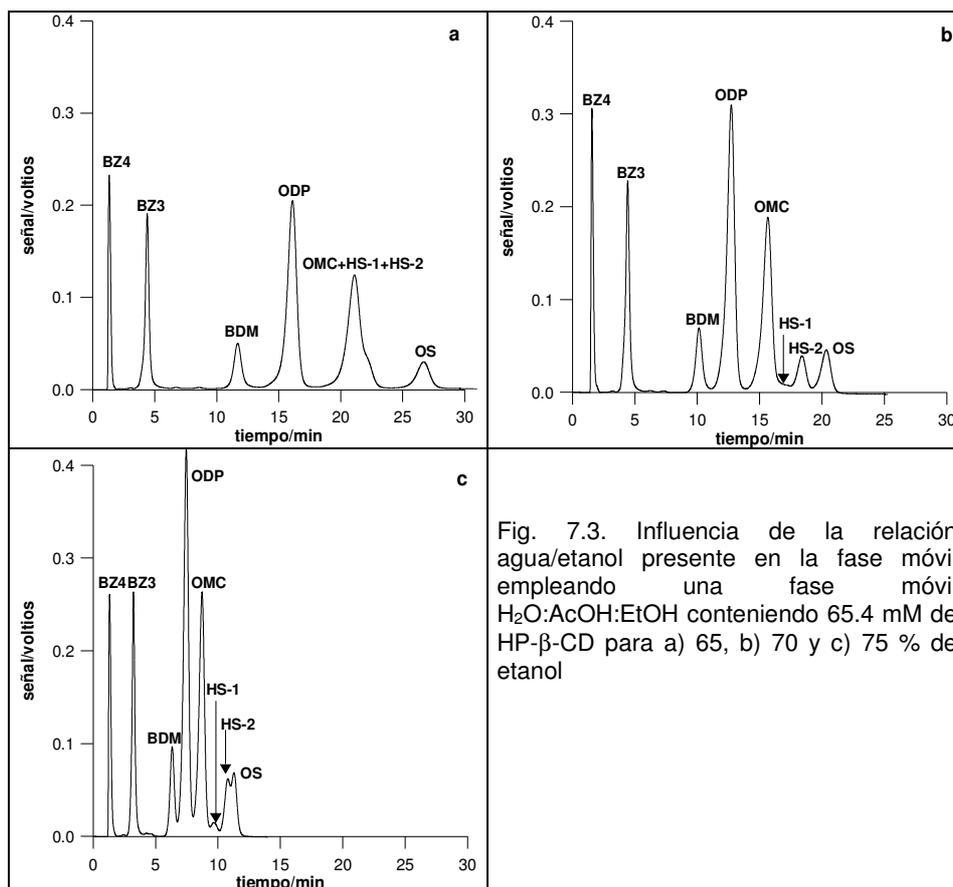


Fig. 7.3. Influencia de la relación agua/etanol presente en la fase móvil empleando una fase móvil H<sub>2</sub>O:AcOH:EtOH conteniendo 65.4 mM de HP-β-CD para a) 65, b) 70 y c) 75 % de etanol

Como puede observarse, un aumento del contenido en etanol provoca un aumento de la fuerza de elución, pero BDM y HS-2 se quedan rezagados, por lo que solapan con otros picos. Por contra, una disminución del contenido en etanol provoca una disminución de la fuerza de elución, disminuyendo el tiempo de retención de BDM y HS-2, y haciendo que HS-2 solape con OMC. Este diferente comportamiento de BDM y HS-2 al variar la relación agua/etanol respecto a los demás filtros se debe a que su solubilidad se ve muy afectada por la presencia de la HP- $\beta$ -CD, tal y como ya se observó en la figura 7.1 al variar la concentración de HP- $\beta$ -CD en la fase móvil.

Por tanto para ensayos posteriores se empleó una fase móvil EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) conteniendo 65.4 mM de HP- $\beta$ -CD a un caudal de 0.6 ml/min, y los parámetros referentes al homosalato se obtuvieron de la integración del pico de HS-2, a partir de ahora denominado simplemente HS. Cabe indicar que entre OMC y HS-1 no se logra obtener la resolución a nivel de la línea base. Esto en principio no constituye ningún problema, ya que el homosalato se cuantifica empleando el pico de HS-2, y OMC tiene una gran sensibilidad y no se ve afectado por la posible y mínima contribución de HS-1.

#### 7.2.2.2. Repetibilidad del tiempo de retención y del área de los picos cromatográficos:

Se inyectó por quintuplicado una disolución patrón multicomponente conteniendo 50  $\mu$ g/ml de los siete analitos en etanol, y se estudió la repetibilidad del tiempo de retención ( $t_r$ ) y del área. Los resultados se muestran en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Estudio de la repetibilidad del  $t_r$  y del área.

Analito	$t_r \pm s$ /min	CV área / %
BZ4	1.31 $\pm$ 0.01	1.54
BZ3	3.71 $\pm$ 0.01	0.32
BDM	8.50 $\pm$ 0.03	2.52
ODP	10.71 $\pm$ 0.04	0.60
OMC	13.23 $\pm$ 0.05	0.62
HS	15.35 $\pm$ 0.03	0.59
OS	17.09 $\pm$ 0.05	0.60

CV = coeficiente de variación

Como se observa, la precisión obtenida tanto en el tiempo de retención como en el área es adecuada para llevar a cabo el análisis de este tipo de muestras.

### 7.2.2.3. Estudio de la linealidad:

Se prepararon disoluciones multicomponente de los analitos en etanol (5-300  $\mu\text{g/ml}$ ), y se inyectaron en el sistema cromatográfico empleando las condiciones seleccionadas anteriormente. Se observó una tendencia lineal entre el área obtenida para cada uno de los analitos y su concentración, aunque para algunos de ellos se desviaba para los patrones de mayor concentración. En la tabla 7.3 se muestra el límite superior de linealidad para cada uno de los analitos.

Tabla 7.3. Límite superior de linealidad de los analitos

	BZ4	BZ3	BDM	ODP	OMC	HS	OS
Límite superior	250	$\geq 280$	$\geq 300$	270	225	$\geq 330$	$\geq 330$

Por otra parte, tal y como se demostró en el estudio descrito en el *Capítulo 6* en el que no se empleaba HP- $\beta$ -CD, BZ4 no presentaba comportamiento lineal por debajo de 25  $\mu\text{g/ml}$ , y este comportamiento se atribuía al hecho de que eluía con el frente de elución, de forma que la fluctuación ocasionada por éste afectaba a la señal de BZ4 para concentraciones bajas de este analito. Por el contrario, para concentraciones mayores, esta perturbación es insignificante, y BZ4 ya presenta comportamiento lineal. Durante el desarrollo del presente trabajo, se observó que cuando la cantidad de HP- $\beta$ -CD aumentaba se producía un ligero retraso en la elución de la BZ4, eluyendo a 1.44 min en ausencia de HP- $\beta$ -CD y a 1.56 min en presencia de HP- $\beta$ -CD 65.4 mM empleando EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) como fase móvil a un caudal de 0.5 ml/min. Este pequeño retraso, que también se manifiesta trabajando a 0.6 ml/min, puede ser la causa de que bajo estas condiciones de trabajo BZ4 presente un comportamiento lineal por debajo de 25  $\mu\text{g/ml}$ , tal y como se demuestra en la figura 7.4.

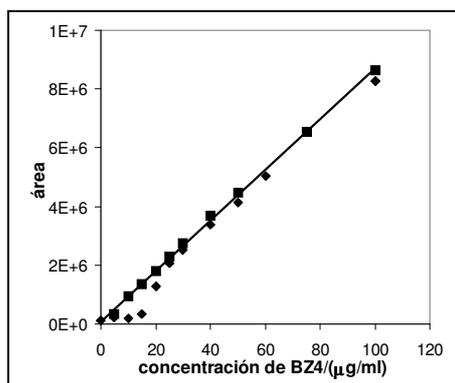


Fig. 7.4. Intervalo lineal de BZ4 en ausencia (♦) y en presencia (■) de HP- $\beta$ -CD 65.4 mM en la fase móvil.

#### 7.2.2.4. Estudio de la señal del butil metoxidibenzoilmetano en función del tiempo:

BDM es susceptible de experimentar tautomería ceto-enólica, ya que presenta una naturaleza  $\beta$ -dicarbonílica. Debido a la conjugación con el anillo aromático, el equilibrio está mayoritariamente desplazado hacia la forma enólica. Según un estudio anterior llevado a cabo por *Wallner (1993)* se recomienda, por seguridad, no inyectar las disoluciones de este filtro UV antes de 2 h desde su preparación, ya que el BDM tarda alrededor de 50 min en establecer el equilibrio entre las formas enólica y cetónica, teniendo ambas diferentes propiedades espectrales, por lo que el área registrada en las condiciones estudiadas cambia continuamente hasta el establecimiento del equilibrio. Teniendo en cuenta este hecho, se preparó una disolución de 50  $\mu\text{g/ml}$  de BDM en etanol, y se inyectó empleando las condiciones cromatográficas elegidas con anterioridad, efectuándose la detección a 313 nm. En la figura 7.5 se muestra el área obtenida frente al tiempo transcurrido desde la preparación de la disolución.

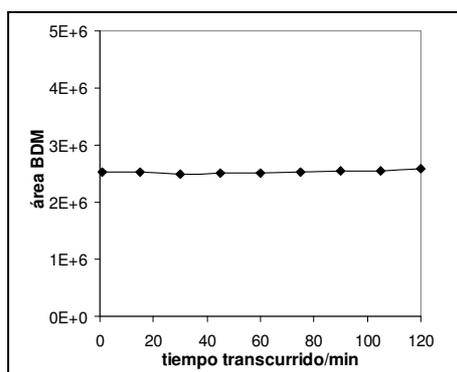


Fig. 7.5. Variación del área de BDM en función del tiempo.

Como puede observarse no se observa ninguna tendencia en la señal obtenida durante el transcurso de 2 h desde la preparación de la disolución de BDM hasta su medida. Se aplicó el contraste de Grubbs para comprobar la existencia de valores anómalos (*Apéndice II*), demostrándose estadísticamente que ninguno de los valores discrepaba del resto a un nivel de significancia de 5 %, por lo que no existe variación en el área del BDM bajo estas condiciones de trabajo, pudiéndose inyectar las disoluciones antes de transcurridas 2 h desde su preparación.

**Procedimiento propuesto para la determinación cromatográfica de filtros UV en productos cosméticos para la protección solar:**

Se pesa por triplicado entre 0.2-1.0 g de muestra, y se disuelven en 25 ml de etanol. Se toma una alícuota de 2 ml (previa filtración con papel Whatman nº 42 si es necesario) y se lleva a un aforado de 10 ml diluyendo con etanol.

Se preparan disoluciones patrón multicomponente, conteniendo de 25 a 150 µg/ml de cada uno de los analitos en etanol.

Tanto las disoluciones patrón como las de las muestras se inyectan en el sistema cromatográfico empleando un bucle de inyección de 20 µl. Se emplea una fase móvil de EtOH:H<sub>2</sub>O:AcOH 70:29.5:0.5 (v/v/v) conteniendo 65.4 mM de HP-β-CD a un caudal de 0.6 ml/min. La detección se efectúa a 313 nm.

**Parámetros analíticos del método propuesto:**

*i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 7.4, siendo **a** la ordenada en el origen (y **s<sub>a</sub>** su desviación estándar), **b** la pendiente (y **s<sub>b</sub>** su desviación estándar), **r<sup>2</sup>** el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado.

Tabla 7.4. Parámetros de las rectas de calibrado de los analitos.

Analito	Intervalo de trabajo* (µg/ml)	a±s <sub>a</sub>	b±s <sub>b</sub> /(ml/µg)	r <sup>2</sup> **
BZ4	25-150	(12±4).10 <sup>4</sup>	(608±4).10 <sup>+2</sup>	0.9998
BZ3	25-150	(7±5).10 <sup>4</sup>	(923±5).10 <sup>+2</sup>	0.99990
BDM	25-150	(-18±3).10 <sup>4</sup>	(481±3).10 <sup>+2</sup>	0.9998
ODP	25-150	(0±10).10 <sup>4</sup>	(2077±11).10 <sup>+2</sup>	0.99990
OMC	25-150	(-1±12).10 <sup>4</sup>	(1790±13).10 <sup>+2</sup>	0.9998
HS	25-150	(-4±1).10 <sup>4</sup>	(181±1).10 <sup>+2</sup>	0.9998
OS	25-150	(2±1).10 <sup>4</sup>	(256±1).10 <sup>+2</sup>	0.99990

\* en apartado 7.2.2.3 se muestra el intervalo lineal

\*\* N=5

*ii) Sensibilidad:*

La sensibilidad del método, estimada mediante la pendiente de la recta de calibrado, varía en función del analito. La sensibilidad obtenida es de 18100 ml/µg para HS que es el menos sensible y de 207700 ml/µg para ODP que es el más sensible, como se observa en la tabla 7.4.

iii) *Límite de detección:*

El límite de detección instrumental (**LD**) estimado mediante el criterio  $3 \cdot s_{y/x}/b$ , donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y **b** la pendiente, se muestra en la tabla 7.5 para cada uno de los analitos.

Tabla 7.5. Límites de detección calculados para los diferentes analitos.

Analito	LD/( $\mu\text{g/ml}$ )
BZ4	2.1
BZ3	1.7
BDM	2.3
ODP	1.6
OMC	2.2
HS	2.3
OS	1.5

iv) *Exactitud:*

Para contrastar la exactitud del método se realizaron varios ensayos.

En primer lugar se realizó un estudio de recuperación aplicando el método descrito a una muestra de crema solar que no contenía filtros, suministrada por Berioska S.L., pesando 0.4 g a los que les se añadió una cantidad conocida de cada uno de los filtros. A continuación se procedió como indica el procedimiento propuesto. De este modo es posible evaluar la posible interferencia en la determinación de los filtros UV de los componentes que habitualmente son utilizados en este tipo de formulaciones. Se determinó la concentración de cada uno de los filtros UV, y se comparó con la aditivada. Los resultados se muestran en la tabla 7.6, donde **C** es la concentración hallada y  $\mu$  la aditivada.

Tabla 7.6. Determinación de los filtros UV estudiados en la muestra exenta de filtros aditivada.

	BZ4	BZ3	BDM	ODP	OMC	HS	OS
$C \pm s / \%$	$2.78 \pm 0.03$	$3.03 \pm 0.014$	$2.7 \pm 0.1$	$3.59 \pm 0.03$	$3.34 \pm 0.03$	$3.31 \pm 0.09$	$3.47 \pm 0.03$
$\mu / (\mu\text{g/ml})$	2.8	3.0	2.7	3.5	3.3	3.2	3.3

Como puede observarse el error relativo cometido en la determinación es menor del 4 % en todos los casos, y en todo caso adecuado para el análisis de este tipo de componentes. Esto demuestra también la inexistencia de interferencia del HS-1 en la determinación de OMC, tal y como se había supuesto previamente.

A continuación se aplicó el método a una muestra sintética (*muestra G*) de crema solar preparada a escala de laboratorio siguiendo el protocolo de los Laboratorios Guinama S.L. (Valencia) (*Anexo 7.1* de este

capítulo), de modo que la cantidad exacta de cada uno de los analitos presente en la muestra era conocida. En la tabla 7.7 se muestran los resultados obtenidos, siendo **C** la concentración hallada y  $\mu$  la concentración real.

Tabla 7.7. Comparación de los valores obtenidos en el análisis de la muestra sintética con los reales.

	BZ4	BZ3	BDM	ODP	OMC	HS	OS
C±s/%	2.40±0.02	5.16±0.02	2.49±0.01	4.19±0.01	4.90±0.05	5.56±0.04	2.45±0.02
$\mu$ /%	2.49	4.98	2.51	4.17	4.97	5.13	2.52

Como puede observarse el error relativo cometido en la determinación es adecuado para llevar a cabo el análisis de este tipo de muestras.

En la figura 7.7 se muestra un cromatograma correspondiente a una de las réplicas del análisis.

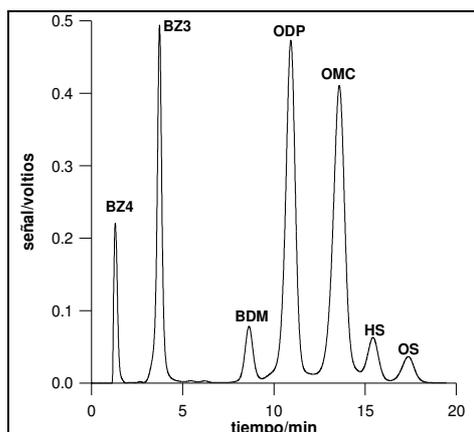


Fig. 7.6. Cromatograma correspondiente a la muestra sintética.

Finalmente se aplicó el método a seis muestras comerciales. En un primer ensayo se prepararon calibrados de adición estándar de cada uno de los analitos en cada una de las muestras en las que se encontraba presente, y las pendientes obtenidas se compararon con las de los calibrados normales, obteniéndose el coeficiente de recuperación (**R**) como:

$$\%R=(b_{a.e.}/b).100$$

siendo  $b_{a.e.}$  la pendiente obtenida en el calibrado de adición estándar y  $b$  la pendiente del calibrado normal.

Los resultados para cada uno de los analitos y muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7.8. Coeficientes de recuperación obtenidos para cada analito y muestra.

Muestra	% R						
	BZ4	BZ3	BDM	ODP	OMC	OS	HS
A	-	103±1	-	101±2	102±3	-	-
B	-	98±4	-	103±4	-	99±2	95±2
C	97±2	-	-	-	-	-	-
D	100±2	101±1	102±1	-	-	-	-
E	-	-	97±1	-	99±3	-	-
F	-	-	103±1	-	102±3	-	-

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar la inexistencia de errores proporcionales a la concentración de los analitos ocasionados por la matriz de las muestras.

Finalmente se determinó la concentración presente de los analitos en las muestras comerciales. Los resultados se muestran en la tabla 7.9, y en la figura 7.7 se muestra un cromatograma de cada una de las muestras.

Tabla 7.9. Resultados obtenidos en el análisis de las seis muestras comerciales.

Muestra	C±s/ % (m/m)						
	BZ4	BZ3	BDM	ODP	OMC	HS	OS
A	N.D.*	1.56±0.01	N.D.	2.29±0.02	0.50±0.02	N.D.	N.D.
B	N.D.	5.19±0.04	N.D.	N.D.	7.3±0.3	3.58±0.05	5.13±0.07
C	0.436±0.006	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	0.139±0.006	0.74±0.02	2.21±0.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E	N.D.	N.D.	1.597±0.008	N.D.	7.62±0.07	N.D.	N.D.
F	N.D.	N.D.	0.76±0.02	N.D.	8.0±0.1	N.D.	N.D.

\* No detectable

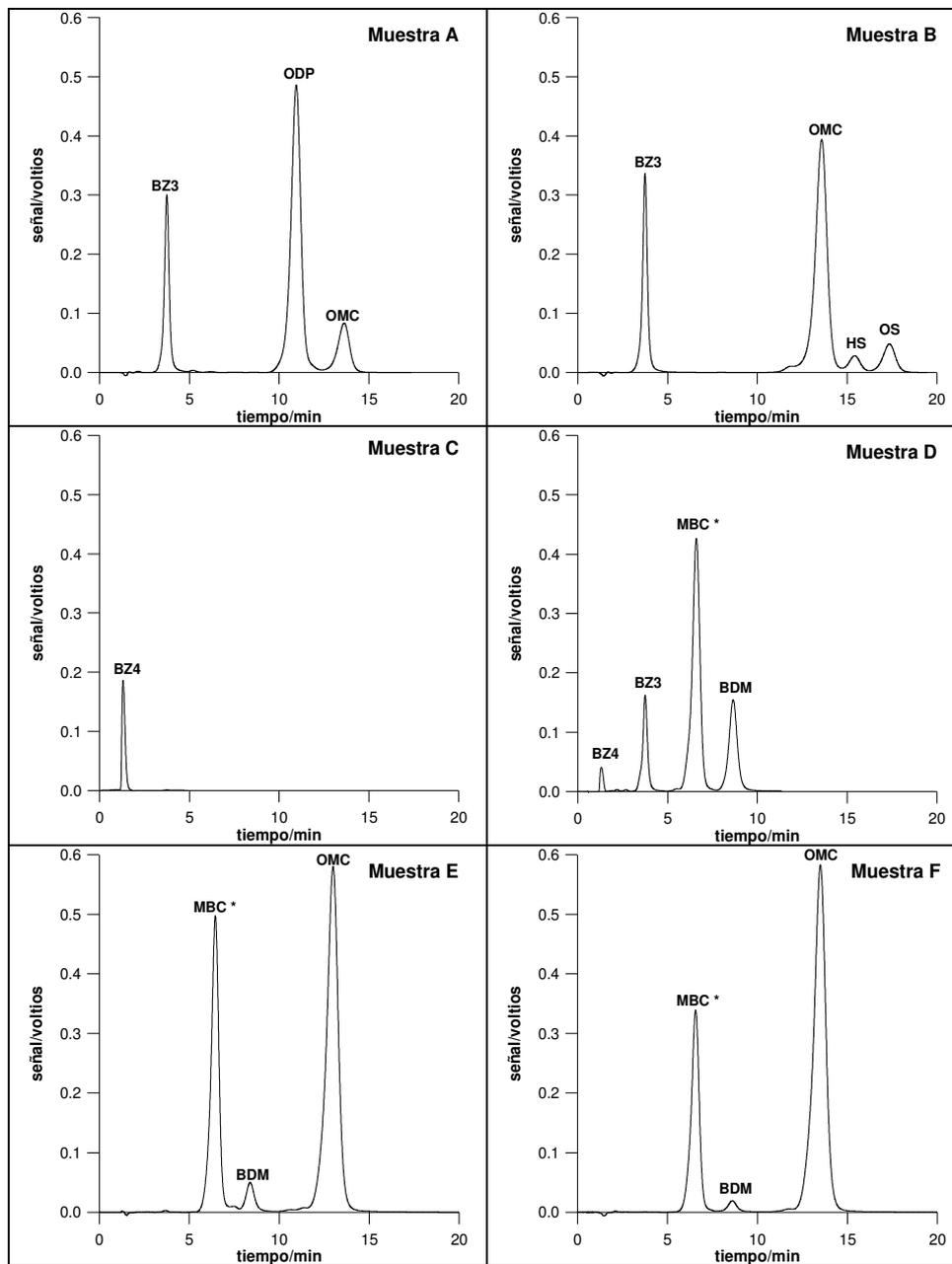


Fig. 7.6. Cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras comerciales (A, B, C, D, E y F) analizadas aplicando el método propuesto.

\* Se trata de otro filtro, 4-metilbenciliden canfor (MBC), que no es considerado en este estudio.

*v) Precisión.*

Los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de las cinco muestras oscilan entre 0.5-4 %

*vi) Tiempo de análisis:*

Cada cromatograma puede realizarse en menos de 20 minutos, determinándose los 7 filtros estudiados.

**7.3. CONCLUSIONES**

Se ha puesto a punto un método cromatográfico para la determinación de los siete filtros UV aprobados a nivel internacional.

El uso de ciclodextrinas como aditivo de la fase móvil permite modificar las propiedades cromatográficas de algunos de los analitos mediante la inclusión de éstos en la concavidad de la ciclodextrina, permitiendo su resolución.

El método propuesto presenta una sensibilidad adecuada para este tipo de análisis, presentando buenos límites de detección.

La exactitud ha quedado contrastada mediante el análisis de una muestra exenta de filtros aditivada y de una muestra sintética preparada en el laboratorio, presentando errores inferiores al 8 %. Asimismo los coeficientes de recuperación obtenidos del análisis de muestras comerciales son cercanos al 100 %.

Los coeficientes de variación obtenidos oscilan entre 0.5-4 %, presentando, por tanto, una precisión adecuada para el control analítico de este tipo de productos.

Se pueden determinar los 7 filtros en menos de 20 minutos.

El disolvente empleado en la fase móvil ha sido etanol, evitándose por tanto el empleo de disolventes orgánicos de mayor toxicidad, por lo que se puede considerar que no existe toxicidad ambiental en el laboratorio durante la sesión de trabajo, y que el método propuesto es un método de análisis limpio.

### **ANEXO 7.1: Elaboración de una crema solar conteniendo los filtros UV determinados**

Se elaboró una muestra de crema solar siguiendo el protocolo de fabricación proporcionado por los laboratorios Guinama S.L. (Valencia). A continuación se detalla la composición y el modo de preparación.

**Componentes:** **Base PFC o/w** (crema base para elaboración de emulsiones aceite/agua, compuesta por una mezcla de miristato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila), **Aceite de aguacate** (su función principal es la de sobreengrasante de la piel y dermoprotector, se trata de una mezcla natural de ácidos grasos saturados, oléico y linoléico), **Dimeticona 350** (se trata de una mezcla de polímeros entre los que se encuentra la dimetilsilicona y dimetilsiloxano, y su función es la de ayudar a la elaboración de emulsiones y proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto, además de actuar como vehículo de componentes activos), **Vitamina E** (su función es la de actuar como antioxidante), **Propilenglicol** (su función es la de emulgente, impidiendo la desecación de la capa córnea de la epidermis), **Hidrovitón** (se trata de un preparado a base de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes, cloruro sódico y humectantes, cuya función es la de hidratar la piel), **Phenonip** (mezcla de parabenos y fenoxietanol, cuya función es la de conservador).

*Nota: estos componentes utilizados para la elaboración de la crema fueron adquiridos en los laboratorios Guinama S.L.*

#### **MUESTRA SINTÉTICA G:**

Fase A)	Base PFC o/w .....	18 %
	Aceite de aguacate .....	5 %
	Dimeticona 350 .....	5 %
	Vitamina E .....	0.5 %
	Benzofenona-4 (BZ4) .....	2.5 %
	Benzofenona-3 (BZ3) .....	5 %
	Butil metoxidibenzoilmetano (BDM) .....	2.5 %
	Octil dimetil PABA (ODP) .....	4 %
	Octil metoxicinamato (OMC) .....	5 %
	Octil salicilato (OS) .....	2.5 %
	Homosalato (HS) .....	5 %

Fase B)	Propilenglicol .....	5 %
	Hidrovitón .....	4 %
	Agua c.s.p. ....	100 %
Fase C)	Phenonip .....	0.5 %

**Elaboración de la crema:**

- 12) Pesar los componentes de las fases A y B en dos vasos de precipitados, tapar con vidrio de reloj y poner a baño María hasta que funda la fase A (aprox. 70°C).
- 13) Verter la fase B sobre la A muy lentamente y bajo agitación continua.
- 14) Sacar del baño María y sin dejar de agitar dejar enfriar hasta temperatura ambiente, adicionando la fase C a unos 30-35°C. Seguir agitando hasta homogeneización.



## CAPÍTULO 8

### **DETERMINACIÓN DE FILTROS UV HIDROSOLUBLES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

Parte del contenido de este Capítulo ha sido publicado en *J Chromatogr A* (2002) 977:277-280, y presentado como cartel en las 10<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona, 2002.



## 8.1. INTRODUCCIÓN

### 8.1.1. Interés de la determinación de filtros UV en aguas solares:

Aunque lo usual es encontrarse con cremas y lociones oleosas en los que muchos de los filtros orgánicos se incorporan disueltos en la fase oleosa de la formulación, recientemente se pueden obtener en el mercado lociones acuosas de fácil aplicación en forma de *spray*. La mayoría de los fabricantes de este tipo de formulaciones incorporan los filtros hidrosolubles denominados ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS) y benzofenona-4 (BZ4) (para los que se ha propuesto un método analítico para su determinación en el *Capítulo 4* de esta Tesis Doctoral), que presentan un grupo sulfónico en su estructura fácil de disociar y que les confiere su solubilidad en la fase acuosa.

Estos filtros se utilizan solos o combinados entre sí para proporcionar el Factor de Protección Solar (FPS) deseado. Mientras que PBS es un filtro UVB, BZ4 presenta absorción tanto en el UVB como en el UVA, si bien en esta última zona presenta menor absorptividad molar. Recientemente ha aparecido en el mercado un nuevo filtro solar hidrosoluble con una alta absorptividad molar en la zona UVA, denominado ácido tereftaliden dicánfor sulfónico (TDS), cuyo uso está patentado por la empresa de cosméticos L'Oréal al que denomina Mexoryl® SX.

En la figura 8.1 se muestran los espectros de absorción de estos tres filtros UV.

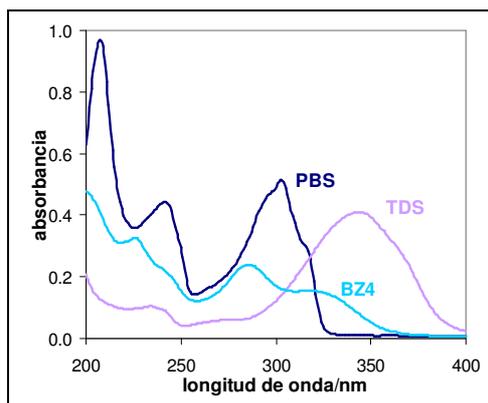


Fig. 8.1. Espectros de absorción de 5 µg/ml de PBS, TDS y BZ4 en agua.

Según la normativa europea (tabla 1.2, Capítulo 1 de esta memoria), PBS puede emplearse hasta un 8 %, TDS hasta un 10 % y BZ4 sólo hasta un 5 %.

### **8.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:**

Aunque no existe ningún método oficial para el análisis de estos tres compuestos, en lo que se refiere al análisis de PBS y BZ4 en la bibliografía analítica se pueden encontrar unos pocos artículos en los que se determinan empleando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (*Eiden y Tittel, 1981 a; Eiden y Tittel, 1981 b; König y Ryschka, 1983; König, 1984; Gagliardi et al., 1989; Wallner, 1993; Schneider et al., 1996*), y tan sólo uno basado en la cromatografía micelar electrocinética (MEKC) (*Pietta et al., 1995*) y la espectrometría UV empleando espectros derivados (*Azevedo et al., 1999*) pero en muchos de ellos no analizan muestras reales de protectores solares, o bien son muestras aditivadas.

En lo que al análisis de TDS se refiere, tan sólo aparece un artículo publicado recientemente por *Rastogi (2002)*, en el que se determina TDS junto a otros filtros UV, pero no junto a PBS ni BZ4.

Por otra parte, *Rastogi y Jensen (1998)* proponen un método de análisis cualitativo para la determinación de 20 filtros UV en productos solares (entre los que se encuentran PBS, TDS y BZ4), basado en la comparación del tiempo de retención y del espectro UV de las muestras con una base de datos hallada previamente con disoluciones patrón de los filtros UV, pero no se realiza su cuantificación.

### **8.1.3. Justificación del objetivo de trabajo:**

En el presente trabajo se pretende poner a punto una metodología analítica que permita la determinación simultánea de los tres filtros UV que habitualmente se utilizan en muestras de aguas solares mediante el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia, evitando el uso de disolventes orgánicos tóxicos.

Estos tres filtros UV no habían sido hasta el momento determinados conjuntamente.

## **8.2. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN DE FILTROS UV HIDROSOLUBLES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

### **8.2.1. Método propuesto. Parte experimental:**

#### **8.2.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un cromatógrafo de HPLC marca Hitachi con bucle de inyección de 20 µl, con bomba de alta presión Hitachi modelo L-7100 y con detector UV/VIS Hitachi modelo L-7420. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> (LiChrospher® RP-18 (12.5 cm x 4 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm)) de la casa comercial Merck.

También se empleó un pHmetro Crison modelo microPH 2001.

#### **8.2.1.2. Reactivos y muestras:**

Ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS) 99 % (Guinama S.L., Valencia), ácido tereftaliden dicanfor sulfónico (sal de trietanolamina) (TDS) 99 % (L'Oreal, Madrid), benzofenona-4 (BZ4) 99.9 % (Roig Farma, S.A., Terrassa, Barcelona), hidróxido sódico para análisis (Probus, Badalona, Barcelona), etanol (EtOH) grado HPLC (Scharlab, Barcelona), ácido acético para análisis (Panreac, Barcelona) y agua desionizada (empleando un sistema NANOpureII de Barnstead (Boston, EEUU)).

Las muestras comerciales analizadas fueron las siguientes: Agua Solar Babe FPS 4 (*muestra A*), Agua Solar Babe FPS 8 (*muestra B*) y Agua Solar Babe FPS 12 (*muestra C*) (Laboratorios RNB S.L., Paterna, Valencia). Agua Solar Babaria FPS 8 (*muestra D*), Agua Solar Babaria FPS 12 (*muestra E*) y Agua Solar Babaria FPS 4 (*muestra H*) (Laboratorios Berioska S.L., Cheste (Valencia)). Agua Solar Nievina FPS 2 (*muestra F*) y Agua Solar Nievina FPS 2 (*muestra G*) (Laboratorios Vigmar, Valencia). Agua Solar Ambre Solaire FPS 3 (*muestra I*) y Agua Solar Ambre Solaire FPS 6 (*muestra J*) (Laboratoires Garnier, Paris, Francia).

Se preparó una muestra en el laboratorio (*muestra K*) de acuerdo con el protocolo facilitado por Berioska S.L. (Cheste, Valencia), tal y como se detalla en el *Anexo 8.1* de este capítulo).

### 8.2.1.3. Metodología de trabajo:

En primer lugar se estudiaron las variables cromatográficas tales como composición y pH de la fase móvil, caudal y disolvente a emplear en la disolución de la muestra, seleccionando aquellos valores que producían mejor resolución en el menor tiempo posible de análisis. A continuación, se realizaron experiencias para evaluar la repetibilidad de los tiempos de retención de los analitos y del área de los picos cromatográficos. Posteriormente se estudió la linealidad, y finalmente se aplicó el método a una muestra sintética elaborada según un protocolo habitual de los laboratorios cosméticos, y a diez muestras comerciales de aguas solares determinando el porcentaje de recuperación y el contenido de cada uno de los analitos presente en las muestras.

En el *apartado 8.2.2* se detallan todos los estudios realizados y los resultados obtenidos en cada uno de ellos, así como el procedimiento experimental propuesto y sus características analíticas.

### 8.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:

#### 8.2.2.1. Estudio de las variables cromatográficas:

En primer lugar se estudió la influencia que el pH y la composición de la fase móvil podía tener sobre los tiempos de retención de los analitos, con el fin de seleccionar aquellos valores de las variables que proporcionaban una buena resolución de los picos de los analitos en el menor tiempo posible.

Así pues, empleando una fase móvil tampón acetato 20 mM:EtOH 70:30 (v/v) con un caudal de 1 ml/min se estudió la influencia del pH del tampón inyectando por separado disoluciones de 25 µg/ml en agua de cada uno de los tres analitos. De igual forma se estudió la composición de la fase móvil empleando una fase móvil tampón acetato 20 mM pH=3:EtOH a un caudal de 1 ml/min conteniendo diferentes proporciones de EtOH. Los resultados se muestran en la figura 8.2.

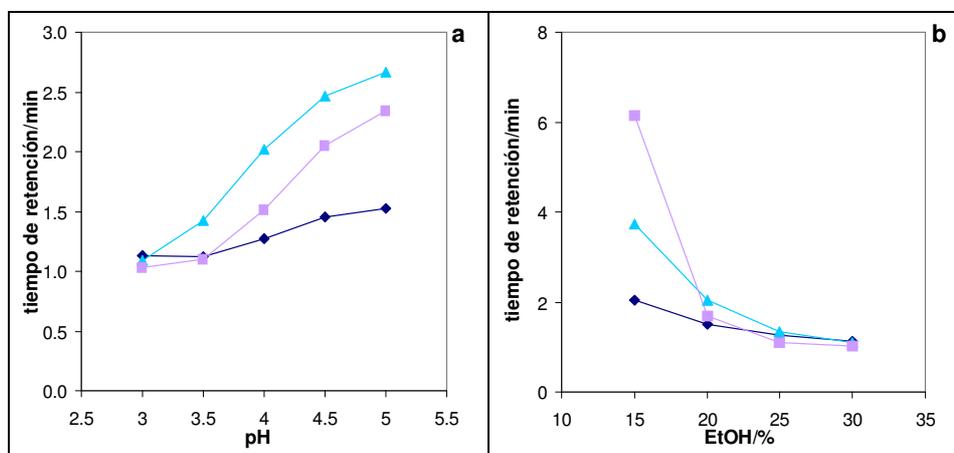


Fig. 8.2. (a) Influencia del pH de la fase móvil empleando una fase móvil tampón acetato 20 mM pH variable:EtOH 70:30 (v/v) a un caudal de 1 ml/min y (b) influencia de la composición de la fase móvil empleando una fase móvil tampón acetato 20 mM pH=3:EtOH (v/v) a un caudal de 1 ml/min. (◆) PBS, (■) TDS y (▲) BZ4.

Como puede observarse un aumento del pH provoca una mayor retención de los analitos, y una disminución del contenido en EtOH también provoca el mismo efecto, pero no les afecta de igual manera a todos los analitos, por lo que se observan entrecruzamientos en el orden de elución.

Por tanto se puede concluir que la resolución (**Rs**) de los picos puede conseguirse variando tanto el pH como el porcentaje de EtOH en la fase móvil, de forma que con contenido bajo en EtOH y pH bajo o bien con contenido mayor en EtOH y pH también mayor se podrían separar los picos. Debido a la similar influencia de ambas variables se procederá a estudiar su efecto conjuntamente mediante el uso del algoritmo SIMPLEX descrito en *Alpizar et al., 1997, pág. 169*, intentando obtener la máxima resolución entre los tres picos en el menor tiempo posible de análisis. Las condiciones de partida, incremento y rango de estudio de las variables se muestran en la tabla 8.1.

Tabla 8.1. Datos de interés del algoritmo SIMPLEX empleado.

Variable	Cond. Iniciales	Incremento	Rango de estudio
pH	3	0.5	3-6
% EtOH	30	5	15-35

Los mejores resultados se obtenían alrededor de pH=4.5 y 30 % de EtOH. Así pues se estudió esta zona con más detenimiento mediante la construcción de otro SIMPLEX de menor tamaño alrededor de la zona de pH=4.5 y 30 % de EtOH. Las condiciones se muestran en la tabla 8.2.

Tabla 8.2. Datos de interés del algoritmo SIMPLEX empleado.

Variable	Cond. Iniciales	Incremento	Rango de estudio
pH	4.3	0.2	4.3-4.9
% EtOH	32	2	28-32

La máxima resolución entre los 3 picos se obtuvo empleando una fase móvil con una proporción 30 % en EtOH y un pH entre 4.5-4.7. Se seleccionó un pH=4.6 como valor óptimo. En estas condiciones PBS, TDS y BZ4 eluyen consecutivamente en menos de 3 min, con casi total resolución.

Una vez seleccionados los valores óptimos para estas dos variables en estudio, se estudió la influencia del caudal con el fin de asegurar la total resolución ( $R_s \geq 1$ ) entre los tres picos. En la figura 8.3 se muestra el efecto del caudal sobre los tiempos de retención de los analitos.

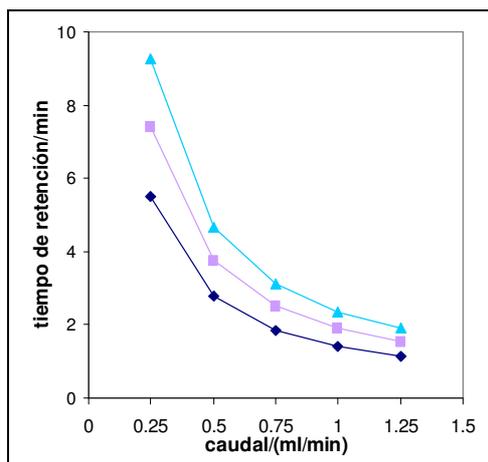


Fig. 8.3. Influencia del caudal de la fase móvil empleando una fase móvil EtOH:tampón acetato 20 mM pH=4.6 30:70 (v/v). (◆) PBS, (■) TDS, (▲) y BZ4.

A partir de 0.5 ml/min la resolución alcanzada ya no es total ( $R_s < 1$ ), por lo que se seleccionó este valor del caudal para llevar a cabo el procedimiento de análisis. En la siguiente figura se muestra el cromatograma obtenido empleando las variables seleccionadas para una mezcla de 25  $\mu\text{g/ml}$  de los tres analitos en agua.

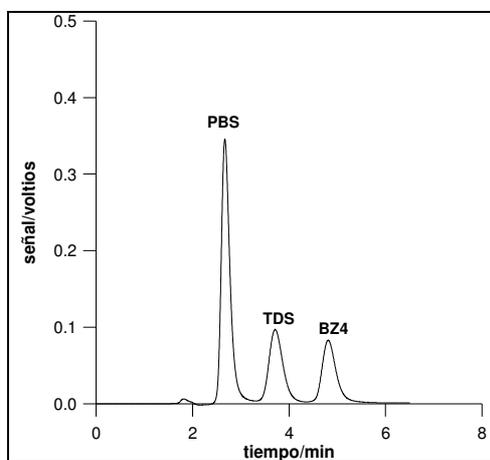


Fig. 8.4. Cromatograma de una disolución acuosa conteniendo 25  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los tres analitos.

Con el fin de evitar problemas en la integración del PBS, que eluye muy próximo al tiempo muerto ( $t_0$ ) donde aparece una fluctuación como consecuencia del cambio de disolvente, se prefirió escoger como disolvente de los patrones y muestra la propia fase móvil. En la siguiente figura se muestra un cromatograma empleando fase móvil como disolvente.

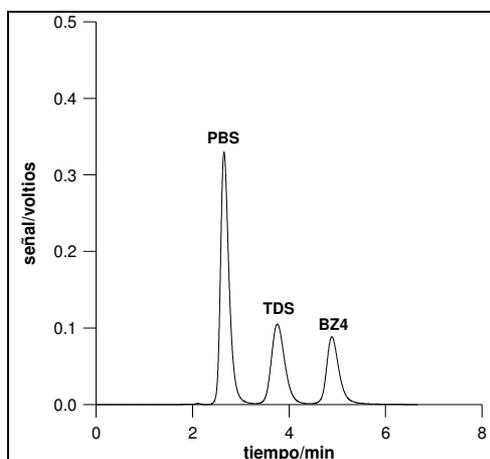


Fig. 8.5. Cromatograma de una disolución de fase móvil conteniendo 25  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los tres analitos.

### 8.2.2.2. Estudio de la influencia de la luz UV:

Con el fin de estudiar como repercutía la luz ambiental del laboratorio sobre los patrones, en especial de TDS del que se no se disponía de información ni experiencias preliminares, se prepararon disoluciones patrón de los tres analitos empleando como disolvente la fase móvil, permaneciendo una de ellas en oscuridad y otra en condiciones normales de trabajo en el laboratorio. Se inyectaron en el cromatógrafo al cabo de una hora. El caudal se aumentó a 2 ml/min a partir de 6 min con el fin de acelerar la elución de posibles picos. En figura 8.6 se muestran los cromatogramas de una disolución recién preparada (a), otra al cabo de una hora en oscuridad (b) y otra al cabo de una hora sometida a condiciones ambientales de luz (c).

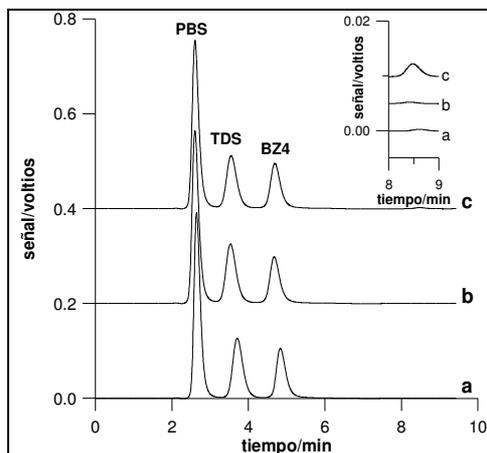


Fig. 8.6. Cromatograma obtenido para una disolución multicomponente de los tres analitos recién preparado (a), 1 h en oscuridad (b) y 1 h en condiciones normales de luz ambiental del laboratorio (c).

Es de destacar que mientras la disolución mantenida en oscuridad presenta la misma área para TDS que la recién preparada, la mantenida en condiciones normales de luz durante una hora presentó una disminución del área del 13 % para el pico de TDS además de presentar un pequeño pico alrededor de 8.5 min. Esto podría deberse a la conversión de TDS en uno de sus isómeros, como consecuencia de la luz UVA (Cantrell *et al*, 1999) o bien a productos de degradación. Esto podría ocasionar un error en la determinación de TDS, por lo que una vez preparados las disoluciones de patrones y muestras se deben resguardar de la luz hasta el momento de su inyección.

### 8.2.2.3. Repetibilidad del tiempo de retención y del área de los picos cromatográficos:

Se inyectó cinco veces una disolución patrón conteniendo una mezcla de 25 µg/ml de cada uno de los analitos empleando como disolvente la propia fase móvil, y se estudió la repetibilidad del tiempo de retención ( $t_r$ ) y del área. Los resultados se muestran en la tabla 8.3.

Tabla 8.3. Estudio de la repetibilidad del  $t_r$  y del área.

analito	$t_r \pm s$ /min	CV área/%
PBS	2.69±0.01	0.04
TDS	3.65±0.02	0.43
BZ4	4.74±0.02	1.81

CV = coeficiente de variación

Como se observa, la precisión obtenida tanto en el tiempo de retención como en el área es adecuada para llevar a cabo el análisis de este tipo de muestras.

#### ***Procedimiento propuesto para la determinación cromatográfica de filtros UV hidrosolubles en productos cosméticos para la protección solar:***

Se pesa por triplicado entre 0.01-0.1 g de agua solar diluyendo a 10 ml con la propia fase móvil.

Se preparan disoluciones patrón multicomponente conteniendo PBS (15-75 µg/ml), TDS (10-50 µg/ml) y BZ4 (10-50 µg/ml) empleando como disolvente la fase móvil.

Tanto las disoluciones patrón como las de las muestras se mantienen en oscuridad hasta el momento de inyectarlas en el sistema cromatográfico. Para llevar a cabo el desarrollo cromatográfico se inyectan cada una de las disoluciones empleando un bucle de inyección de 20 µl. La fase móvil es una disolución tampón acetato 20 mM pH=4.6:etanol 70:30 (v/v) a un caudal de 0.5 ml/min. La detección se efectúa a 313 nm.

**Parámetros analíticos del método propuesto:***i) Linealidad:*

Los parámetros de interés se muestran en la tabla 8.4, siendo **a** la ordenada en el origen (y  $s_a$  su desviación estándar), **b** la pendiente (y  $s_b$  su desviación estándar),  $r^2$  el coeficiente de regresión y **N** el número de puntos de las rectas de calibrado.

Tabla 8.4. Parámetros de las rectas de calibrado de los analitos.

Analito	Intervalo de trabajo	$a \pm s_a$	$b \pm s_b / (\text{ml}/\mu\text{g})$	$r^2$ ***
PBS	15-75 $\mu\text{g/ml}$ *	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-5}$	$(185 \pm 3) \cdot 10^{+3}$	0.9994
TDS	10-50 $\mu\text{g/ml}$ **	$(-10 \pm 3) \cdot 10^{+4}$	$(948 \pm 9) \cdot 10^{+2}$	0.9997
BZ4	10-50 $\mu\text{g/ml}$ **	$(-2 \pm 1) \cdot 10^{+4}$	$(722 \pm 4) \cdot 10^{+2}$	0.99992

\* lineal hasta 100  $\mu\text{g/ml}$ \*\* lineal hasta 200  $\mu\text{g/ml}$ 

\*\*\* N=5

*ii) Sensibilidad:*

La sensibilidad del método estimada mediante la pendiente de la recta de calibrado varía en función del analito, ya que a la longitud de onda de medida los analitos presentan diferente sensibilidad como consecuencia de su espectro de absorción. La sensibilidad obtenida oscila entre 72200  $\text{ml}/\mu\text{g}$  para BZ4 que es el filtro UV que presenta menos sensibilidad y 185000  $\text{ml}/\mu\text{g}$  para PBS que es el que presenta mayor sensibilidad, como se observa en la tabla 8.4.

*iii) Límite de detección:*

El límite de detección instrumental (LD) estimado mediante el criterio  $3 \cdot s_{y/x} / b$ , donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y **b** la pendiente, se muestra en la tabla 8.5 para cada uno de los analitos.

Tabla 8.5. Límites de detección calculados para los diferentes analitos.

Analito	LD/ $(\mu\text{g/ml})$
PBS	2.0
TDS	0.9
BZ4	0.5

iv) *Exactitud:*

Para contrastar la exactitud del método se realizaron varios ensayos.

En primer lugar se aplicó el método descrito a una muestra sintética de agua solar preparada a escala de laboratorio (*muestra K*) siguiendo el protocolo habitual de la empresa Berioska S.L. (*Anexo 8.1* de este capítulo), de forma que la cantidad exacta de cada uno de los analitos presente en la muestra era conocida. En la tabla 8.6 se muestran los resultados obtenidos, siendo **C** la concentración hallada y  **$\mu$**  la concentración real.

Tabla 8.6. Comparación de los valores obtenidos con los reales.

	PBS	TDS	BZ4
C $\pm$ s/%	1.818 $\pm$ 0.009	1.90 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.01
$\mu$ /%	1.85	1.93	1.16

Como puede observarse el error relativo cometido en la determinación es menor del 2 %, mostrando una gran exactitud en la determinación simultánea de los tres analitos.

En la figura 8.9 se muestra el cromatograma obtenido para la muestra sintética.

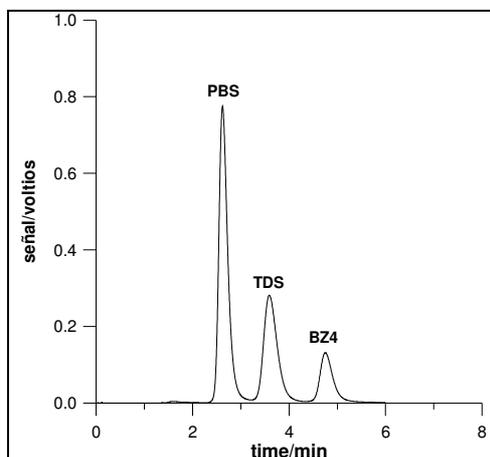


Fig. 8.9. Cromatograma obtenido para la muestra sintética.

A continuación se aplicó el método a 10 muestras comerciales. En un primer ensayo se prepararon calibrados de adición estándar de cada uno de los analitos en cada una de las muestras en las que se encontraba

presente, y las pendientes obtenidas se compararon con las de los calibrados normales, obteniéndose el coeficiente de recuperación (**R**) como:

$$\%R=(b_{a.e.}/b)\cdot 100$$

siendo **b<sub>a.e.</sub>** la pendiente obtenida en el calibrado de adición estándar y **b** la pendiente del calibrado normal. Los resultados para cada uno de los analitos y muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8.7. Coeficientes de recuperación obtenidos para cada analito y muestra.

Muestra	PBS	TDS	BZ4
A	98±5	-	104±5
B	99±2	-	105±2
C	98±1	-	100±1
D	99±1	-	101±1
E	100±2	-	102±1
F	-	-	101±2
G	101±2	-	-
H	100±2	-	-
I	100±1	98±4	-
J	102±1	101±4	-

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar la inexistencia de errores proporcionales a la concentración de los analitos ocasionados por la matriz de las muestras.

Finalmente se determinó la concentración presente de los analitos en las muestras comerciales. En la figura 8.10 se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para la muestra A conteniendo PBS y BZ4 y para la muestra J conteniendo PBS y TDS. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.8.

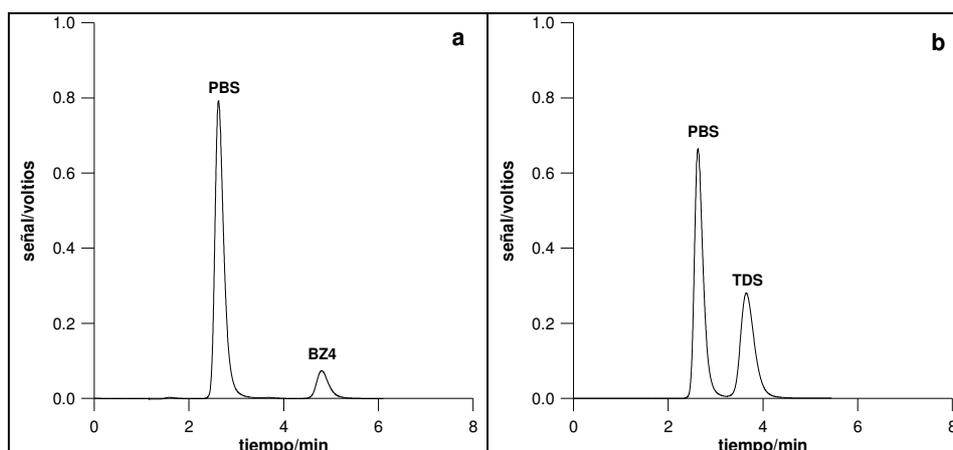


Fig. 8.10. Cromatogramas obtenidos para las muestras A (a) y J (b).

Tabla 8. Resultados obtenidos en el análisis de muestras reales.

Muestra	C $\pm$ s % (m/m)		
	PBS	TDS	BZ4
A	1.59 $\pm$ 0.01	N.D.	0.541 $\pm$ 0.003
B	3.17 $\pm$ 0.04	N.D.	1.097 $\pm$ 0.009
C	4.24 $\pm$ 0.09	N.D.	1.59 $\pm$ 0.05
D	3.28 $\pm$ 0.01	N.D.	1.088 $\pm$ 0.004
E	5.01 $\pm$ 0.09	N.D.	1.63 $\pm$ 0.03
F	N.D.	N.D.	0.50 $\pm$ 0.02
G	0.44 $\pm$ 0.03	N.D.	N.D.
H	0.931 $\pm$ 0.003	N.D.	N.D.
I	1.48 $\pm$ 0.04	0.210 $\pm$ 0.007	N.D.
J	1.48 $\pm$ 0.03	1.88 $\pm$ 0.05	N.D.

\* No detectable.

*v) Precisión.*

Los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de las diez muestras oscilan entre 0.3-6.8 % para la determinación de PBS, 2.7-3.3 % para la de TDS y entre 0.3-4.0 % para la de BZ4. Por tanto se puede llevar a cabo la determinación de una manera precisa.

*vi) Tiempo de análisis:*

Cada cromatograma puede realizarse 5.5 minutos, determinándose los tres filtros estudiados.

**8.3. CONCLUSIONES**

Se ha puesto a punto un método cromatográfico para la determinación de los tres filtros UV que habitualmente se emplean en las formulaciones cosméticas para la protección solar con matriz acuosa.

El método propuesto presenta una sensibilidad adecuada para este tipo de análisis, presentando buenos límites de detección.

La exactitud se ha evaluado mediante el análisis de una muestra sintética preparada en el laboratorio, presentando errores inferiores al 2 %. Asimismo los coeficientes de recuperación obtenidos del análisis de muestras comerciales oscilan entre 98-105 %.

Los coeficientes de variación obtenidos son adecuados para llevar a cabo el análisis de una manera precisa.

Se pueden determinar simultáneamente los tres filtros en 5.5 minutos.

El disolvente empleado en la fase móvil ha sido etanol, evitándose por tanto el empleo de disolventes orgánicos de mayor toxicidad, por lo que se puede considerar que no existe toxicidad ambiental en el laboratorio durante la sesión de trabajo y que se trata de un método de análisis limpio.

### **ANEXO 8.I: Elaboración de un agua solar conteniendo los filtros UV estudiados**

La elaboración del agua solar se realizó según el protocolo de los laboratorios Berioska S.L., de forma que en la composición final se encontrasen los tres filtros UV estudiados en una concentración conocida dentro de los rangos permitidos por la legislación vigente. A continuación se detalla la composición y el modo de preparación.

**Componentes:** **Agua** (es el constituyente principal de la matriz), **Polisorbato-80** (se trata de un emulgente no iónico sintético), **Perfume** (su función es la proporcionar un olor agradable), **Kathon** (disolución acuosa de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, cuya función es la de conservante), **Dimeticona copoliol** (mezcla de polímeros entre los que se encuentra la dimetilsilicona y dimetilsiloxano, cuya misión es la de proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto, además de actuar como vehículo de componentes activos), **Aloe vera** (actúa como nutriente de la piel), **Acelerador del bronceado** (preparado rico en tirosina y riboflavina que favorece el proceso de formación de melanina en la piel), **PEG-7 Gliceril cocoato** (actúa como vehículo para la solución de aceites y principios activos liposolubles), **EDTA** (su función es la de capturar iones libres que puedan estar presentes para evitar así la formación de complejos coloreados), **Glicerina** (proporciona suavidad y una película protectora sobre la piel).

*Nota:* estos componentes utilizados para la elaboración del agua solar fueron proporcionados por Berioska S.L.

#### **MUESTRA SINTÉTICA K:**

Fase A)	Polisorbato-80 .....	2 %
	Perfume .....	0.2 %
	Agua .....	20 %
Fase B)	Kathon .....	0.2 %
	Dimeticona copoliol .....	0.5 %
	Aloe vera. ....	0.2 %
	Acelerador del bronceado .....	1 %
	PEG-7 Gliceril cocoato .....	2 %
	Disolución de EDTA 1 % .....	0.2 %
	Glicerina .....	5 %
	Agua c.s.p. ....	100 %

Fase C)	Ácido fenilbenzimidazol sulfónico (PBS)..	2 %
	Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico (sal de trietanolamina) (TDS) .....	2.5 %
	Benzofenona-4 (BZ4) .....	1.2 %
	Agua .....	20 %
	Trietanolamina. ....	c.s.

#### **Elaboración del agua solar:**

- 15) Preparar la fase A en vaso de precipitados, agitando fuertemente cuando se mezclan los dos componentes oleosos con el agua.
- 16) Preparar la fase B en vaso de precipitados.
- 17) Preparar la fase C en un vial de la siguiente forma: se pesan los tres filtros y se añade el agua, y se adiciona la trietanolamina necesaria para la disolución total de los filtros.
- 18) Añadir la fase A y B sobre la C.
- 19) Comprobar que pH está entre 7-7.5, y de no ser así ajustar con trietanolamina.

## **CUARTA PARTE:**

### **DETERMINACIÓN DE FILTROS UV EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**



## **CAPÍTULO 9**

### **DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE ÁCIDO FENIL BENCIMIDAZOL SULFÓNICO EN ORINA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN SECUENCIAL**

El contenido de este Capítulo ha sido aceptado para su publicación en la revista *Talanta*, y presentado como cartel en la *XII Reunión Científica de la Sociedad Española de Química Analítica*, Huelva, 2001.



## 9.1. **INTRODUCCIÓN**

### 9.1.1. **Interés de la determinación de filtros UV en orina:**

Un protector solar debería permanecer donde es más efectivo, esto es, en la superficie de la piel. Idealmente, debería impregnar el estrato córneo y crear una barrera de protección frente a la radiación UV solar, pero no penetrar en los tejidos (*Nohynek y Schaefer, 2001*). Sin embargo, en la bibliografía médica se pueden encontrar diferentes estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* (*Okereke et al., 1994; Hagedorn-Leweke y Lippold, 1995; Treffel y Gabard, 1996; Potard et al., 1999; Fernández et al., 2000*) que evidencian la absorción a través de la piel de algunos filtros UV de naturaleza orgánica. Además, como se ha indicado en varias ocasiones a lo largo de la presente memoria, se han descrito diversos problemas dermatológicos en usuarios de productos para la protección solar que incorporan filtros UV (*Funk et al., 1995; Schauder e Ippen, 1997; Berne y Ros, 1998; Cook y Freeman, 2001*).

Estudios llevados a cabo en animales de experimentación muestran que la principal vía de excreción de algunos UV es la urinaria (*Kadry et al., 1995*). Por ello, es de interés el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos que permitan determinar niveles traza en la orina de los usuarios de productos cosméticos para la protección solar, posibilitando el estudio de los procesos de absorción/excreción de estos compuestos, con el fin de facilitar estudios sobre su posible efecto toxicológico.

Como ya se ha indicado anteriormente, recientemente se han desarrollado lociones acuosas, que se aplican mediante vaporizador sin necesidad de frotar, por lo que su aplicación es más rápida y confortable para el usuario. Estas formulaciones incorporan filtros hidrosolubles, ya que presentan una matriz principalmente acuosa. Uno de los filtros principalmente utilizados en este tipo de formulaciones es el ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS), que posee un grupo sulfónico fácil de disociar (ver apartado 1.3.1, Capítulo 1 de esta memoria) provocando su solubilidad en una matriz acuosa, del que se han descrito algunas reacciones alérgicas (*Schauder e Ippen, 1997; Berne y Ros, 1998*).

En el presente trabajo se pretende poner a punto un método analítico que permita la determinación de PBS en muestras de orina.

### **9.1.2. Antecedentes y estado actual del tema:**

*Hany y Nagel (1995)* determinaron benzofenona-3 y octil metoxicinamato en leche humana mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas, obteniendo límites de detección entre 230-740 ng/ml.

En la bibliografía analítica también aparece un artículo basado en la cromatografía líquida de alta eficacia (*Jiang et al., 1996*), en el que se determina benzofenona-3, octil dimetil PABA, octil metoxicinamato, butil metoxi dibenzoilmetano y octil salicilato en plasma humano previamente aditivado en concentraciones 0.5-16.0 µg/ml, obteniendo buenos coeficientes de recuperación, aunque no se analizan muestras reales, por lo que se desconoce su grado de aplicabilidad.

Tan sólo existe un antecedente de la determinación de un filtro UV en orina (*Felix et al., 1998*), en el que se determinó benzofenona-3 en un usuario que previamente se había aplicado una crema solar conteniendo este filtro UV. El método se basa en una etapa previa de preconcentración mediante microextracción en fase sólida, y su posterior determinación mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. El método es muy sensible, determinándose alrededor de 200 ng/ml a las 4 h de su aplicación.

Por tanto se requieren métodos analíticos sensibles que permitan determinar pequeñas cantidades de filtros UV en fluidos biológicos.

En lo que a la determinación de PBS se refiere, se ha llevado a cabo en productos cosméticos para la protección solar mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (*Eiden y Tittel, 1981 a; Eiden y Tittel 1981 b; König y Ryschka, 1983, König, 1984; Gagliardi et al., 1989, Hild, 1993; Wallner, 1993; Schneider et al., 1996; Rastogi, 2002*), cromatografía de gases (GC) (*Cumpelik, 1982*), cromatografía micelar electrocinética (MEKC) (*Pietta et al., 1995*) y mediante espectrometría UV/VIS derivada (*Azevedo et al., 1999*).

Ninguno de estos métodos tiene aplicabilidad en la determinación de este filtro UV en orina, ya que no presentan suficiente sensibilidad.

No existen antecedentes de la determinación en orina de este filtro UV ni de ningún otro, excepto BZ3.

### **9.1.3. Justificación del objetivo del trabajo:**

En el presente trabajo se pretende poner a punto un método analítico para la determinación de PBS en orina basado en sus propiedades fluorescentes y que pueda ser útil en el estudio de su acumulación en el organismo y excreción.

Debido a que la orina es una matriz compleja en la que están presentes multitud de compuestos, se debe separar selectivamente el analito de los posibles interferentes. Dicha separación puede llevarse a cabo mediante extracción en fase sólida (*Campins-Falcó, et al., 1993; March et al., 2001*). Se pretende asimismo automatizar todo el proceso de tratamiento de la muestra mediante el uso de un sistema de inyección secuencial (SIA).

Las metodologías basadas en los sistemas SIA podrían tener interesantes aplicaciones en el análisis de muestras de orina, pero sin embargo, la aplicación de estos sistemas al análisis de orina ha sido escasa. *Van Staden y Taljaard (1996)* determinaron calcio mediante espectrometría UV/VIS empleando una reacción de complejación, y *Simonet et al. (2001)* determinaron turbidimétricamente fosfato, acoplado una resina de intercambio catiónico al sistema SIA para evitar las interferencias debidas al calcio. También se han llevado a cabo, empleando sistemas SIA, procesos de extracción líquido-líquido para la determinación de fármacos (*Peterson et al., 1997*) y preconcentración para la determinación mediante absorción atómica de bismuto (*Wang y Hansen, 2000*) y níquel (*Wang y Hansen, 2001*) en muestras de orina.

## **9.2. MÉTODO PROPUESTO: DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE ÁCIDO FENIL BENCIMIDAZOL SULFÓNICO EN ORINA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA EMPLEANDO UN SISTEMA DE INYECCIÓN SECUENCIAL**

### **9.2.1. Método propuesto. Parte experimental:**

#### **9.2.1.1. Instrumentación:**

Se empleó un fluorímetro Jasco modelo FP-750 provisto de una lámpara de Xe. Se trabajó a potencia media y las rendijas de excitación ( $R_{exc}$ ) y emisión ( $R_{em}$ ) se fijaron ambas en 10 nm. La detección se efectuó a  $\lambda_{em}=681$  nm ( $\lambda_{exc}=301$  nm).

Para el sistema SIA se empleó una bureta automática Crison 2031 provista de una jeringa de 10 ml y una válvula automática de 8 vías Crison 2030 conectada a un ordenador mediante una interfase RS 232C y controlada mediante un programa informático no comercial diseñado para este sistema. Se empleó una cubeta de flujo Hellma® para fluorescencia de 1.5 mm de paso óptico y 25 µl de volumen interno, y tubo de teflón de 0.5 mm de diámetro interno.

Se preparó una microcolumna de intercambio aniónico cargando 150 mg de relleno SAX LiChrolut® (cloruro de trimetilaminopropilo) (Merck, Darmstadt (Alemania)) en tubo de teflón de 20 x 3 mm d.i., que se acondicionó con 0.5 ml de etanol grado HPLC (Scharlab, Barcelona) en cada sesión de trabajo.

También se empleó un pHmetro Crison modelo micropH 2001.

#### **9.2.1.2. Reactivos y muestras:**

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: hidróxido sódico para análisis (Probus S.A., Badalona, Barcelona), cloruro sódico > 99.5 % para análisis (Prolabo, Fontenay (Francia)), ácido clorhídrico 37 % para análisis (Scharlab, Barcelona (España)), hidróxido amónico 25 % en NH<sub>3</sub>, d=0.910 g/ml (Probus S.A.) y agua desionizada (empleando un sistema NANOpurell de Barnstead (Boston, EEUU)).

Ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS) 99 % (Guinama, Valencia) se empleó como sustancia patrón.

Se analizaron dos tipos de muestras: 14 muestras de orina exentas de PBS de voluntarios que no se aplicaron ningún producto cosmético conteniendo PBS y que se aditivaron previamente al análisis; y 21 muestras de orina de tres voluntarios que se aplicaron 10 ml de un agua solar (Agua Solar Babaria FPS 12 (Berioska S.L., Cheste, Valencia)) conteniendo 5 % de PBS.

#### **9.2.1.3. Metodología de trabajo:**

En primer lugar se realizaron estudios para observar el comportamiento del analito y de las posibles interferencias en la microcolumna. Tras solucionar el problema de las interferencias se estudió la estabilidad de las muestras de orina y la influencia del pH. Posteriormente se determinó el contenido del analito en muestras de orina aditivadas y se compararon los resultados. Finalmente se empleó

el método propuesto en el análisis de muestras de orina de voluntarios que se aplicaron un producto cosmético para la protección solar conteniendo PBS.

En el *apartado 9.2.2* se detallan todos los estudios realizados y los resultados obtenidos en cada uno de ellos, así como el procedimiento propuesto y sus características analíticas.

### **9.2.2. Método propuesto. Estudios realizados, resultados y discusión:**

En la figura 9.1 se muestran los espectros de excitación y emisión de PBS.

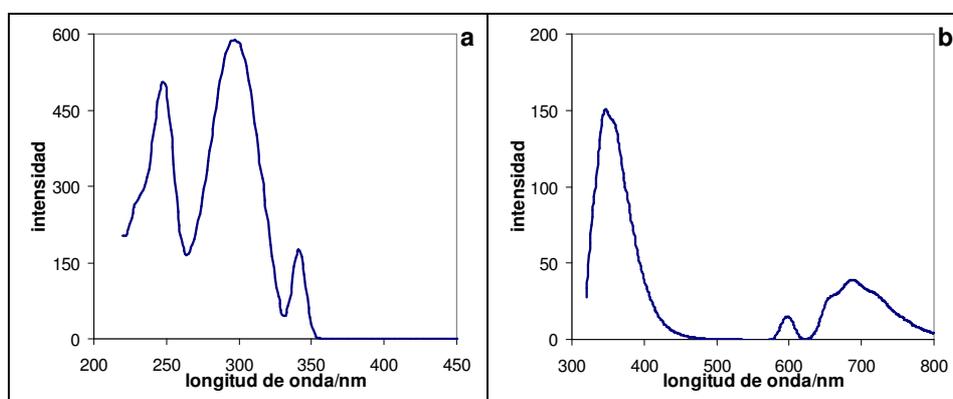


Fig. 9.1. Espectros de excitación ( $\lambda_{em}=681$  nm,  $R_{exc}/R_{em}=10$  nm,  $i=media$ ) (a) y de emisión ( $\lambda_{exc}=301$  nm,  $R_{exc}/R_{em}=10$  nm,  $i=baja$ ) (b), de una disolución de  $0.2$   $\mu\text{g/ml}$  de PBS en medio HCl  $0.1$  M.

Estudios preliminares llevados a cabo demostraron la imposibilidad de determinar el contenido de PBS en orina de forma directa, ya que la complejidad de la matriz provoca multitud de interferencias, tanto constantes como proporcionales a la concentración de analito. No obstante el analito presenta un grupo sulfónico dissociable, adquiriendo pues naturaleza aniónica. Teniendo en cuenta esta característica se intentó retener el analito en un relleno de intercambio aniónico (SAX) y eliminar las interferencias, eluyendo posteriormente el analito libre de ellas.

Se escogió  $301$  nm como  $\lambda_{exc}$  por presentar mayor sensibilidad y  $681$  nm como  $\lambda_{em}$  por presentar menores interferencias.

### 9.2.2.1. Estudio de interferencias:

Se preparó un calibrado de PBS en agua (0.1-0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) y otro en orina exenta de PBS (previamente filtrada y conteniendo todas las disoluciones patrón una proporción de 95:5 (v/v) de orina:agua), y se aspiraron 500  $\mu\text{l}$  empleando el montaje SIA mostrado en la figura 9.2. Posteriormente se aspiraron 1000  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M para eluir el analito del relleno SAX. Cada secuencia se realizó por triplicado. En la figura 9.3 se muestra el siagrama correspondiente de cada uno de estos calibrados, y en la figura 9.4 se muestra la señal media para cada uno de los patrones en función de la cantidad de PBS añadida.

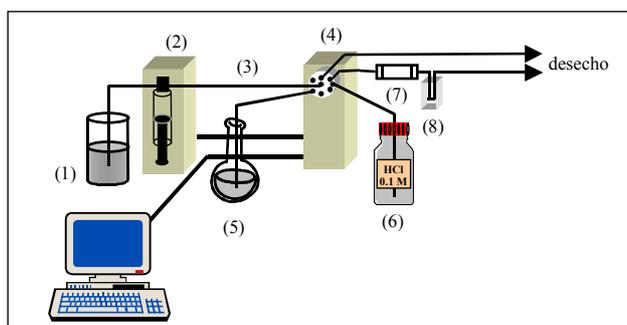


Fig. 9.2. Sistema SIA empleado para la realización de los calibrados de PBS en agua y en orina. (1) Portador: agua, (2) bureta automática provista de jeringa de 10 ml, (3) tubo de almacenamiento (2 m), (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución de PBS en agua u orina, (6) disolución acuosa de HCl 0.1 M, (7) microcolumna con relleno SAX, (8) celda de flujo.

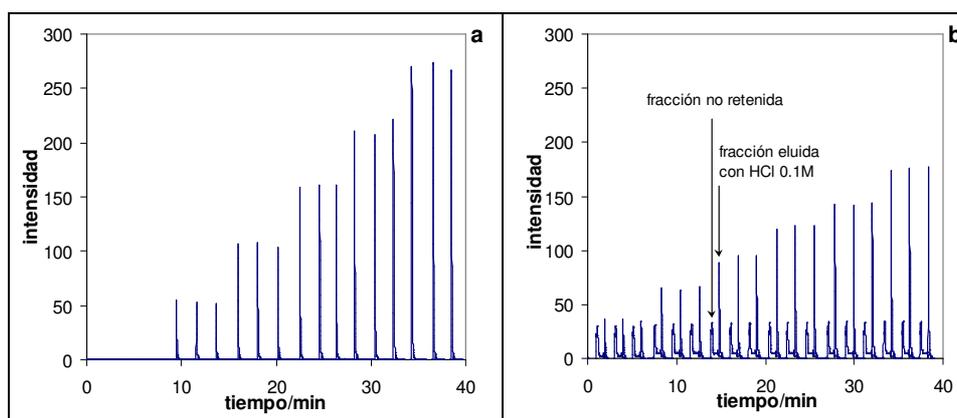


Fig. 9.3. Siagramas obtenidos para los calibrados de PBS en agua (a) y en orina (b).

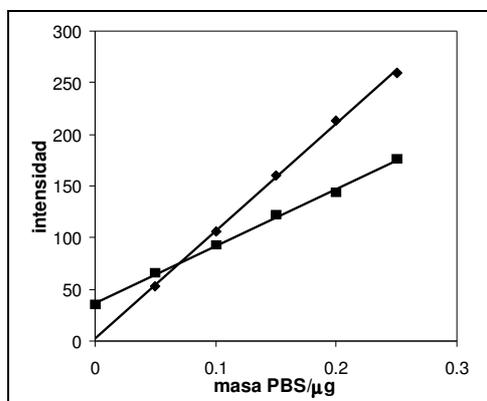


Fig. 9.4. Rectas de los calibrados obtenidos para PBS en agua (◆) y en orina (■).

Como puede observarse, cuando se emplea orina aparece una señal correspondiente a la fracción de componentes de la matriz que no se retienen en la microcolumna.

También es de resaltar, que la intensidad de la señal de la fracción eluida con HCl 0.1 M, y en principio atribuible al analito, es diferente según esté en agua o en orina, y que la disolución de orina exenta de PBS proporciona una señal considerable, tal y como se aprecia en las ecuaciones de las rectas de los calibrados obtenidos:

$$I = -(1 \pm 1) + (1078 \pm 8) \cdot m_{\text{PBS}}; \quad r^2 = 0.9998; \quad N = 5 \text{ (en agua)}$$

$$I = (37 \pm 2) + (550 \pm 10) \cdot m_{\text{PBS}}; \quad r^2 = 0.998; \quad N = 6 \text{ (en orina)}$$

siendo  $I$  la intensidad de fluorescencia y  $m_{\text{PBS}}$  la cantidad de PBS añadida en  $\mu\text{g}$ .

Por tanto, existen dos tipos de interferencias: una como consecuencia de un efecto proporcional a la concentración del analito que se manifiesta en que las pendientes de ambos calibrados presentan diferencias a un nivel de significación de 5 %, y otra interferencia constante que se aprecia por el hecho de que la ordenada obtenida en el calibrado preparado en orina exenta de PBS no es estadísticamente comparable a cero a un nivel de significación de 5 % ( $t_{\text{cal}} = 20.75$ , mientras el valor crítico de  $t$  para un nivel de significación de 5 % y 6-2=4 grados de libertad es 2.78) (Apéndice II).

En principio la interferencia proporcional se puede corregir mediante el uso de un calibrado de adición estándar, mientras que para eliminar la interferencia constante hay que evitar que los compuestos que causan la interferencia eluyan junto al analito.

Con el fin de eliminar la interferencia constante, en un primer ensayo se estudió el pH de elución, para así conseguir la elución de PBS sin presencia de interferente, pero no se consiguieron resultados satisfactorios, lo que indicó que el/los compuesto/s que provocaban la interferencia presentaba/n el mismo comportamiento químico respecto a la variable pH.

Se estudiaron combinaciones con otros rellenos como carbón activo o  $C_{18}$ , que tampoco mejoraron los resultados.

Se realizó un segundo ensayo basado en la diferente selectividad que presentan los compuestos respecto a la fase estacionaria SAX, de forma que por competencia por la fase estacionaria se puede conseguir la elución de los compuestos mediante el paso de cantidades más o menos grandes de aniones a través de la microcolumna. De esta forma se pasaron a través de la microcolumna diferentes volúmenes de una disolución acuosa de NaCl 1 M, de forma que los aniones cloruro compiten por los sitios activos del relleno con el analito y con los compuestos que provocan la interferencia ya retenidos. Así en una primera experiencia se cargó la microcolumna SAX con 500  $\mu$ l de una orina exenta de PBS, y se pasaron diferentes volúmenes de disolución de NaCl con el fin de estudiar el comportamiento de la interferencia, eluyendo posteriormente con la disolución de HCl 0.1 M la fracción que no se había eluido con el NaCl. De igual forma se procedió cargando la microcolumna con 500  $\mu$ l de la misma orina aditivada con 0.1  $\mu$ g/ml de PBS y posteriormente con una disolución acuosa de PBS de 0.1  $\mu$ g/ml. La señal obtenida se muestra en la figura 9.5.

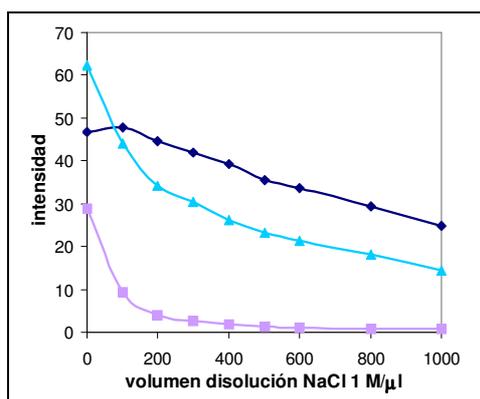


Fig. 9.5. Influencia del volumen de lavado con NaCl 1 M en la señal de una disolución acuosa conteniendo 0.1  $\mu$ g/ml de PBS (◆), una orina exenta de PBS (■) y de la misma orina conteniendo 0.1  $\mu$ g/ml de PBS (▲).

Como puede observarse, lavando la microcolumna con 600  $\mu\text{l}$  de una disolución de NaCl 1 M previamente a la elución con HCl 0.1 M, se provoca la eliminación cuantitativa de la interferencia constante como se deduce de la experiencia correspondiente a la orina exenta de PBS; para asegurar la total elución y que no se vea afectado por la variabilidad entre las diferentes orinas se escogió un volumen de lavado de 1000  $\mu\text{l}$ . Bajo estas condiciones también se producen pérdidas de analito como se deduce de la experiencia realizada con la disolución acuosa de PBS, pero se logra eluir al analito de manera reproducible y exento de interferente. Lavados sucesivos con menor volumen de la disolución de NaCl no mejoraban los resultados.

De esta forma se aspiraron en un sistema SIA (fig. 9.6) 500  $\mu\text{l}$  de orina exenta y aditivada de PBS (0.1-0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (previamente filtrada y conteniendo todos los patrones una proporción de 95:5 (v/v) de orina:agua). Posteriormente se pasaron 1000  $\mu\text{l}$  de una disolución de NaCl 1 M, y finalmente se eluyeron con 1000  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M. Cada secuencia se realizó por triplicado. En la figura 9.7 se muestra el siagrama correspondiente.

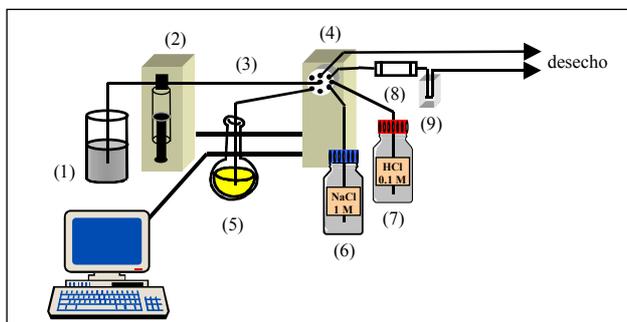


Fig. 9.6. Sistema SIA empleado en la realización del calibrado de adición estándar. (1) Portador: agua, (2) bureta automática provista de jeringa de 10 ml, (3) tubo de almacenamiento (2 m), (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución de PBS en orina, (6) disolución acuosa de NaCl 1 M, (7) disolución acuosa de HCl 0.1 M, (8) microcolumna con relleno SAX, (9) celda de flujo.

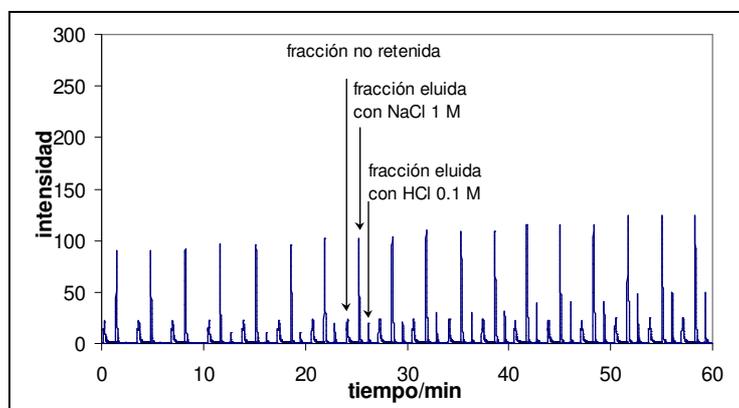


Fig. 9.7. Siagrama obtenido para el calibrado de adición estándar de una orina exenta de PBS.

Puede observarse que ahora aparece una nueva fracción que es la correspondiente a la elución con NaCl 1 M, en la que se eluye el interferente y parte de analito, que aumenta a medida que aumenta la concentración de analito. Por otra parte se observa que las tres primeras réplicas, correspondientes a la orina sin aditivar, no presentan señal de la fracción eluida con HCl 0.1 M. La recta de calibrado de adición estándar de una orina exenta de PBS obtenida realizando una etapa de lavado con 1000  $\mu\text{l}$  de una disolución de NaCl 1 M previamente a la elución con HCl 0.1 M presentó la siguiente ecuación:

$$I = (0.8 \pm 0.3) + (196 \pm 2) \cdot m_{\text{PBS}}; \quad r^2 = 0.9996; \quad N = 6$$

siendo  $I$  la intensidad de fluorescencia y  $m_{\text{PBS}}$  la cantidad de PBS añadida en  $\mu\text{g}$ .

Como puede observarse la interferencia constante queda eliminada de forma que la ordenada es estadísticamente comparable a cero para un nivel de significación de 5 % ( $t_{\text{cal}} = 2.72$ , mientras que el valor crítico de  $t$  para 5 % y  $6 - 2 = 4$  grados de libertad es 2.78).

### 9.2.2.2. Formación en línea del calibrado de adición estándar:

Con el fin de aumentar el grado de automatización, se procedió a realizar el calibrado de adición estándar en el interior del sistema SIA. Para ello se operó de la siguiente forma: se aspiraron 100  $\mu\text{l}$  de disolución patrón de PBS seguidos de 500  $\mu\text{l}$  de orina y otros 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de PBS formando una estructura tipo sándwich, y finalmente se pasaron a través de un tubo de mezclado de 25 cm antes

de atravesar por la microcolumna. Posteriormente se llevó a cabo la etapa de lavado con 1000  $\mu\text{l}$  de NaCl 1 M, y finalmente se provocó la elución con 1000  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M empleando el montaje que se muestra en la figura 9.8. De este modo se inyectaron diferentes disoluciones patrón de PBS cada vez más concentradas (por triplicado) obteniéndose para el calibrado en línea la ecuación:

$$I = (0.5 \pm 0.2) + (227 \pm 1) \cdot m_{\text{PBS}}; \quad r^2 = 0.9998; \quad N = 6$$

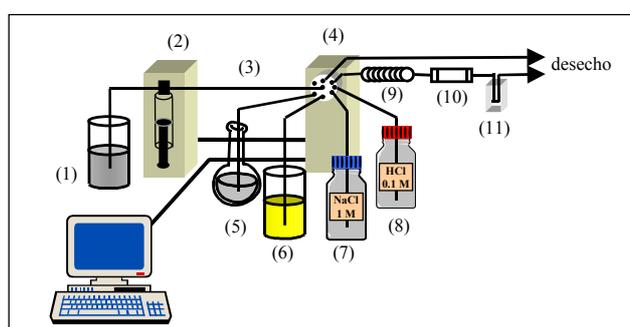


Fig. 9.8. Sistema SIA empleado para formación del calibrado de adición estándar *en línea*. (1) Portador: agua, (2) bureta automática provista de una jeringa de 10 ml, (3) tubo de almacenamiento (2 m), (4) válvula automática de 8 vías, (5) disolución acuosa de PBS, (6) muestra de orina, (7) disolución acuosa de NaCl 1 M, (8) disolución acuosa de HCl 0.1 M, (9) tubo de mezclado (25 cm), (10) microcolumna con relleno SAX, (11) celda de flujo.

Como puede observarse se obtienen resultados concordantes con los obtenidos realizando la adición externa, por lo que se propone emplear este sistema para realizar el calibrado de adición estándar de muestras de orina.

### Estudio de la estructura del sándwich:

Se ensayaron diferentes secuencias de introducción de muestra y patrón para llevar a cabo la formación del calibrado de adición estándar *en línea* con el fin de escoger la que proporcionaba mejores resultados. La cantidad de orina total introducida fue 500  $\mu\text{l}$  y de la disolución de PBS patrón (0.4  $\mu\text{g/ml}$ ) se aspiraron 200  $\mu\text{l}$ . Para ello se empleó el sistema SIA indicado en la figura 9.8 llevándose a cabo cada secuencia por triplicado, y los resultados se muestran en la tabla 9.2.

Tabla 9.2. Estudio de diferentes estructuras de sándwich.

estructura	Secuencia	CV/%
1	PBS(100 µl)-orina(500 µl)-PBS(100 µl)	0.63
2	PBS(200 µl)-orina(500 µl)	1.87
3	orina(500 µl)-PBS(200 µl)	1.92
4	orina(250 µl)-PBS(200 µl)-orina(250 µl)	1.97

CV = coeficiente de variación

Como puede observarse, la estructura 1 presenta una mayor precisión en la señal analítica, por lo que se escogió esta estructura para llevar a cabo el análisis.

### Realización del calibrado de adición estándar *en línea* con diferentes volúmenes de disolución patrón:

En los experimentos anteriores se realizó el calibrado de adición estándar *en línea* de forma que se introducía un mismo volumen de orina y se inyectaba un volumen constante de disolución patrón de PBS de concentración creciente. Teniendo en cuenta que el procedimiento incluye la retención en la microcolumna, lo realmente importante es la cantidad que se introduce y no la concentración, por lo que se pensó en la posibilidad de realizar la adición con una misma disolución patrón de PBS e inyectar diferentes volúmenes. Para estudiar este efecto se realizaron ensayos empleando una orina aditivada de PBS, y se procedió a su determinación por ambos procedimientos. En la tabla 9.3 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 9.3. Comparación de resultados obtenidos realizando el calibrado de adición estándar con disoluciones patrón de concentración variable, o una sola disolución y volumen variable.

Secuencia	C±s / µg/ml*
PBS(C µg/ml, 100 µl)-orina(500 µl)-PBS(C µg/ml, 100 µl) C=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5	0.101±0.007
PBS(0.4µg/ml, V µl)-orina(500 µl)-PBS(0.4µg/ml, V µl) V=25, 50, 75, 100, 125	0.105±0.003

La concentración hallada (C) proviene de extrapolar la recta del calibrado de adición estándar hasta el corte con el eje de abscisas, y la desviación estándar (s) viene descrita por la siguiente fórmula (Miller y Miller, 2002):  $s=(s_{y/x}/b) \cdot [(1/N) + (\bar{y}^2 / (b^2 \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2))]^{1/2}$ , donde  $s_{y/x}$ ,  $b$  y  $N$  son la desviación estándar, la pendiente y los puntos de la recta de calibrado de adición estándar respectivamente, y  $x$  e  $y$  son los valores de abscisas (masa de PBS añadida) y ordenadas (intensidad de fluorescencia).

Los resultados obtenidos por ambos procedimientos se compararon empleando el contraste de *t de Student* (Apéndice II).

De esta forma se demuestra que los resultados obtenidos por ambos procedimientos son estadísticamente comparables para un nivel de significación de 5 % ( $t_{\text{cal}}=1.06$ , mientras que el valor crítico de  $t$  para un nivel de significación de 5 % y 7 grados de libertad es 2.36). Por tanto se empleará la estrategia de volúmenes variables frente a la de concentración variable, ya que presenta un mayor grado de automatización, menor manipulación y menor tiempo de análisis.

### 9.2.2.3. Estudio de la estabilidad de las muestras de orina:

Se estudió el modo de conservación desde la toma de muestra hasta su análisis, ya que puede verse alterado el contenido de PBS durante su conservación. Para ello se tomó una orina y se aditivó con PBS. Una fracción de ésta se guardó en nevera a 4 °C hasta su momento de análisis, mientras otra fracción se guardó a temperatura ambiente y resguardada de la luz. Las muestras se analizaron durante los 4 días siguientes a la toma, y los contenidos encontrados para cada una de las orinas fueron comparados entre sí mediante el test ANOVA de un factor (*Apéndice II*) con el fin de evaluar si había habido alteración en la concentración de PBS. En la tabla 9.4 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 9.4. Estudio de la conservación de la muestra de orina.

modo de conservación	días transcurridos					$F_{\text{cal}}$
	0	1	2	3	4	
	concentración de PBS encontrada/( $\mu\text{g/ml}$ )					
<i>T ambiente</i>	0.110 $\pm$ 0.007	0.098 $\pm$ 0.006	0.084 $\pm$ 0.008	0.079 $\pm$ 0.008	-	18.84
4° C	0.102 $\pm$ 0.002	0.104 $\pm$ 0.004	-	0.103 $\pm$ 0.004	0.110 $\pm$ 0.004	1.22

A la vista de los resultados, y teniendo en cuenta que el valor crítico de  $F_{(95\%,3,12)}=3.49$ , se puede asegurar a un nivel de significación de 5 % que la determinación de PBS en orina se debe hacer dentro del día en que se toma la muestra, o bien almacenar la muestra en nevera hasta su análisis, ya que como se ha demostrado no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos en diferentes días para una orina conservada en nevera, mientras que para una orina conservada a temperatura ambiente se produce una disminución con el tiempo de la concentración de PBS.

#### 9.2.2.4. Estudio de la influencia del pH en el resultado analítico:

Las muestras de orina son muy versátiles respecto al pH, de modo que depende de muchos factores, tales como hábitos alimenticios, metabolismo, sexo y edad del individuo, hora de toma de muestra, etc. Por este motivo se realizó un ensayo con el fin de estudiar como influye el pH de una muestra de orina en el resultado obtenido. Para ello se determinó el contenido de PBS en dos muestras de orina aditivadas, de manera que las muestras de orina se ajustaron a diferentes pHs con HCl 1 M y NH<sub>4</sub>OH 2 M. En la tabla siguiente se muestran los resultados obtenidos en función del pH.

Tabla 9.5. Resultados obtenidos en la determinación de PBS en orinas ajustadas a diferentes pHs (ajustado con HCl 1 M y NH<sub>4</sub>OH 2 M).

PBS adicionado ( $\mu\text{g/ml}$ )	pH			
	4	5	6	7
0.122	0.095 $\pm$ 0.005	0.122 $\pm$ 0.009	0.120 $\pm$ 0.002	0.129 $\pm$ 0.008
0.204	0.149 $\pm$ 0.008	0.209 $\pm$ 0.005	0.202 $\pm$ 0.007	0.205 $\pm$ 0.009

Como puede observarse, a pH 4 se obtienen resultados erróneos en la determinación de PBS. De esta forma se aconseja medir el pH de la muestra de orina antes de efectuar el análisis, de modo que si presenta pH inferior a 5 (lo que no es usual) se debe ajustar el pH por encima de éste con NH<sub>4</sub>OH 2 M.

***Procedimiento propuesto para la determinación fluorimétrica de ácido fenilbencimidazol sulfónico en orina mediante extracción en fase sólida en línea empleando un sistema de inyección secuencial:***

Se toma la muestra de orina y se almacena en nevera (4 °C) si no se va a efectuar el análisis de inmediato. En caso contrario se deja alcanzar temperatura ambiente y se filtra a través de papel de filtro Whatman n° 42. Es recomendable medir el pH de la muestra de orina, y si presenta pH<5 se debe ajustar con NH<sub>4</sub>OH 2 M entre 5-7.

Se prepara una disolución patrón de PBS en agua desionizada (1250  $\mu\text{g/ml}$ ) (para su disolución es necesario ionizar al analito, por lo que se puede emplear una pequeña cantidad de una disolución de NaOH al 10%). A partir de ésta se prepara una disolución de 0.4  $\mu\text{g/ml}$  en agua desionizada.

Empleando el sistema SIA descrito en la figura 9.8 se realiza el siguiente ciclo:

- 1) aspiración de  $(6000-2.V)$   $\mu\text{l}$  de portador
- 2) aspiración de  $V$   $\mu\text{l}$  de disolución patrón de PBS ( $0.4 \mu\text{g/ml}$ )
- 3) aspiración de  $500 \mu\text{l}$  de muestra
- 4) aspiración de  $V$   $\mu\text{l}$  de disolución patrón de PBS ( $0.4 \mu\text{g/ml}$ )
- 5) propulsión de  $6000 \mu\text{l}$  a través de la microcolumna
- 6) aspiración de  $3000 \mu\text{l}$  de portador
- 7) aspiración de  $1000 \mu\text{l}$  de disolución de NaCl  $1 \text{ M}$
- 8) propulsión de  $4000 \mu\text{l}$  a través de la microcolumna
- 9) aspiración de  $3000 \mu\text{l}$  de portador
- 10) aspiración de  $1000 \mu\text{l}$  de disolución de HCl  $0.1 \text{ M}$
- 11) propulsión de  $4000 \mu\text{l}$  a través de la microcolumna

donde  $V=25, 50, 75, 100$  y  $125 \mu\text{l}$ .

(Esta secuencia se realiza por triplicado para cada uno de los puntos que constituyen el calibrado de adición estándar)

### ***Parámetros analíticos del método SIA propuesto:***

#### *i) Sensibilidad:*

Es de destacar que para cada muestra de orina el efecto matriz es diferente por lo que las pendientes de los calibrados de adición estándar difieren considerablemente. Por ello la sensibilidad del método se estimará como el valor promedio de las pendientes de los calibrados de adición estándar de las muestras de orina tratadas en este trabajo junto su desviación estándar. Este valor fue  $270 \pm 60 \mu\text{g}^{-1}$ , o lo que es lo mismo  $140 \pm 30 \text{ ml}/\mu\text{g}$  teniendo en cuenta que se aspiraron  $500 \mu\text{l}$  de orina.

#### *ii) Límite de detección:*

El límite de detección (LD) del método propuesto se puede calcular como  $3 \cdot s_{y/x} / b$ , donde  $s_{y/x}$  es la desviación de la recta de calibrado y  $b$  la pendiente. Ya que la pendiente es diferente para cada muestra, se puede estimar el LD como un valor promedio de los obtenidos para las diferentes muestras estudiadas junto con su desviación estándar. Su valor fue  $0.006 \pm 0.002 \mu\text{g}$  o  $0.012 \pm 0.005 \mu\text{g/ml}$  si se expresa en unidades de concentración.

iii) *Exactitud:*

Con el fin de evaluar la exactitud obtenida con el método propuesto, se aplicó a diversas muestras de orina (aditivadas con PBS) de voluntarios de diferente edad y sexo con el fin de disponer de matrices de orina diferentes. En la tabla 9.6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 9.6. Resultados obtenidos en el análisis de muestras de orina aditivadas de voluntarios de diferente edad y sexo.

Muestra	Edad	Sexo	$\mu$ /( $\mu\text{g/ml}$ )	$C \pm s^{***}$ /( $\mu\text{g/ml}$ )
1	14	V	0.130	0.112 $\pm$ 0.008
2	14	M	0.260	0.253 $\pm$ 0.005
3	24	M	0.163	0.154 $\pm$ 0.009
4*	25	V	0.100	0.105 $\pm$ 0.003
5*	25	V	0.108	0.110 $\pm$ 0.007
6	29	V	0.065	0.051 $\pm$ 0.004
7	35	M	0.065	0.056 $\pm$ 0.006
8	35	V	0.173	0.183 $\pm$ 0.007
9**	45	M	0.108	0.109 $\pm$ 0.003
10**	45	M	0.216	0.223 $\pm$ 0.009
11**	45	M	0.324	0.301 $\pm$ 0.005
12	46	M	0.108	0.102 $\pm$ 0.005
13	46	V	0.303	0.301 $\pm$ 0.007
14	54	M	0.043	0.047 $\pm$ 0.006

\* orina de la misma persona recogida en días diferentes

\*\* misma orina aditivada con diferente cantidad de PBS

\*\*\*  $s = (s_{y/x}/b) \cdot [(1/N) + (\bar{y}^2 / (b^2 \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2))]^{1/2}$ , donde  $s_{y/x}$ ,  $b$  y  $N$  son la desviación estándar, la pendiente y los puntos de la recta de calibrado de adición estándar respectivamente, y  $x$  e  $y$  son los valores de abscisas (masa de PBS añadida) y ordenadas (intensidad de fluorescencia)

donde  $\mu$  es la concentración de PBS aditivada en la orina,  $C$  la concentración hallada al extrapolar la recta de adición estándar hasta su corte con el eje de abscisas y  $s$  la desviación estándar de estos resultados.

Los resultados obtenidos se compararon mediante un modelo de regresión lineal (*Apéndice II*) aplicando el contraste de *t de Student* (figura 9.11).

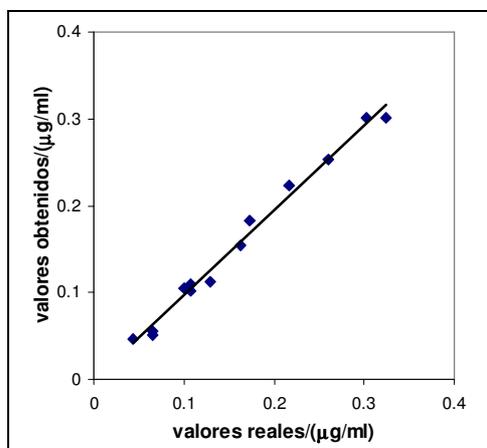


Fig. 9.11. Comparación de los valores obtenidos con los reales.

El resultado del ajuste resultó ser:

$$C = (0.98 \pm 0.03) \cdot \mu + (0.000 \pm 0.005); r^2 = 0.990; N = 14$$

siendo **C** los resultados obtenidos por el método propuesto, y  **$\mu$**  los valores reales aditivados.

El valor de  $(t_{cal})_a$  fue de 0.11 mientras que el de  $(t_{cal})_b$  fue de 0.76. Teniendo en cuenta que el valor crítico del parámetro de t de Student para un nivel de significación de 5 % y  $N-2=12$  grados de libertad es 2.18, se puede concluir que el método propuesto proporciona resultados concordantes con los reales.

*iv) Precisión:*

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos por el método propuesto oscilan entre 2-13 %, con un valor medio del 5 %, por lo que se puede considerar que con ayuda del método propuesto se puede llevar a cabo la determinación de PBS en orina de una manera precisa.

*v) Velocidad de muestreo:*

El tiempo requerido para llevar a cabo una secuencia completa en la que se realiza la adición estándar, se carga la microcolumna con el analito, se provoca la elución selectiva de interferentes constantes en línea y finalmente se eluye el analito es de 220 s.

**Aplicación del método propuesto al análisis de muestras reales de orina procedentes de usuarios de productos cosméticos para la protección solar conteniendo ácido fenilbencimidazol sulfónico.**

Tres voluntarios (2 hombres de 25 y 26 años, y una mujer de 15) se aplicaron sobre su piel 10 ml de un agua solar conteniendo 5 % de PBS, y se colectó su orina durante un periodo de doce horas a intervalos de 2 h, determinándose el contenido de PBS en todas estas muestras mediante la aplicación del método propuesto. En la tabla 9.7 y en la figura 9.12 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 9.7. Análisis de muestras de orina de usuarios de protectores solares.

tiempo/h <sup>a</sup>	Voluntario 1			Voluntario 2			Voluntario 3		
	C/( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>b</sup>	V/ml <sup>c</sup>	m/ $\mu\text{g}$ <sup>d</sup>	C/( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>b</sup>	V/ml <sup>c</sup>	m/ $\mu\text{g}$ <sup>d</sup>	C/( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>b</sup>	V/ml <sup>c</sup>	m/ $\mu\text{g}$ <sup>d</sup>
0	N.D. <sup>e</sup>	175	-	N.D.	112	-	N.D.	102	-
2	0.020 $\pm$ 0.008	112	2.2 $\pm$ 0.9	0.051 $\pm$ 0.04	31	1.6 $\pm$ 0.1	N.D.	115	-
4	0.038 $\pm$ 0.003	78	3.0 $\pm$ 0.2	0.131 $\pm$ 0.007	29	3.8 $\pm$ 0.2	0.018	64	1.2 $\pm$ 0.3
6	0.035 $\pm$ 0.004	64	2.3 $\pm$ 0.3	0.058 $\pm$ 0.006	114	6.6 $\pm$ 0.7	0.036	48	1.7 $\pm$ 0.2
8	0.067 $\pm$ 0.008	55	3.7 $\pm$ 0.4	0.092 $\pm$ 0.008	69	6.4 $\pm$ 0.6	0.055	43	2.4 $\pm$ 0.3
10	0.067 $\pm$ 0.009	73	4.9 $\pm$ 0.7	0.141 $\pm$ 0.004	51	7.2 $\pm$ 0.2	0.070	42	3.0 $\pm$ 0.3
12	0.069 $\pm$ 0.006	64	4.4 $\pm$ 0.4	0.064 $\pm$ 0.001	107	6.8 $\pm$ 0.1	0.059	48	2.9 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> tiempo transcurrido desde la aplicación

<sup>b</sup> concentración hallada en la muestra de orina

<sup>c</sup> volumen excretado

<sup>d</sup> masa total excretada

<sup>e</sup> No detectable

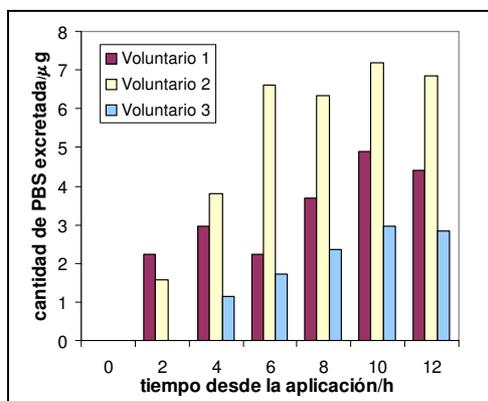


Fig. 9.12. Masa de PBS excretada en cada toma de muestra.

A la vista de los resultados se observa que la excreción de PBS aumenta al aumentar el tiempo desde la aplicación, hasta estabilizarse alrededor de 10-12 h. *Aghazarian et al.*, (1999) estudiaron la penetración del fenilbencimidazol a través de piel artificial y concluyeron que la absorción es lenta para este tipo de compuestos, lo que parece corresponder con los resultados obtenidos en este capítulo.

### **9.3. CONCLUSIONES:**

Se ha puesto a punto un método analítico que permite la detección y determinación de ng/ml de ácido fenilbencimidazol sulfónico en orina.

La realización de la extracción en fase sólida en línea con el sistema de inyección secuencial combinada con detección fluorimétrica permite realizar la determinación directa y selectiva de ácido fenilbencimidazol sulfónico en muestras de orina de usuarios de protectores solares.

El sistema de inyección secuencial utilizado permite un alto grado de automatización de todo el proceso de análisis mediante la programación de la secuencia deseada con un sencillo programa informático, permitiendo disminuir el volumen de reactivos consumido y por tanto el volumen de residuos generado.

El método propuesto evita las interferencias debidas a la matriz de las muestras de orina mediante la realización de calibrado de adición estándar, que se efectúa en línea empleando volúmenes crecientes de una disolución patrón.

La exactitud del método ha sido demostrada determinándose el contenido de ácido fenilbencimidazol sulfónico en 14 muestras de orina aditivadas.

La sensibilidad de este nuevo método permite la determinación de ácido fenilbencimidazol sulfónico en muestras de orina de usuarios de productos cosméticos para la protección solar. Los resultados obtenidos indican que la excreción es baja durante las dos primeras horas, alcanzando una excreción aparentemente constante durante las posteriores 10 horas.

Estos resultados muestran la posible aplicación del método propuesto al estudio de mecanismos de acumulación y excreción. Estos estudios forman parte de una nueva línea de investigación del grupo en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral.



## **GENERAL CONCLUSIONS**



Damage to the ozone layer has led to an increment in the solar UV radiation reaching earth, which in turn makes strong protection necessary in order to prevent harmful effects on human health.

The use of sunscreen products could help prevent or minimize the harmful effects of the solar irradiations.

The concentration of the UV filters in the sunscreen formulations must be monitored to assure the labelled Sun Protection Factor (SPF) in the commercial preparations (efficacy) without exceeding the authorized levels set by different legislations (safety).

No official analytical methods have been proposed to determine UV-filters in sunscreens.

Therefore, **the aim of this Doctoral Thesis** was to develop fast, accurate methods to control these products. Attention was paid to the use of low toxicity solvents as well as to reduce the amounts of solvents required, and thus, to minimize waste generation, in order to propose green analytical procedures.

New analytical methods were developed and proposed:

❖ **Automatized methods based on the use of molecular absorption or emission techniques.**

- These methods require a simple and not expensive instrumentation.
- They can be used in cosmetic laboratories without difficulties.
- The automatization of the methods by flow injection analysis (FIA) or sequential injection analysis (SIA) systems allows to increase the sample frequency.
- The solvents used in the proposed methods are not toxic for the operator nor the environment. The automatization of the methods permits to reduce the amounts of reagents, and thus the waste generated.
- However, only one or few analytes can be simultaneously determined.

❖ **Liquid chromatographic methods.**

- The instrumentation required is more expensive and it requires a more complete training of the operator.
  - Several analytes can be simultaneously determined.
  - The solvents used in the chromatographic proposed methods are not toxic for the operator nor the environment and other toxic reagents are not necessary.
- ❖ In the last Part of the Doctoral Thesis a sensitive analytical method was developed, that allows the **analysis of urine from users of sunscreen products** at ng/ml levels in order to make possible the evaluation of the safety of the use of these products by future studies on the accumulation/excretion processes in the body.

**DEVELOPED ANALYTICAL METHODS. ANALYTICAL FEATURES AND CONCLUSIONS**

**Simultaneous determination of octyl methoxycinnamate and benzophenone-3 in sunscreen formulations by derivative UV spectrometry**

A procedure was developed for the simultaneous determination of two UV filters (benzophenone-3 and octyl methoxycinnamate) in sunscreen formulations, based on the isodifferential approach. The procedure was automatized by use of a FIA system.

First and second derivative spectra can be used to resolve mixtures of solutions of benzophenone-3 and octyl methoxycinnamate. However, due to matrix absorbance, first derivative spectra can not be used to determine these compounds in commercial sunscreen samples with accuracy, and the second derivative spectra are recommended.

Statistical tests showed that the proposed method gave comparable results to those obtained by an HPLC procedure used as reference.

Our study demonstrates the usefulness of the direct FIA-isodifferential derivative UV determination of UV filters used in sunscreens.

Its simplicity, sampling frequency and low cost make it recommendable for sunscreens analysis.

Ethanol, which offers the advantage of low toxicity was used as solvent.

The procedure provides a green analytical method, that does not involve toxic organic solvents.

### **Spectrophotometric determination of benzophenone-3 in sunscreens using automatized systems**

The complexation reaction between benzophenone-3 and Ni<sup>2+</sup> in ammoniacal medium is proposed to determine benzophenone-3 in sunscreen formulations.

Flow injection (FIA) and sequential injection (SIA) procedures were studied in order to carry out the automatization of the method. Under the selected experimental conditions the detection limits, repeatabilities, accuracy, ruggedness and sample frequency were established.

Statistical tests showed that the proposed methods gave comparable results to those obtained by an HPLC procedure used as reference.

The proposed methods permit to determine benzophenone-3 in commercial sunscreens. No prior separation is necessary and simple, rapid determinations can be performed by complexation on-line. Good precision and sensitivity were obtained by the methods.

Automation of the method means the amount of reagents used and residues generated are decreased.

Cosmetic ethanol, wich offers the advantages of low cost and low toxicity can be used as carrier.

SIA provided a sensitivity higher than FIA and a similar limit of detection, but standard deviation were lightly higher for SIA.

The sample frequency of FIA was three fold higher than that of SIA.

The major advantages of SIA were the more cost effective use of reagents and a high level of automation due to the control of the system by the software.

### **Sequential injection analysis for phenylbenzimidazole sulphonic acid and benzophenone-4 in sunscreen sprays by solid-phase extraction coupled with UV spectrometry.**

On-line solid-phase extraction of phenylbenzimidazole sulphonic acid (PBS) and benzophenone-4 (BZ4) can be carried out using a sequential injection analysis (SIA) system that permits their selective determination in sunscreen formulations by UV spectrometry.

The selective determination of both was performed by on-line solid-phase extraction, with a strong anion exchanger (SAX) microcolumn and varying the pH elution.

The proposed method is precise and accurate without interferences coming from the matrix or other compounds present in the samples.

Statistical tests showed that the proposed method gave comparable results to those obtained by an HPLC procedure used as reference.

The sensitivity and limit of detection are adequate for the level of PBS and BZ4 in the finished products.

Automation of the method means the amount of reagents used and residues generated are decreased.

The SIA system allows the required analysis sequence to be programmed using a suitable software.

### **Flow injection chemiluminescence determination of octyl dimethyl PABA in sunscreen formulations**

A flow injection procedure was developed for the determination of the octyl dimethyl PABA in sunscreen formulations based on its chemiluminescence induced by potassium permanganate in sulfuric acid.

To our knowledge, this is the first study focusing on the determination of components in sunscreens by chemiluminescence.

No prior separation is necessary and simple and rapid determinations can be carried out on-line.

Statistical tests showed that the proposed method gave comparable results to those obtained by an HPLC procedure used as reference.

Under the selected experimental conditions the sensitivity, limit of detection, repeatability and sample throughput were established and they were adequate to carry out this type of determination.

Automation of the method means the amount of reagents used and residues generated are decreased.

Ethanol, which offers the advantage of low toxicity was used as solvent.

#### **Determination of the worldwide authorised organic UV-B filters in sunscreen formulations by liquid chromatography.**

Simultaneous determination of several internationally authorised organic UV-filters was performed by HPLC with UV detection.

A C<sub>18</sub> stationary phase and a mobile phase of ethanol:water:acetic acid 70:29.5:0.5 (v/v/v) at a flow rate of 0.5 ml were used. UV measurements were carried out at 313 nm.

The analytical features of the method make it suitable for sunscreen analysis.

The time required for the analytical run was 25 min.

The procedure provides an accurate, and green analytical method, that does not involve toxic organic solvents.

#### **Determination of the UV organic filters worldwide authorised in sunscreens by HPLC. Use of cyclodextrins as mobile phase modifier.**

Simultaneously determination of all the organic UV filters worldwide authorised in sunscreen formulations was performed by HPLC with UV detection. The filters determined were: benzophenone-4, benzophenone-3, butyl methoxydibenzoylmethane, octyl dimethyl PABA, octyl methoxycinnamate, homosalate and octyl salicylate.

A C<sub>18</sub> stationary phase and an isocratic mobile phase of ethanol:water:acetic 70:29:0.5 (v/v/v) containing 65.4 mM of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, at a flow-rate of 0.6 ml/min were used. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin is used as a modifier in order to get the resolution of all the peaks. UV measurements were carried out at 313 nm.

The analytical features of the method make it suitable for sunscreen analysis.

The time required for the analytical run was 20 min.

The procedure provides an accurate, and green analytical method, that does not involve toxic organic solvents.

#### **Determination of water-soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography.**

A liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the three most used water-soluble UV-filters in aqueous sunscreen sprays was developed.

To our knowledge, no analytical procedures have been published before to perform the determination of terephthalylidene dicamphor sulfonic acid (TDS) and therefore this is the first study focused on the simultaneous determination of benzophenone-4 (BZ4), phenylbenzimidazole sulphonic acid (PBS) and TDS.

A C<sub>18</sub> stationary phase and an isocratic mobile phase of EtOH:20mM sodium acetate buffer of pH 4.6 30:70 (v/v) at a flow-rate of 0.5 ml min<sup>-1</sup> were used. Mobile phase was also used as solvent for samples and standards. UV detection was performed at 313 nm.

The time required for the analytical run was 5.5 minutes.

The proposed procedure provides a green analytical method that does not involve highly toxic organic solvents. The accuracy, speed and selectivity of the procedure make it suitable for this type of formulations.

The analytical features of the method make it suitable for sunscreen analysis.

**Sensitive sequential-injection system for the determination of phenylbenzimidazole sulphonic acid in human urine samples using on-line solid-phase extraction coupled with fluorimetric detection.**

A method combining sequential injection analysis (SIA) system with solid-phase extraction (SPE) and fluorescence detection is proposed here for phenyl benzimidazole sulphonic acid (PBS) determination in urine samples.

The on-line separation of this compound from urine matrix was directly coupled with fluorimetric detection in a sequential-injection system.

The separation was performed using a strong anion exchanger (SAX) microcolumn in which the analyte was retained and eluted selectively.

The determination is carried out without any derivatization reaction, by directly measuring the intrinsic fluorescence of the analyte. The wavelengths of excitation and emission were 301 and 681 nm, respectively.

The proposed procedure allows to carry out the standard addition calibration using only one standard which generates the diluted solutions into the SIA system.

The method was satisfactorily used to determine PBS in both, spiked and unspiked human urine samples, without any pretreatment.

The concentrations of the analyte obtained for unspiked samples taken from sunscreen users were higher than the limit of detection. No sensitive procedures that allow  $\text{ng ml}^{-1}$  PBS levels to be determined in urine have yet been developed.

Automation of the method means the amount of reagents used and residues generated are decreased. The SIA system allows the required analysis sequence to be programmed using suitable software.

The accuracy of the developed method has been proved by analysing 14 spiked urine samples.

The sensitivity of this new method enables the determination of PBS in urine samples taken from volunteers after topical application of the sunscreen. Results seem to indicate that for the first two hours after application, excretion is very low, from then on it increases until it apparently stabilizes about ten hours from the application.

These results show the possible application of the proposed method to study the bioaccumulation and excretion mechanisms which may result from the amount of sunscreen applied per cm<sup>2</sup> of skin, the type of sunscreen (milk, aqueous lotion, etc.), the temperature, the total release time from the application, etc. This research is being considered in a subsequent study by our group.

## **APÉNDICE I**

### **CLAVES EMPLEADAS**



**APÉNDICE I: Claves empleadas**

En las siguientes tablas se muestran las claves empleadas a lo largo de esta memoria.

Tabla I.1. Claves de técnicas analíticas.

Clave	Descripción
AES	Detección mediante espectrometría de emisión atómica
CL	Detección mediante quimioluminiscencia
DAD	Detección mediante espectrometría ultravioleta/visible con detector de fila de diodos
FAAS	Detección mediante espectrometría de absorción atómica con llama
FIA	Sistema de inyección en flujo continuo
FID	Detección mediante detector de ionización de llama
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
ICP	Plasma acoplado por inducción
IR	Espectrometría infrarroja
MAE	Extracción asistida con microondas
MEKC	Cromatografía micelar electrocinética
MLC	Cromatografía líquida micelar
MO	Irradiación con microondas
MS	Detección mediante espectrometría de masas
NMR	Resonancia magnética nuclear
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SIA	Sistema de inyección secuencial
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TD	Detección mediante analizador de energía térmica
TLC	Cromatografía en capa fina
UV/VIS	Detección mediante espectrometría ultravioleta/visible
XRFS	Espectrometría de fluorescencia de rayos X

Tabla I.2. Claves de reactivos y disolventes.

Clave	Descripción
AcCN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AcO <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Acetato amónico
BSTFA	Bis-trimetilsililtrifluoroacetamida
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DMF	Dimetilformamida

Tabla I.2. (continuación)

Clave	Descripción
EtOH	Etanol
HMDS	Hexametil disilazano
IBMK	Isobutilmetilcetona
MeOH	Metanol
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEA	Trietanolamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilsilano

Tabla I.3. Claves de filtros UV.

Clave	Denominación INCI <sup>a</sup>	Nombre químico
BCS	Ácido benciliden canfor sulfónico	Ácido $\alpha$ -(2-oxoborn-3-iliden)-toluen-4-sulfónico y sus sales
BDM	Butil metoxi dibenzoilmetano	4-tert-butil-4'-metoxidibenzoilmetano
BOR	Bornelona	5-(3,3-dimetil-2-norborniliden)-3-penten-2-ona
BZ1	Benzofenona-1	2,4-dihidroxibenzofenona
BZ2	Benzofenona-2	2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona
BZ3	Benzofenona-3	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona ( <i>oxibenzona</i> )
BZ4	Benzofenona-4	Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico ( <i>sulisobenzona</i> )
BZ6	Benzofenona-6	2-hidroxi-4,4'-dimetoxibenzofenona
BZ8	Benzofenona-8	2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona
BZ9	Benzofenona-9	Ácido 2,2'-dihidroxi-4,4'-dimetoxibenzofenona-5,5'-disulfónico
BZ10	Benzofenona-10	2-hidroxi-4-metoxi-4'-metilbenzofenona ( <i>mexenona</i> )
BZ12	Benzofenona-12	2-hidroxi-4-octiloxi-benzofenona
BZL	Benzalazina	1,4-difenil-2,3-diaza-1,3-butadieno
CA	Ácido cinámico	Ácido cinámico (sal de potasio)
CBM	Canfor benzalconio metosulfato	Metil sulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-ilidinemetil) anilino
CMC	Ciclohexil metoxicinamato	Ciclohexil 4-metoxicinamato
CX	Cinoxato	2-etoxietil 4-metoxicinamato ( <i>cinoxato</i> )
DBT	Diocil butamido triazona	4,4'-[[6-[[[(1,1-dimetiletil)amino] carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]bis-bis(2-etilhexil) benzoate
DDM	Dimetoxi dibenzoilmetano	4,4'-dimetoxi-dibenzoilmetano
DPG	Dimetoxi fenilgloxilato de sodio	3,4-dimetoxifenilgloxilato de sodio

Tabla I.3. (continuación)

Clave	Denominación INCI <sup>a</sup>	Nombre químico
DR	Drometrizol	2-(2'-hidroxi-5-metilfenil)benzotriazol
DRT	Drometrizol trisiloxano	2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-[2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)disiloxanil)propil] fenol
DT	Digalloil trioleato	3,4-dihidroxi-5-((3,4,5-trihidroxibenzoil)-oxi)benzoato de trioleilo
EDP	Etil dimetil PABA	Etil 4-dimetilaminobenzoato
EHP	Etil dihidroxipropil PABA	Etil 4-[bis(2-hidroxipropil)amino]benzoate (mezcla de isómeros)
EMT	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina	2,2'-[6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil]bis[5-(2-etilhexil)oxi]fenol
EP	Etil PABA	Etil 4-aminobenzoato
GP	Gliceril PABA	4-aminobenzoato de glicerilo
HAB	Homomentil acetamidobenzoato	2-acetamidobenzoato de 3,3,5-trimetilciclohexilo
HCM	Hexil ciano metoxicinamato	Ácido $\alpha$ -ciano-4-metoxicinámico y su éster hexílico
HS	Homosalato	Salicilato de 3,3,5-trimetilciclohexilo ( <i>homosalato</i> )
IBS	Isopropilbencil salicilato	Salicilato de 4-isopropilbencilo
IDM	Isopropil dibenzoilmetano	4-isopropil-dibenzoilmetano
IMC	Isoamil metoxicinamato	4-metoxicinamato de isoamilo
MA	Mentil antranilato	2-aminobenzoato de 5-metil-2-(1-metiletil)ciclohexilo
MBC	4- metilbenciliden canfor	3-(4'-metilbenciliden) canfor
MBP	Metilen bisbenzotriazolil tetrametilbutilfenol	2,2'-metilen-bis-[4-(1,1,3,3-tetrametil butil)-6-(2H-benzotriazol-2-il)fenol]
MCA	Ácido metoxicinámico	Ácido 4-metoxicinámico (sales de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y DEA)
MCS	Ácido metilbenciliden canfor sulfónico	Ácido $\alpha$ -(2-oxoborn-3-yliden)-xilen-4-sulfónico
MPB	Metil fenilbenzoxazol	5-metil-2-fenilbenzoxazol
OCR	Octocrileno	2-ciano-3,3-diphenylacrilato de 2-etilhexilo
ODP	Octil dimetil PABA	4-dimetilaminobenzoato de 2-etilhexilo
OMC	Octil metoxicinamato	4-metoxicinamato de 2-etilhexilo
OMP	Octil metilnitrosil PABA	4-(N-metil-N-nitrosamino) benzoato de 2-etilhexilo
OPB	Octil fenilbenzoilbenzoato	2-(4-fenilbenzoil) benzoato de 2-etilhexilo
OS	Octil salicilato	Salicilato de 2-etilhexilo
OT	Octil triazona	2,4,6-trianilina-(p-carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina
P15	Polisilicona-15	Metil 3-[4-[2,2-bis(etoxicarbonil)etenil] fenoxi]propenil dimetil polisiloxano
P25	PEG-25 PABA	4-aminobenzoato de etilo etoxilado

Tabla I.3. (continuación)

Clave	Denominación INCI <sup>a</sup>	Nombre químico
PAB	PABA	Ácido 4-aminobenzoico
PBC	Poliacrilamidometil benciliden canfor	Polimero de N-[(2 y 4)-[(2-oxoborn-3-iliden)metil]bencil] acrilamida
PBS	Ácido fenilbencimidazol sulfónico	Ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfónico y sus sales de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y TEA
PDP	Pentil dimetil PABA	4-dimetilaminobenzoato de pentilo (mezcla de isómeros)
PDT	Ácido fenildibencimidazol tetrasulfónico	Ácido 2,2'-(1,4-fenilen) bis-1H-bencimidazol-4,6-disulfónico (sal monosódica)
PMC	Isopropil metoxicinamato	4-metoxicinamato de isopropilo
PS	Fenil salicilato	Salicilato de fenilo
SA	Ácido salicílico	Ácido salicílico (sales de K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y TEA)
TDS	Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico	Ácido 3,3'-(1,4-fenilendimetileno) bis (7,7-dimetil-2-oxobiciclo- [2.2.1]hept-1-ilmetano sulfónico) y sus sales
UA	Ácido urocánico	Ácido 3-(1H-imidazol-4-il)-2-propanoico y su éster etílico
3BC	3-benciliden canfor	3-bencilidene canfor
4PB	4-fenilbenzofenona	4-fenilbenzofenona

## **APÉNDICE II**

### **CONTRASTES DE SIGNIFICACIÓN**



## **APÉNDICE II: Contrastes de significación**

A continuación se resumen los contrastes de significación empleados en la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

### **II.1. CONTRASTE DE GRUBBS DE VALORES ANÓMALOS**

El *contraste de Grubbs* evalúa estadísticamente la presencia de valores anómalos en un conjunto de datos (Miller y Miller, 2002, pág. 56).

Para ello compara la desviación entre el valor sospechoso ( $v$ ) y la media muestral del conjunto de datos ( $\bar{x}$ ), con la desviación estándar del conjunto de datos ( $s$ ), donde tanto la media muestral como la desviación estándar se calculan incluyendo al valor sospechoso, siendo  $N$  el número de datos del conjunto.

La hipótesis nula a probar es que todos los datos del conjunto proceden de la misma población, y por tanto ninguno de ellos es anómalo, calculándose el estadístico  $G$  como:

$$G_{cal} = \frac{v - \bar{x}}{s}$$

Si el valor de  $G$  calculado supera el valor crítico para un determinado nivel de significación y  $N$  número de datos ( $G_{cal} > G$ ), se rechaza la hipótesis de que el dato sospechoso no es anómalo.

### **II.2. CONTRASTE DE FISHER PARA LA COMPARACIÓN DE DESVIACIONES ESTÁNDAR**

El *contraste de Fisher* compara las desviaciones estándar de dos series de datos y evalúa si existe diferencia significativa entre ellas (Miller y Miller, 2002, pág. 53). La hipótesis nula a probar es que ambas desviaciones son iguales. Para ello considera la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar (varianzas), calculándose el estadístico  $F$  como:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

siendo  $s_1$  y  $s_2$  las desviaciones estándar de la serie de datos **1** (de número  $N_1$  de datos) y **2** (de número  $N_2$  de datos), respectivamente, de modo que  $F$  sea siempre  $\geq 1$ .

Si el valor de  $F$  calculado supera al valor crítico de  $F$  para un determinado nivel de significación y  $N_1-1$  y  $N_2-1$  grados de libertad, es decir  $F_{cal} > F$ , se rechaza la hipótesis nula y se acepta que existe diferencia entre las desviaciones de las dos series de datos comparadas.

### **II. 3. COMPARACIÓN DE UNA MEDIA EXPERIMENTAL CON UN VALOR CONOCIDO**

Para comparar si la diferencia entre una media experimental ( $\bar{x}$ ) de un conjunto de valores ( $N$ ) y un valor conocido ( $\mu$ ) es significativa, o lo que es lo mismo, comprobar que se cumple la hipótesis nula que supone que el valor de la media de la población obtenido experimentalmente es el mismo que un valor conocido, se emplea el *contraste de t de Student*, (Miller y Miller, 2002, pág. 43) calculándose el estadístico  $t$  como:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{N}}{s}$$

siendo  $s$  la desviación estándar de la media muestral.

Si el valor absoluto de  $t$  es mayor que el valor crítico para un determinado nivel de significación y  $N-1$  grados de libertad, esto es  $|t_{cal}| > t$ , se rechaza la hipótesis nula, esto es, hay diferencia significativa a dicho nivel de significación entre la media muestral obtenida y el valor conocido con el que se ha comparado.

### **II. 4. COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS EXPERIMENTALES**

Para contrastar si dos medias experimentales difieren significativamente, se emplea el *contraste de t de Student* (Miller y Miller, 2002, pág. 45).

La hipótesis nula a probar es que no existe diferencia significativa entre las dos medias muestrales ( $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$ ) de dos series de datos, esto es que  $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$  no difiera significativamente de cero. Para ello se calcula el estadístico  $t$  como:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

siendo  $s_1$  y  $s_2$  las desviaciones estándar y  $N_1$  y  $N_2$  el número de datos de la serie 1 y 2 respectivamente, cuyos grados de libertad vienen dados por:

$$\text{grados de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{N_1^2(N_1-1)} + \frac{s_2^4}{N_2^2(N_2-1)}\right)}$$

redondeándose el valor obtenido al número entero más próximo.

Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes (*ver apartado II.2, contraste de Fisher*), se puede calcular una desviación estándar conjunta ( $s$ ) a partir de las individuales, de modo que:

$$s = \sqrt{\frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{(N_1 + N_2 - 2)}}$$

y el estadístico  $t$  se calcula como:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

teniendo  $N_1 + N_2 - 2$  grados de libertad.

Si el valor calculado de  $t$  supera el valor crítico de  $t$  ( $t_{cal} > t$ ) para un nivel de significación determinado y los grados de libertad correspondientes, entonces existe diferencia significativa entre las medias muestrales de ambas series de datos y se rechaza la hipótesis nula.

**II. 5. COMPARACIÓN DE VARIAS MEDIAS EXPERIMENTALES ENTRE SI**

Para comparar varias medias experimentales entre si, y comprobar que no difieren significativamente, se hace uso del *método ANOVA* (análisis de la varianza), de modo que contrasta si la diferencia entre las medias muestrales de varias series de datos es demasiado grande para ser debido a errores aleatorios, y por tanto difieren entre ellas (*Miller y Miller, 2002, pág. 59*).

Sean **h** series de datos, cuya media muestral de cada serie de datos ( $\bar{x}_i$ ) es obtenida a partir de **n** valores de datos, de modo  $x_{ij}$  es el *j-ésimo* valor de la *i-ésima* serie de datos,  $\bar{x}_i$  es la media muestral de la serie de datos **i** y  $\bar{x}$  la media de todos los valores individuales agrupados (media global), tal y como se muestra en la tabla siguiente:

Serie	Valores individuales	Media muestral
1	$x_{11} \ x_{12} \ \dots \ x_{1j} \ \dots \ x_{1n}$	$\bar{x}_1$
2	$x_{21} \ x_{22} \ \dots \ x_{2j} \ \dots \ x_{2n}$	$\bar{x}_2$
...		...
i	$x_{i1} \ x_{i2} \ \dots \ x_{ij} \ \dots \ x_{in}$	$\bar{x}_i$
...		...
h	$x_{h1} \ x_{h2} \ \dots \ x_{hj} \ \dots \ x_{hn}$	$\bar{x}_h$
		Media global = $\bar{X}$

La hipótesis nula a probar es que todas las muestras de series de datos se extraen de una población con media  $\mu$  y varianza  $\sigma^2$ , de modo que la varianza ( $s^2$ ) se puede estimar de dos formas, dentro de muestras  $s^2_{intra}$  o entre muestras  $s^2_{inter}$ , de modo que:

$$s^2_{intra} = \frac{\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{h(n-1)} \text{ con } \mathbf{h(n-1)} \text{ grados de libertad}$$

$$s^2_{inter} = n \frac{\sum_i (\bar{x}_i - \bar{X})^2}{(h-1)} \text{ con } \mathbf{h-1} \text{ grados de libertad}$$

Si la hipótesis nula es correcta, entre estas dos estimaciones de la varianza no deberían haber diferencias significativas, si no es así, la estimación entre series de datos ( $s^2_{inter}$ ), será mayor que la estimación dentro de las propias series de datos debido a la variación entre series, por lo que aplicando el *contraste de Fisher* se evaluará si hay diferencias significativas entre ambos modos de estimar la varianza, y por tanto si hay diferencias entre las diferentes medias muestrales.

$$F_{cal} = \frac{S_{inter}^2}{S_{intra}^2}$$

Si  $F_{cal} > F$  a un nivel de significación determinado y  $h-1$  y  $h(n-1)$  grados de libertad, entonces existe diferencia significativa entre las medias muestrales.

## II. 6. COMPARACIÓN DE DOS SERIES DE RESULTADOS EMPLEANDO UN MODELO DE REGRESIÓN LINEAL

El empleo de un modelo de regresión lineal para contrastar si los valores de dos series de datos son estadísticamente comparables entre sí es muy útil cuando lo que se comparan son los valores de concentración obtenidos por dos métodos analíticos diferentes.

Si en el eje de *ordenadas* se representan los valores obtenidos mediante un método cuya exactitud se desea evaluar, frente a los valores obtenidos con un método de probada exactitud (método de referencia), o bien con los valores reales, *en abscisas*, y ambas series de datos no difieren significativamente, se obtendrá una recta cuya ordenada en el origen (**a**) será cero, y su ordenada (**b**) será igual a uno.

Para contrastar esta hipótesis, se emplea el contraste de *t de Student*, de modo que:

$$(t_{cal})_a = \frac{|a - 0|}{s_a}$$

$$(t_{cal})_b = \frac{|b - 1|}{s_b}$$

siendo  $s_a$  la desviación estándar de la ordenada en el origen y  $s_b$  la desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión obtenida (Miller y Miller, 2002, pág. 130; de la Guardia et al., 1981; de la Guardia et al., 1983).

De modo que si los valores de **t** calculados para el contraste de la ordenada y de la pendiente exceden al valor crítico de **t** para un nivel de significación concreto y **N-2** grados de libertad (siendo **N** el número de puntos de la recta de regresión, o lo que es lo mismo, el número de pares de datos representados), entonces se debe rechazar la hipótesis nula y considerar que si que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por el método evaluado y los valores de referencia.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- ☞ Aghazarian V, Tchiakpe L, Reynier JP, Gayte-Sorbier A (1999) *Drug Dev Ind Pharm* 25:1277-1282
- ☞ Alanko L, Jolanki R, Estlander T, Kanerva L (2001) *Contact Dermatitis* 44:188
- ☞ Alpízar J, López R, Cerdá V (1997) *“Tratamiento de datos experimentales”*, Ed. Universitat de les Illes Balears, Servei de Publicacions i intercanvi Científic, Palma de Mallorca.
- ☞ Anastas PT (1999) *Crit Rev Anal Chem* 29:167-175
- ☞ Apgar B (1999) *Med Lett Drugs Ther* 41:43-44
- ☞ Ayora-Cañada MJ, Pascual-Reguera MI, Molina-Díaz A (1998) *Anal Chim Acta* 375:71-80
- ☞ Azevedo JS, Viana NS, Soares CDV (1999) *Farmaco* 54:573-578
- ☞ Baeyens WRG, Schulman SG, Calokerinos AC, Zhao Y, García-Campaña AM, Nakashima K, de Keukeleire D (1998) *J Pharm Biomed Anal* 17:941-953
- ☞ Barnett NW, Hindson BJ, Jones P, Smith TA (2002) *Anal Chim Acta* 451:181-188
- ☞ Barnett NW, Leneham CE, Lewis SW (1999) 18:346-353
- ☞ Berne B, Ros AM (1998) *Contact Dermatitis* 38:61-64
- ☞ Biloti DN, dos Reis MM, Ferreira MMC, Pessine FBT (1999) *J Mol Struct* 481:557-561
- ☞ Bosch-Ojeda C, Sanchez-Rojas F, Cano-Pavon JM (1995) *Talanta* 42:1195-1214
- ☞ Bowie AR, Sanders MG, Worsfold PJ (1996) *J Biolumin Chemilumin* 11:61-90
- ☞ Broadbent JK, Martincigh BS, Raynor MW, Salter LF, Moulder R, Sjöberg P, Markides KE (1996) *J Chromatogr A* 732:101-110
- ☞ Campins-Falcó P, Herráez-Hernández R, Sevillano-Cabeza A (1993) *Chromatographia* 35:317-320
- ☞ Campins-Falcó P, Tortajada-Genaro LA, Bosch-Reig F (2001) *Talanta* 55:403-413
- ☞ Cantrell A, McGarvey DJ, Mulroy L, Truscott TG (1999) *Photochem Photobiol* 70:292-297
- ☞ Capitán-Vallvey LF, Iglesias NN, de Orbe-Paya I, Castaneda RA (1997) *Mikrochim Acta* 126:153-157
- ☞ Capitán-Vallvey LF, Navas N, de Orbe I, Avidad R (1995) *Analisis* 23:448-451
- ☞ Capitán-Vallvey LF, Valencia MC, Arana-Nicolás E (2000) *Fresenius' J Anal Chem* 367-672-676
- ☞ Capitán-Vallvey LF, Valencia MC, Arana-Nicolás E (2001) *Analyst* 126:897-902
- ☞ Capitán-Vallvey LF, Valencia MC, Arana-Nicolás E (2002 a) *Mikrochim Acta* 138:69-76
- ☞ Capitán-Vallvey LF, Valencia MC, Arana-Nicolás E (2002 b) *Anal Lett* 35:65-81
- ☞ Cerdá V, Cerdá A, Cladera A, Oms MT, Mas F, Gómez E, Bauzá F, Miró M, Forteza F, Estela JM (2001) *Trends Anal Chem* 20:407-418

- Chang ML, Chang CM (2001) *Yaowu Shipin Fenxi* 9:199-206
- Chatjigakis AK, Donzé C, Coleman AW (1992) *Anal Chem* 64:1632-1634
- Cheng J, Li YS, Roberts RL, Walker G (1997) *Talanta* 44:1807-1813
- Chisvert A, Salvador A, Pascual-Martí MC (2001 a) *Anal Chim Acta* 428:183-190
- Chisvert A, Salvador A, Pascual-Martí MC, March JG (2001 b) *Fresenius' J Anal Chem* 369:684-689
- Chisvert A, Pascual-Martí MC, Salvador A (2001 c) *Fresenius' J Anal Chem* 369:638-641
- Chisvert A, Pascual-Martí MC, Salvador A (2001 d) *J Chromatogr A* 921:207-215
- Chisvert A, Vidal MT, Salvador A (2002 a) *Anal Chim Acta* 464:295-301
- Chisvert A, Izquierdo JV, Salvador A (2002 b) *Anal Bioanal Chem* 374:963-967
- Chisvert A, Salvador A (2002) *J Chromatogr A* 977:277-280
- Chou HJ, Yates RL, Havery DC, Wenninger JA (1995) *J AOAC Int* 78:1378-1383
- Chrompack Application Note 626-HPLC (2001) 1
- Christian GD (1994) *Analyst* 119:2309-2314
- Clark GD, Whitman DA, Christian GD, Ruzicka J (1990) *Crit Rev Anal Chem* 21:357-375
- Cook N, Freeman S (2001) *Australas J Dermatol* 42:257-259
- Cook N, Freeman S (2002) *Australas J Dermatol* 43:133-135
- Cumpelik BM (1982) *Cosmet Toilet* 97:67-75
- de la Guardia M, Salvador A, Berenguer V (1981) *Anales de Química, Serie B* 77:129-132
- de la Guardia M, Salvador A, Berenguer V (1983) *Anales de Química, Serie B* 79:446-447
- de las Heras ME, Ledo A (1996) *Piel* 11:327-332
- DiNunzio JE, Gadde RR (1990) *J Chromatogr* 519:117-124
- Dromgoole SH, Mailbach HI (1990) *J Am Acad Dermatol* 22:1068-1078
- Eiden F, Tenczer J, Melzer H (1969) *Deut Apoth Ztg* 109:1646-1649
- Eiden F, Tenczer J (1971) *Deut Apoth Ztg* 111:118-120
- Eiden F, Tittle C (1981 a) *Dtsch Apoth Ztg* 121:1874-1876
- Eiden F, Tittle C (1981 b) *Dtsch Apoth Ztg* 121:2693-2700
- Epstein JH (1999) *Semin Cutan Med Surg* 18:274-284
- Excoffer JL, Joseph M, Robinson JJ, Sheehan TL (1993) *J Chromatogr* 631:15-21
- FDA (1999) Department of Health and Human Services, 21CFR Parts 310, 352, 700 and 740, RIN 0910-AA01, Sunscreen Drug Products for over-the-counter Human Use Final Monograph, Federal Register, Rules and Regulations, 64: 27666-27693.

- ☞ Felix T, Hall BJ, Brodbelt JS (1998) *Anal Chim Acta* 371:195-203
- ☞ Fernandez C, Marti-Mestres G, Ramos J, Maillols H (2000) 24:155-165
- ☞ Fisher J, Sherma J (2000) *J Planar Chromatogr Mod TLC* 13:388-390
- ☞ Fletcher P, Andrew KN, Calokerinos AC, Forbes S, Worsfold PJ (2001) *Luminescence* 16:1-23
- ☞ Fourneron JD (2001) *J Chromatogr Sci* 39:160-164
- ☞ Funk JO, Dromgoole SH, Maibach HL (1995) *Dermatol Clin* 13:473-48
- ☞ Gagliardi L, Amato A, Basili A, Cavazzutti G, Gattavechia E, Tonelli D (1986) *J Chromatogr* 362:450-454
- ☞ Gagliardi L, Amato A, Basili A, Cavazzutti G, Tonelli D (1987) *J Chromatogr* 408:409-415
- ☞ Gagliardi L, Cavazzutti G, Montanarella L, Tonelli D (1989) *J Chromatogr* 464:428-433
- ☞ Gagliardi L, Amato A, Tuchetto L, Cavazzutti G, Tonelli D (1990) *Anal Lett* 23:2123-2133
- ☞ Gámiz-Gracia L, Luque de Castro MD (1999 a) *Analyst* 124:1119-1121
- ☞ Gámiz-Gracia L, Luque de Castro MD (1999 b) *J Anal At Spectrom* 14:1615-1617
- ☞ García CD, Ortiz PI (2000) *Electroanalysis* 12:1074-1076
- ☞ García-Campaña AM, Baeyens WRG (2000) *Analisis* 28:686-698
- ☞ García-Roig AM, Garcia de Torres A, Cano-Pavon JM, Bosch-Ojeda C (1998) *Talanta* 47:463-470
- ☞ Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF (1998) *Photochem Photobiol* 68:243-256
- ☞ Gerakis AM, Koupparis MA (1993) *Analyst* 118:1001-1006
- ☞ Gilchrest BA (1996) *Br J Dermatol* 135:867-875
- ☞ Griffiths HR, Mistry P, Herbert KE, Lunec J (1998) *Crit Rev Clin Lab Sci* 35:189-237
- ☞ Gubeli T, Christian GD, Ruzicka J (1991) *Anal Chem* 63: 2407-2413
- ☞ Hagedorn-Leweke U, Lippold BC (1995) *Pharm Res* 12:1354-1360
- ☞ Hany J, Nagel R (1995) *Dtsch Lebenm Rundsch* 91:341-345
- ☞ Herpol-Borremans M, Masse MO (1992) *Int J Cosmet Sci* 14:113-119
- ☞ Herráez-Hernández R, Campins-Falcó P (2000) *J Chromatogr B* 740:169-177
- ☞ Hild J (1993) *Dtsch Lebensm Rundsch* 89:7-10
- ☞ Hindson BJ, Barnett NW (2001) *Anal Chim Acta* 445:1-19
- ☞ Hruza LL, Pentland AP (1993) *J Invest Dermatol* 100:35S-41S
- ☞ Ikeda K, Suzuki S, Watanabe Y (1989) *J Chromatogr* 482:240-245
- ☞ Ikeda K, Suzuki S, Watanabe Y (1990) *J Chromatogr* 513:321-326
- ☞ Irima G, Mocanu R, Olaru R, Sărghie I (1997) *Revista De Chimie* 48:395-398

- Japanese SCI, 1985 "Japanese Standard of Cosmetic Ingredients", Yakuji Nippo Ltd., Tokyo
- Jiang R, Hauden CGJ, Prankerd RJ, Roberts MS, Benson HAE (1996) *J Chromatogr B*, 682:137-145
- Job P (1928) *Ann Chim* 9:113
- Kadry AM, Okereke CS, Abdel-Rhaman MS, Friedman MA, Davis RA (1995) *J Appl Toxicol* 15:97-102
- Karlbert B, Pacey GE (1989) *"Flow Injection Analysis: a Practical Guide"*, Ed. Elsevier, Amsterdam
- Kawauchi A, Ishida M, Saitoh I (1996) *Spectrosc Lett* 29:345-366
- Klampfl CW, Leitner T, Hilder EF (2002) *Electrophoresis* 23:2424-2429
- Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM (1980) *J Am Acad Dermatol* 3:30-35
- König H (1984) *Fette Seifen Anstrich* 86:37-41
- König H, Ryschka R (1983) *Fresenius' Z Anal Chem*, 315:434-437
- Krutmann J (2000) *J Dermatol Sci* 23:522-526
- Kus S, Marczenko Z, Obarski N (1996) *Chem Anal* 41:899-929
- Lázaro F, Luque de Castro MD, Valcárcel M (1988) *J Pharm Biomed Anal* 6:585-598
- Lenehan CE, Barnett NW, Lewis SW (2002) *Analyst* 127:997-1020
- León-González ME, Santos-Delgado MJ, Polo-Díez LM (1990) *Fresenius' J Anal Chem* 337:389-392
- Li J, Kang JX, Wu DN (2000) *Sepu* 18:462-464
- Liem PH, Hilderink H (1979) *Int J Cosmet Sci* 1:341-361
- Liu XZ, Fang ZL (1999) *Fenxi Kexue Xuebao* 15:70-78
- López-Lavernia N, García-Mateo JV, Martínez-Calatayud J (1999) *J Flow Injection Anal* 16:213-233
- Lu Y (1987) *Huaxue Shijie* 28:210-212
- Luque de Castro MD, Valcárcel M (1984) *Analyst* 109:413-419
- Luque de Castro MD (1986) *J Autom Chem* 8:56-62
- MacCarthy P (1975) *Anal Chem* 50:2165
- Mackie BS, Mackie LE (1999) *Australas J Dermatol* 40:51-53
- Makino K, Mossoba MM, Riesz P (1983) *J Phys Chem* 87:1369-1377
- March JG, Simonet BM, Grases F (2001) *Clin Chim Acta* 314:187-194
- Marshall GD, van Staden JF (1992) 3:251-261
- Mason JT (1980) *J Pharm Sci* 69:101-102
- Masse MO, Herpol-Borremans M (1991) *Int J Cosmet Sci* 13:303-315
- Masse MO, Herpol-Borremans M (2001) *Int J Cosmet Sci* 23:325-331
- Masse MO, Herpol-Borremans M, Grimee R, Gleviczky S (1982) *Int J Cosmet Sci* 4:235-246

- ☞ Masse MO, Delporte C, Bervelt E (2001) *Int J Cosmet Sci* 23:259-279
- ☞ Mazonakis NE, Karathanassi PH, Panagiotopoulos DP, Hamosfakidi PG, Melissos DA (2002) *Anal Chim Acta* 467:261-266
- ☞ Meijer J, Loden M (1995) *J Liq Chromatogr* 18:1821-1832
- ☞ Meunier L, Raison-Peyron N, Meynadier J (1998) *Rev Med Interne* 19:247-254
- ☞ Meyer TA, Powell JB (1991) *J Assoc Off Anal Chem* 74:766-771
- ☞ Miller JN, Miller JC (2002) "Estadística y Quimiometría para Química Analítica", 4ª Edición, Ed. Pearson Educación S.A., Madrid
- ☞ Ministerio de Sanidad y Consumo, Secretaria General Técnica, "Métodos oficiales de análisis de los productos cosméticos", Monografías de divulgación (Núm. 17), Centro de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (1998).
- ☞ Miro O, Alsina C, Peris P, Cardellach F (1997) *Med Clin* 109:479
- ☞ Mizukoshi Y, Nakamura H, Bandow H, Maeda Y, Nagata Y (1999) 6:203-209
- ☞ Moller J (1989) "Flow Injection Analysis", Ed. Springer, Heidelberg
- ☞ Morales-Rubio A, Julian-Ortiz JV, Salvador A, de la Guardia M (1994) *Microchem J* 49:12-19
- ☞ Mori K, Itoh K, Suzuki S, Nakamura H (1996) *Jpn J Toxicol Environ Health* 42:60-66
- ☞ Morin N, Cornet S, Guinchard C, Rouland JC, Guillauma YC (2000) *J Liq Chromatogr Relat Technol* 23:727-739
- ☞ Moyal D (1998) *Eur J Dermatol* 8:209-211
- ☞ Murali-Krishna C, Kondo T, Riesz P (1989) 93:5166-5172
- ☞ Musial B, Sherma J (1997) *J Planar Chromatogr Mod TLC* 10:368-371
- ☞ Musial B, Sherma J (1998) *Acta Chromatogr* 8:5-12
- ☞ Namiesnick J (2001) *J Sep Sci* 24:151-153
- ☞ Narayanan VA, Bello JM, Stokes DL, Vo-Dinh T (1991) *Analisis* 19:307-310
- ☞ Nohynek G, Schaefer H (2001) *Regul Toxicol Pharmacol* 33:285-299
- ☞ Nowakowski R, Bielejewska A, Duszczuk K, Sybilska D (1997) *J Chromatogr A* 782:1-11
- ☞ Ohba M, Nakamura K, Matsuoka M (1991) *Yakugaku Zasshi* 111:542-545
- ☞ Ohshima T, Saito E (1987) *Gekkan Yakuji* 29:2477-2482
- ☞ Okereke CS, Abdel-Rhman MS, Friedman MA (1994) *Toxicol Lett* 73:113-122
- ☞ Pasekova H, Polasek M, Solich P (1999) *Chem Listy* 93:354-359
- ☞ Paulus GL (1972) *J Assoc Off Anal Chem* 55:47-50
- ☞ Peterson KL, Logan BK, Christian GD, Ruzicka J (1997) *Anal Chim Acta* 337:99-106
- ☞ Pietta PG, Bruno A, Mauri PL, Gardana C, Maffei-Facino R, Carini M (1995) *J Pharm Biomed Anal* 13:229-235

- ☞ Pottard G, Laugel C, Baillet A, Schaefer H, Marty JP (1999) *Int J Pharm* 189:249-260
- ☞ Rajewski RA, Stella VJ (1996) *J Pharm Sci* 85:1142-1169
- ☞ Rastogi SC (2002) *Contact Dermatitis* 46:348-351
- ☞ Rastogi SC, Jensen GH (1998) *J Chromatogr A* 828:311-316
- ☞ Ricci C, Vaccari S, Cavalli M, Vincenzi C (1997) *Am J Contact Dermat* 8:165-166
- ☞ Ro KW, Choi JB, Lee MH, Kim JW (1994) *J Chromatogr A* 688:375-382
- ☞ Rocha FRP, Nobrega JA, Fatibello O (2001) *Green Chem* 3:216-220
- ☞ Ródenas V, Soledad-García M, Sanchez-Pedreño C, Albero M (1998) *Analyst* 123:1749-1752
- ☞ Roussel C, Favrou A (1995) *J Chromatogr A* 704:67-74
- ☞ Ruzicka J (1992) *Anal Chim Acta* 261:3-10
- ☞ Ruzicka J, Gubeli T (1991) *Anal Chem* 63:1680-1685
- ☞ Ruzicka J, Hansen HE (1975) *Anal Chim Acta* 78:145-157
- ☞ Ruzicka J, Hansen EH (1980) *Anal Chim Acta* 114:19-44
- ☞ Ruzicka J, Hansen HE (1981) *"Flow Injection Analysis"*, Ed. Wiley, Nueva York
- ☞ Ruzicka J, Hansen EH (1983) 145:1-15
- ☞ Ruzicka J, Hansen EH (1986) *Anal Chim Acta* 180:1-67
- ☞ Ruzicka J, Hansen EH (2000) *Anal Chem* 72:212A-217<sup>a</sup>
- ☞ Ruzicka J, Marshall GD (1990) *Anal Chim Acta* 237:329-343
- ☞ Sakai T, Teshima N (2001) *Bunseki* 6:289-295
- ☞ Salman S, Haupt K, Ramanathan K, Danielsson B (1997) *Anal Commun* 34:329-332
- ☞ Salvador A, Pascual-Martí MC, Chisvert A (2000 a) *NCP Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos* 250:3-8
- ☞ Salvador A, Pascual-Martí MC, Adell JR, Requeni A, March JG (2000 b) *J Pharm Biomed Anal* 22:301-306
- ☞ Salvador A, Chisvert A, Camarasa A, Pascual-Marí MC, March JG (2001 a) *Analyst* 126:1462-1465
- ☞ Salvador A, Gadea I, Chisvert A, Pascual-Martí MC (2001 b) *Chromatographia* 54:795-797
- ☞ Salvador A, Chisvert A, de la Ossa MD, Vidal MT (2002 a) *NCP Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos* 264:9-16
- ☞ Salvador A, Pascual-Martí MC, Chisvert A, de la Ossa MD (2002 b) *Green Chem* 4:G57-G58
- ☞ Scalia S (2000) *J Chromatogr A* 870:199-205
- ☞ Scalia S, Villani S, Scatturin A, Vandelli MA, Forni F (1998) *Int J Pharm* 175:205-213
- ☞ Schauder S, Ippen H (1997) *Contact Dermatitis* 37:221-232
- ☞ Schmidt T, Ring J, Abeck D (1998) *Dermatology* 196:354-357
- ☞ Schmitz-Masse MO, Herpol-Borremans M, Parmentier F (1979) *Int J Cosmet Sci* 1:101-110

- ☞ Schneider P, Bringham A, Gonzenbach H (1996) *Drug Cosmet Ind*, 159:32-38
- ☞ Scurei D, Oprea M (1996) *Revista De Chimie* 47:564-571
- ☞ Shaw AA, Wainschel LA, Shetlar MD (1992) *Photochem Photobiol* 55:657-663
- ☞ Shih Y, Cheng FC (2000) *J Chromatogr A* 876:243-246
- ☞ Simonet BM, Grases F, March JG (2001) *Fresenius' J Anal Chem* 369:96-102
- ☞ Skoog DA, West DM, Holler FJ (1997) "Fundamentos de Química Analítica", 4ª edición, Ed. Reverté, S.A., Barcelona
- ☞ Taljaard RE, van Staden JF (1998) *Lab Rob Autom* 10:325-337
- ☞ Tan HSI, Sih R, Moseley SE, Lichtin JL (1984) *J Chromatogr* 291:275-282
- ☞ Tomasella FP, Zuting P, Love LJC (1991) *J Chromatogr* 587:325-328
- ☞ Townshend A (1990) *Analyst* 115:495-500
- ☞ Townshend A (1985) *Anal Proc* 22:370-371
- ☞ Townshend A, Wheatley RA, Chisvert A, Salvador A (2002) *Anal Chim Acta* 462:209-215
- ☞ Treffel P, Gabard B (1996) *Pharm Res* 13:770-774
- ☞ Trojanowicz M (2000) "Flow Injection Analysis: Instrumentation and Applications", Ed. World Scientific Publishing Co., Singapur
- ☞ Ueno K, Kina K (1983) "Introduction to Flow Injection Analysis", Ed. Kodansha Scientific, Tokio
- ☞ Urbach F (1989) *Photochem Photobiol* 50:507-513
- ☞ Valcárcel M, Luque de Castro MD (1987) "Flow Injection Analysis. Principles and Applications", Ed. Ellis Horwood, Chichester
- ☞ Valcárcel M, Luque de Castro MD (1990) *Fresenius' J Anal Chem* 337:662-666
- ☞ van Gemert JT (1973) *Talanta* 20:1045-1075
- ☞ van Staden JF, du Plessis H, Linsky SM, Taljaard RE, Kremer B (1997) *Anal Chim Acta* 354:59-64
- ☞ van Staden JF, Taljaard RE (1996) *Anal Chim Acta* 323:75-85
- ☞ Vanquerp V, Rodríguez C, Coiffard C, Coiffard LJM, Roeck-Holtzhauer YD (1999) *J Chromatogr A* 832:273-277
- ☞ Vereda E, Rios A, Valcarcel M (1997) *Analyst* 122:85-88
- ☞ Wallner P (1993) *Dtsch Lebensm Rundsch* 89:375-379
- ☞ Wang JH, Hansen EH (2000) *Anal Lett* 33:2747-2766
- ☞ Wang JH, Hansen EH (2001) *Anal Chim Acta* 435:331-342
- ☞ Wang LH (1999) *Chromatographia* 50:565-570
- ☞ Wang LH (2002) *Electroanalysis* 14:773-781
- ☞ Wang SP, Chen WJ (2000) *Anal Chim Acta* 416:157-167
- ☞ Westgate E, Sherma J (2000 a) *J Liq Chromatogr Relat Technol* 23:609-615

- 📖 Westgate E, Sherma J (2000 b) Am Lab 32:13-20
- 📖 Westgate E, Sherma J (2000 c) Int Lab 30:36-40
- 📖 Whitmore SE, Morison WL (1995) Arch Dermatol 131:1128-1133
- 📖 Yao XY, Zheng XQ, Qin XY, Qi QP (1998) Sepu 16:223-225
- 📖 Zang XR, Baeyens WRG, Van der Weken G, Calokerinos AC, Imai K (1995) 303:137-142

**ARTÍCULOS PUBLICADOS PERTENECIENTES**  
**A ESTA TESIS DOCTORAL**



### Relacionados con el Capítulo 1:

- 1.- *Revisión de los métodos oficiales de análisis de los productos cosméticos. Posibilidades de actualización.*  
A. Salvador, M.C. Pascual-Martí, A. Chisvert, NCP-Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos, 250 (2000) 3.
- 2.- *Métodos analíticos limpios para el control de producción en la industria cosmética: análisis de productos cosméticos para la protección solar.*  
A. Salvador, A. Chisvert, M. de la Ossa, M.T. Vidal, NCP-Boletín de la Sociedad Española de Químicos Cosméticos, 264 (2002) 9.
- 3.- *Green analytical strategies for sunscreen control.*  
A. Salvador, M.C. Pascual-Martí, A. Chisvert, M.D. de la Ossa, Green Chem., 4 (2002) G57.  
[http://www.rsc.org/delivery/\\_ArticleLinking/DisplayArticleForFree.cfm?doi=b210802j&JournalCode=GC](http://www.rsc.org/delivery/_ArticleLinking/DisplayArticleForFree.cfm?doi=b210802j&JournalCode=GC)

### Relacionados con el Capítulo 2:

- 4.- *Simultaneous determination of oxybenzone and 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate in sunscreen formulations by flow injection-isodifferential derivative ultraviolet spectrometry.*  
A. Chisvert, A. Salvador, M.C. Pascual-Martí, Anal. Chim. Acta, 428 (2001) 183.  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6TF4-42347CK-4-15&\\_cdi=5216&\\_user=1647180&\\_orig=browse&\\_coverDate=02%2F09%2F2001&\\_sk=995719997&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWb&md5=cad72a4a63f8b488ab1cf416ab13f7c1&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TF4-42347CK-4-15&_cdi=5216&_user=1647180&_orig=browse&_coverDate=02%2F09%2F2001&_sk=995719997&view=c&wchp=dGLzVlz-zSkWb&md5=cad72a4a63f8b488ab1cf416ab13f7c1&ie=/sdarticle.pdf)

### Relacionados con el Capítulo 3:

- 5.- *Efficient flow injection and sequential injection methods for spectrophotometric determination of oxybenzone in sunscreen based on reaction with Ni(II).*  
A. Chisvert, A. Salvador, M.C. Pascual-Martí, J.G. March, Fresenius' J. Anal. Chem., 369 (2001) 684.  
<http://www.springerlink.com/content/c4dfwp1fur1qglm4/fulltext.pdf>

#### **Relacionados con el Capítulo 4:**

- 6.- Sequential injection analysis for benzophenone-4 and phenylbenzimidazole sulphonic acid in sunscreen sprays by solid-phase extraction coupled with ultraviolet spectrometry.  
A. Chisvert, M.T. Vidal, A. Salvador, Anal. Chim. Acta, 464 (2002) 295.  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6TF4-461XGTK-8-11&\\_cdi=5216&\\_user=1647180&\\_orig=browse&\\_coverDate=08%2F06%2F2002&\\_sk=995359997&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWA&md5=13864ecba2d2414a89658028a20b128c&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TF4-461XGTK-8-11&_cdi=5216&_user=1647180&_orig=browse&_coverDate=08%2F06%2F2002&_sk=995359997&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWA&md5=13864ecba2d2414a89658028a20b128c&ie=/sdarticle.pdf)

#### **Relacionados con el Capítulo 5:**

- 7.- Flow injection-chemiluminescence determination of octal dimethyl PABA in sunscreen formulations.  
A. Townshend, R.A. Wheatley, A. Chisvert, A. Salvador, Anal. Chim. Acta, 462 (2002) 209.  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6TF4-45VCHP8-G-W&\\_cdi=5216&\\_user=1647180&\\_orig=browse&\\_coverDate=07%2F01%2F2002&\\_sk=995379997&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzV&md5=7940c868560e99ea3560e1ee74e3c04d&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TF4-45VCHP8-G-W&_cdi=5216&_user=1647180&_orig=browse&_coverDate=07%2F01%2F2002&_sk=995379997&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzV&md5=7940c868560e99ea3560e1ee74e3c04d&ie=/sdarticle.pdf)

#### **Relacionados con el Capítulo 6:**

- 8.- Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC.  
A. Chisvert, M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, Fresenius' J. Anal. Chem., 369 (2001) 638.  
<http://www.springerlink.com/content/mfnpn8yuhrt5vq7ep/fulltext.pdf>

#### **Relacionados con el Capítulo 7:**

- 9.- Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatography. Use of cyclodextrins as mobile phase modifier.  
A. Chisvert, M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, J. Chromatogr. A, 921 (2001) 207.  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6TG8-438BMSV-B-C&\\_cdi=5248&\\_user=1647180&\\_orig=browse&\\_coverDate=07%2F06%2F2001&\\_sk=990789997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWW&md5=04ab1eb63454067c2f4698120b6ac159&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TG8-438BMSV-B-C&_cdi=5248&_user=1647180&_orig=browse&_coverDate=07%2F06%2F2001&_sk=990789997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWW&md5=04ab1eb63454067c2f4698120b6ac159&ie=/sdarticle.pdf)

### **Relacionados con el Capítulo 8:**

10.- Determination of water-soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography.

A. Chisvert, A. Salvador, J. Chromatogr. A, 977 (2002) 277.

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6TG8-46YJ2J2-7-5&\\_cdi=5248&\\_user=1647180&\\_orig=browse&\\_coverDate=11%2F22%2F2002&\\_sk=990229997&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkWb&md5=8be06f9bcf7d11812bbc0b73332c1133&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TG8-46YJ2J2-7-5&_cdi=5248&_user=1647180&_orig=browse&_coverDate=11%2F22%2F2002&_sk=990229997&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkWb&md5=8be06f9bcf7d11812bbc0b73332c1133&ie=/sdarticle.pdf)

### **Relacionados con el Capítulo 9:**

11.- Sensitive sequential-injection system for the determination of 2-phenylbenzimidazole-5-sulphonic acid in human urine samples using on-line solid-phase extraction coupled with fluorimetric detection.

M.T. Vidal, A. Chisvert, A. Salvador, Talanta, 59 (2003) 591.

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6THP-47MJ56R-1-C&\\_cdi=5288&\\_user=1647180&\\_orig=browse&\\_coverDate=03%2F01%2F2003&\\_sk=999409996&view=c&wchp=dGLbVlzSkWA&md5=59217f0b7bac181d5506bea2cdc4800c&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6THP-47MJ56R-1-C&_cdi=5288&_user=1647180&_orig=browse&_coverDate=03%2F01%2F2003&_sk=999409996&view=c&wchp=dGLbVlzSkWA&md5=59217f0b7bac181d5506bea2cdc4800c&ie=/sdarticle.pdf)

