



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ALYNE TADA FERREIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
N-NITROSAMINAS EM *SHAMPOO* POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA *ON-LINE*
À CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

**CAMPINAS
2018**

ALYNE TADA FERREIRA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
N-NITROSAMINAS EM *SHAMPOO* POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA *ON-LINE*
À CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Química na área de Química
Analítica**

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath

O ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ALYNE TADA FERREIRA SANTOS E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. SUSANNE RATH.

**CAMPINAS
2018**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Santos, Alyne Tada Ferreira, 1986-
Sa59d Desenvolvimento de método para a determinação de N-nitrosaminas em shampoo por extração em fase sólida on-line à cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial / Alyne Tada Ferreira Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Susanne Rath.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. N-nitrosaminas. 2. Cosméticos. 3. Preparo de amostra - Química. 4. On-line SPE-UHPLC-MS/MS. I. Rath, Susanne, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Method development for the determination of N-nitrosamines in shampoo using on-line solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

N-nitrosamines

Cosmetics

Sample preparation

On-line SPE-UHPLC-MS/MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Susanne Rath [Orientador]

Isarita Martins Sakakibara

José Alberto Fracassi da Silva

Data de defesa: 10-12-2018

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Susanne Rath (Orientadora)

Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara (Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG)

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo(a) aluno(a) **ALYNE TADA FERREIRA SANTOS**, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, minha irmã e meu irmão pelo apoio e por me darem condições de chegar até aqui, especialmente ao meu companheiro, Yuri, pelas horas dedicadas a me ajudar, pela paciência e pelo apoio nos momentos difíceis.

À Profa. Susanne, pela oportunidade e, principalmente, pela paciência. Sua sabedoria e esforço me ajudaram a alcançar os objetivos traçados.

A todos do laboratório Bioanalítica Paracelsus, Andreza, Natália, Rafael, Priscilla, Rudson e Tamires a presença de vocês tornou meus dias de trabalho mais felizes. Em especial agradeço ao Caio, pois sem sua ajuda esse trabalho não seria possível e a Rhannanda, pela parceria, pelos finais de semana de trabalho e pela diversão.

A Unicamp por oferecer excelentes pesquisadores e um ambiente de aprendizado que proporcionaram o meu desenvolvimento durante o mestrado.

Ao Instituto Federal de Brasília por me conceder o afastamento e permitir minha participação no programa, em especial aos meus colegas de trabalho por “segurarem as pontas” na minha ausência.

RESUMO

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o Brasil é um dos maiores mercados de cosméticos infantil. Dentre os produtos direcionados para esse público está o *shampoo*, que contém ingredientes específicos para a pele delicada e requer atenção especial quanto à segurança. Em princípio, produtos registrados não devem conter substâncias que possam causar risco à saúde do usuário. No entanto, contaminantes podem ser encontrados em produtos cosméticos e de higiene pessoal devido à matéria-prima contaminada, degradação de ingredientes ou por reações entre ingredientes e precisam ser controlados. Entre os contaminantes de preocupação em produtos de higiene pessoal e cosméticos destacam-se as N-nitrosaminas que são considerados potentes carcinógenos, além de apresentarem ação teratogênica e mutagênica em animais de laboratório. A N-nitrosodietanolamina (NDELA) tem sido detectada em cosméticos, loções, *shampoos* e fluídos cutâneos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico para a determinação de NDELA em *shampoo* para bebê usando a extração em fase sólida *on-line* à cromatografia líquida de ultra-alta eficiência associada a espectrometria de massas sequencial (SPE-UHPLC-MS/MS). Foram avaliados diferentes preparos de amostra para realizar o *clean-up* e o mais eficiente foi a extração em fase sólida *off-line*, usando como sorbente a fase C18 (1,5 g). A concentração da NDELA, anterior à quantificação, foi realizada no SPE *on-line*, usando a coluna Oasis HLB, cuja otimização foi realizada por planejamento composto central. As condições ótimas foram: vazão da bomba quaternária de $0,87 \text{ mL min}^{-1}$, tempo de carregamento de 0,27 minutos e 100% de água como solvente de carregamento. A fonte de *electrospray* (ESI) foi operada no modo positivo e a quantificação foi realizada no modo de reações selecionadas, com um íon de quantificação e outro de confirmação de identidade. A coluna analítica utilizada foi a UPLC[®] CSH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm), com fase móvel composta de 0,1% de ácido fórmico em água: metanol, e eluição em gradiente. A quantificação da NDELA foi feita por padronização interna utilizando o *surrogate* NDELA-d₈. O método apresentou linearidade no solvente na faixa entre (1,0 – 20,0 ng mL⁻¹) e na matriz entre (10 - 100 ng g⁻¹). O LOQ determinado foi de 10 ng g⁻¹. A precisão intra-dia foi de 9,1 a 19,2% (n=3, em 3 dias) e a inter-dia de 15,3% (n=9). Das quatro amostras analisadas, uma apresentou NDELA na concentração de 54 ng g⁻¹, duas abaixo do limite de detecção do método e uma com concentração abaixo do limite de quantificação.

ABSTRACT

According to the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA), the country is one of the largest markets for children's cosmetics. Among the products targeted to this public is the shampoo, which contains specific ingredients for delicate skin and requires special attention to safety. In principle, registered products should not contain substances that could pose a risk to the consumer's health. However, contaminants can be found in cosmetic and personal care products due to the contaminated raw material, degradation of ingredients or by reactions between ingredients and need to be controlled. Among the contaminants of concern in personal hygiene products and cosmetics are the N-nitrosamines that are considered potent carcinogens, besides being teratogenic and mutagenic in laboratory animals. N-nitrosodiethanolamine (NDELA) has been detected in cosmetics, lotions, shampoos and skin care products. The objective of this work was to develop an analytical method for the determination of NDELA in baby shampoo using solid-phase extraction on-line ultra-high performance liquid chromatography associated with sequential mass spectrometry (SPE-UHPLC-MS/MS). Different sample preparations were evaluated for *clean up* and the most efficient was off-line solid phase extraction using C18 phase (1.5 g) as the sorbent. The NDELA concentration, before the quantification, was performed in the SPE on-line, using an Oasis HLB column, whose optimization was performed by a central composite experimental design. The optimum conditions were: quaternary pump flow rate of 0.87 mL min⁻¹, loading time of 0.27 minutes and 100% water as the loading solvent. The electrospray source (ESI) was operated in the positive mode and the quantification was performed in the mode of selected reaction monitoring, with a quantification ion and another of confirmation of identity. The analytical column used was UPLC[®] CSH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 μm), with a mobile phase composed of 0.1% formic acid in water: methanol, and gradient elution. NDELA quantification was done by internal standardization using NDELA-d₈ as a surrogate. The method showed linearity in the solvent between 1.0 to 20.0 ng mL⁻¹ and in the sample matrix between 10 to 100 ng g⁻¹. The LOQ was 10 ng g⁻¹. Intra-day precision ranged from 9.1 to 19.2% (n = 3, within 3 days) and the inter-day value was 15.3% (n = 9). Of the four analyzed samples, one presented NDELA at the concentration of 54 ng g⁻¹; two samples presented NDELA less than the limit of detection of the method and one sample a concentration lower than the limit of quantitation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Disposição metabólica da NDELA em roedores. ADH – álcool desidrogenase; CYP, citocromo P450; NAD - nicotinamida adenina dinucleótido; NADPH - fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida). Fonte: (LOEPPKY, 1999).26
- Figura 2:** Estrutura geral das N-nitrosaminas.32
- Figura 3:** Exemplos de tensoativos e suas classificações. A: tensoativo aniônico lauril éter sulfato de sódio; B: tensoativo anfótero cocamidopropil betaína; C: tensoativo catiônico cloreto de dodecil trimetil amônio; D: tensoativo não iônico.cocamida dietanolamina.....38
- Figura 4:** Esquema simplificado do SPE *on-line* à cromatografia líquida. A configuração permite o acoplamento da coluna SPE e da coluna analítica, viabilizando a concentração do analito, o *clean up* e a separação. Fonte: Próprio autor.46
- Figura 6:** Configuração do sistema no modo de carregamento. A direção da fase móvel da bomba binária está representada pela linha azul e a direção do solvente propulsionado pela bomba quaternária pela linha vermelha. As válvulas são configuradas na posição 1:160
- Figura 7:** Configuração do sistema no modo de eluição. A direção da fase móvel da bomba binária está representada pela linha vermelha e a direção do solvente propulsionado pela bomba quaternária pela linha azul. As válvulas são configuradas na posição 2:1.60
- Figura 8:** Esquema da avaliação do preparo de amostras utilizando a SPE C18. Fonte: Próprio autor.....69
- Figura 9:** Valores das áreas dos picos em razão do aditivo e da vazão da bomba binária. Volume injetado: 2 µL de solução padrão 1,0 µg mL⁻¹, temperatura da coluna analítica: 40 °C, temperatura do *sample manager*: 10 °C. Condições de carregamento: 100% de água (v/v) como solvente de carregamento, vazão da QSM de 1,0 mL min⁻¹

e tempo de carregamento de 0,40 minutos. A barra de erros expressa o desvio das três replicatas.80

Figura 10: Cromatogramas dos analitos utilizando ácido fórmico 0,1% v/v como aditivo e metanol como fase orgânica. Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: 0,3 mL min⁻¹. Gradiente da BQ (água:metanol, v/v): inicial (100:0), 0,4 min (100:0), 2,7 min (0:100), 4,60 min (0:100), 4,61 min (100:0), 7,0 min (100:0); vazão da BQ: 1,0 mL min⁻¹; volume de injeção 2 µL; temperatura da coluna: 40 °C; temperatura do sample manager: 10 °C.84

Figura 11: Superfícies de resposta do modelo quadrático para a interação entre as variáveis. Figura à esquerda: x₂ (tempo de carregamento em minutos) e x₃ (vazão mL min⁻¹) Figura à direita: x₁ (% de H₂O) e x₂ (tempo de carregamento em minutos).....89

Figura 12: Área dos picos cromatográficos das N-nitrosaminas usando o sistema SPE-UHPLC-MS/MS em função do volume de injeção de 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL e 250 µL de solução padrão 10 ng mL⁻¹ de N-nitrosaminas. Condição de carregamento na coluna SPE Oasis: 100% de H₂O, vazão da BQ: 0,870 mL min⁻¹, tempo de carregamento da amostra 0,27 min;.....90

Figura 13: Linha do tempo para a bomba binária e quaternária, incluindo os eventos das válvulas.....92

Figura 14: Cromatograma do método final SPE-UHPLC-MS/MS para solução padrão de MIX de N-nitrosaminas na concentração de 10 ng mL⁻¹. Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,27 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: 0,3 mL min⁻¹. Gradiente da BQ (água:metanol, v/v): inicial (100:0), 0,27 min (100:0), 2,7 min (0:100), 4,60 min (0:100), 4,61 min (100:0), 7,0 min (100:0); vazão da BQ: 0,870 mL min⁻¹, tempo de carregamento da amostra 0,27 min; volume de injeção 200 µL; temperatura da coluna: 40°C; temperatura do sample manager: 10°C.....93

Figura 15: Estrutura do sorbente OASIS HLB. A estrutura destacada em azul é a N-vinilpirrolidona e a estrutura destacada em amarela é o divinilbenzeno. Fonte: (WATERS, 2008).....	96
Figura 16: Área dos analitos em função da quantidade de sorbente, volume de eluato 1 e eluato 2 e 3.....	104
Figura 17: Lauril sulfato de sódio	105
Figura 18: Lauril éter sulfato de sódio	105
Figura 19: Interação entre a fase estacionária C18 e o tensoativo lauril éter sulfato de sódio. Fonte: figura adaptada de (MAJORS, 2013).....	105
Figura 20: Área da NDELA em função do volume de diluição da amostra e do eluato 2.	106
Figura 21: Área dos analitos em função da quantidade de amostra “E” fortificada com 200 ng de padrão: 1,0 g (200 ng g ⁻¹) e 0,5 g (400 ng g ⁻¹).....	106
Figura 22: Cromatograma SRM de nove amostras fortificadas com NDELA-d ₈ no nível de 100 ng g ⁻¹ . O preparo das amostras seguiu o descrito no item 3.9.5, usando cartucho SPE C18. Condições do SPE <i>on line</i> : coluna de SPE Oasis HLB, 100% H ₂ O como solvente de carregamento, tempo de carregamento de 0,27 min, volume de injeção 200 µL, vazão da BQ: 0,870 mL min ⁻¹ . Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,27 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: 0,3 mL min ⁻¹ . Temperatura da coluna: 40 °C; temperatura do <i>sample manager</i> : 10 °C.	109
Figura 23: Cromatograma SRM da amostra “E” fortificadas com NDELA-d ₈ no nível de 50 ng g ⁻¹ . O preparo das amostras seguiu o descrito no item 3.9.5, usando cartucho SPE C18. Condições do SPE <i>on line</i> : coluna de SPE Oasis HLB, 100% H ₂ O como solvente de carregamento, tempo de carregamento de 0,27 min, volume de injeção 200 µL, vazão da BQ: 0,870 mL min ⁻¹ . Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,27 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min	

(10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: 0,3 mL min⁻¹. Temperatura da coluna: 40 °C; temperatura do *sample manager*: 10 °C. 110

Figura 24: Cromatogramas da análise da amostra “A”. Cromatogramas A e B: transições de confirmação e quantificação, respectivamente, da NDELA para a amostra não fortificada. Cromatogramas C e D: transições de confirmação e quantificação, respectivamente, da NDELA para a amostra fortificada com 10 ng g⁻¹ da solução padrão. Cromatograma E: pico do padrão interno (*surrogate*) adicionado no nível de 100 ng g⁻¹. 113

Figura 25: Curva analítica para a NDELA no solvente (1 a 20 ng mL⁻¹) com adição de padrão interno NDELA-d₈ na concentração de 10 ng mL⁻¹. 114

Figura 26: Curva analítica no solvente (0,5 a 10 ng mL⁻¹) e na matriz “E” (5 a 100 ng g⁻¹). Padrão interno (*surrogate*) em 10 ng mL⁻¹ na curva no solvente e 100 ng g⁻¹ na curva na matriz. 118

Figura 27: Gráfico de resíduos para a curva no solvente e na matriz branca. 119

Figura 28: Cromatograma usando formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ e metanol como fase orgânica. Bomba quaternária: 100% de água, 1,0 mL min⁻¹ de vazão, 0,4 min de carregamento. Bomba quaternária: 0,3 mL min⁻¹, gradiente de eluição (água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (20:80), 2,60 min (20:80), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20). 141

Figura 29: Cromatograma usando acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e metanol como fase orgânica. Bomba quaternária: 100% de água, 1,0 mL min⁻¹ de vazão, 0,4 min de carregamento. Bomba quaternária: 0,3 mL min⁻¹, gradiente de eluição (água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (20:80), 2,60 min (20:80), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20). 142

Figura 30: Cromatograma usando 0,1 % ácido fórmico como aditivo na fase aquosa e metanol:acetonitrila (80:20, v/v) na fase orgânica. Bomba quaternária: 100% de água, 1,0 mL min⁻¹ de vazão, 0,4 min de carregamento. Bomba quaternária: 0,3 mL min⁻¹, gradiente de eluição (água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (20:80), 2,60 min (20:80), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20). 143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis de N-nitrosaminas encontradas em cosméticos e produtos para higiene pessoal.	31
Tabela 2: Pressão de vapor das N-nitrosaminas.	33
Tabela 3: Estrutura e propriedades físico-químicas das N-nitrosaminas (MM: massa molar em g mol ⁻¹).	34
Tabela 4: Determinação de N-nitrosaminas em cosméticos usando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Dados da literatura.	41
Tabela 5: Amostras de <i>shampoo</i> para bebê e a presença de agentes precursores na formação de N-nitrosaminas.	58
Tabela 6: Valores dos níveis padronizados para os parâmetros utilizados no planejamento experimental	63
Tabela 7: Ensaios do planejamento experimental com 2 ³ pontos fatoriais, 6 pontos axiais e um ponto central replicado quatro vezes realizados em ordem aleatória. Os valores das colunas x ₁ , x ₂ e x ₃ , representam os valores padronizados.....	64
Tabela 8: Matriz X para cálculo do modelo quadrático completo.....	65
Tabela 9: Condições ótimas de operação do espectrômetro de massas para as N-nitrosaminas. Condições da infusão: concentração da solução padrão: 1,0 µg mL ⁻¹ (NDELA) e 10 µg mL ⁻¹ (NA voláteis); fase móvel: ácido fórmico 0,1% em água: metanol (85:15, v/v), vazão de 0,40 mL min ⁻¹	76
Tabela 10: Íons precursores, fragmentos, voltagem do cone, energia de colisão e <i>dwel time</i> para a detecção das N-nitrosaminas.	77
Tabela 11: Gradiente de eluição utilizado na avaliação dos solventes orgânicos da fase móvel.	82
Tabela 12: Valores de área do pico (y) para os 13 ensaios.....	86

Tabela 13: Valores dos coeficientes para o modelo linear, seus erros padrão e intervalos de confiança ($t_{(95\%,4)} = 2,776$).....	86
Tabela 14: Valores de área do pico (y) encontrados para o modelo quadrático.....	88
Tabela 15: Valores dos coeficientes para o modelo quadrático, seus erros padrão e intervalos de confiança ($t_{(95\%,4)} = 2,776$).....	88
Tabela 16: Valores da análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático....	89
Tabela 17: Tabela com as condições de carregamento e eluição, incluindo eventos das válvulas para o método SPE <i>on-line</i>	92
Tabela 18: Valor de pH para cada amostra de <i>shampoo</i>	94
Tabela 19: Valor médio da área do pico (n= 3) para cada N-nitrosamina, de acordo com o eluato e a quantidade de sorbente utilizado para um volume de eluato 1 de 1 mL, fortificado com N-nitrosaminas no nível de 200 ng g ⁻¹	100
Tabela 20: Valor médio da área do pico (n=3) para cada N-nitrosamina, de acordo com o eluato e a quantidade de sorbente utilizado para um volume de eluato 1 de 2 mL, fortificado no nível de 200 ng g ⁻¹	101
Tabela 21: Valores das respostas em área do pico da NDELA e do padrão interno para as amostras fortificadas.	111
Tabela 22: Valores de LOQ e LOD estimados para cada amostra de <i>shampoo</i>	112
Tabela 24: Parâmetros estatísticos para a curva analítica no solvente.....	115
Tabela 25: Valores do ensaio de precisão realizado com a amostra “A”, fortificada no nível de 10 ng g ⁻¹	116
Tabela 26: Resultado das análises de <i>shampoo</i> . Concentração média (n=3) de NDELA com as respectivas estimativas dos desvios padrão relativos (RSD) e valores de exatidão, com RSD, após fortificação das amostras.	119
Tabela 23: Área dos picos da NMOR e da NPIP para as amostras analisadas.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ADH - Álcool desidrogenase

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI - Ionização química a pressão atmosférica

CYP450 - Citocromo P450

CV - Coeficiente de variação

DEA - Dietanolamina

DLLME - Micro-extração líquido-líquido dispersiva

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dSPE - Extração em fase sólida dispersiva

ESI - Ionização por eletronebulização

HPPC - higiene pessoal, cosméticos e perfumes

LC - Cromatografia líquida

LC-MS/MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

LLE - Extração líquido-líquido

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

Mercosul - Mercado Comum do Sul

MS - Espectrometria de massas

MSPE - Microextração em fase sólida

MSDP - Dispersão da matriz em fase sólida

MWCNT - Nanotubos de carbono multi-paredes

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NDBA - N-nitrosodibutilamina

NDBzA - N-nitrosodibenzilamina

NDCHA - N-nitrosodicicloexilamina

NDEA - N-nitrosodietilamina

NDELA - N-nitrosodietanolamina

NDiNA - N-Nitroso-diisononilamina

NDMA - N-nitrosodimetilamina

NDPA - N-Nitrosodi-n-propilamina

NDPhA - N-nitrosodifenilamina

NEPhA - N-fenilamina

NMEA - N-nitrosometiletilamina

NMOR - N-nitrosomorfolina

NMPhA - N-nitroso-N-metil-N-fenilamina

NPIP - N-nitrosopiperidina

NPYR - N-nitrosopirrolidina

PSA - Amina primária secundária

QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

ppm - Partes por milhão

RSD - Estimativa do desvio padrão relativo

SPE - Extração em fase sólida

SRM - Monitoramento de reações selecionadas

TEA - *Thermal energy analyzer*

UAE - Extração assistida por ultrassom

UHPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

SUMÁRIO

Capítulo 1: Introdução	19
1.1. Produtos para higiene pessoal, perfumes e cosméticos: uma breve história ...	20
1.2. Legislação.....	21
1.3. O mercado de produtos para higiene e cosméticos.....	23
1.4. As N-nitrosaminas.....	24
1.5. Toxicologia.....	25
1.6. Formação das N-nitrosaminas	27
1.7. Ocorrência em cosméticos e produtos de higiene pessoal.....	29
1.8. Propriedades físico-químicas.....	32
1.9. Composição dos <i>shampoos</i>	38
1.10. Métodos analíticos para determinação de N-nitrosaminas em cosméticos	39
1.11. Preparo de amostras	43
1.12. SPE <i>on-line</i>	45
1.13. Técnicas analíticas	47
1.14. Validação do método	48
1.14.1. Seletividade.....	48
1.14.2. Faixa linear e linearidade	49
1.14.3. Limites de detecção e quantificação	49
1.14.4. Precisão intra e inter ensaio.....	50
1.14.5. Exatidão	50
1.14.6. Quantificação usando <i>surrogate</i> como padrão interno	51
Capítulo 2: Objetivos	53
2.1. Objetivos	54
Capítulo 3: Parte experimental	55
3.1. Equipamentos	56

3.2. Materiais.....	56
3.3. Padrões analíticos.....	56
3.4. Solventes e reagentes.....	57
3.5. Amostras.....	57
3.6. Preparo das soluções padrão.....	58
3.7. Desenvolvimento do método espectrométrico e cromatográfico (SPE-UHPLC-MS/MS).....	59
3.7.1. Condições do espectrômetro de massas.....	61
3.7.2. Condições cromatográficas.....	62
3.7.3. Otimização das condições de carregamento da amostra na coluna SPE on-line.....	62
3.8. Medida do pH.....	66
3.9. Preparo das amostras.....	66
3.9.1. Extração em fase sólida – sorbente Oasis HLB (Procedimento I).....	66
3.9.2. QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) (Procedimento II).....	67
3.9.3. Dispersão da matriz em fase sólida (MSDP) (Procedimento III).....	67
3.9.4. Extração em fase sólida - sorbente C18 (Procedimento IV).....	67
3.9.5. Extração em fase sólida - sorbente C18 (Procedimento V).....	68
3.10. Validação de método SPE-UHPLC-MS/MS.....	72
3.10.1. Faixa linear e linearidade.....	72
3.10.2. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	72
3.10.3. Precisão.....	72
3.10.4. Exatidão.....	73
Capítulo 4: Resultados e Discussões.....	74
4.1. Desenvolvimento do método SPE - UHPLC-MS/MS.....	75
4.1.1. Condições do espectrômetro de massas.....	75

4.1.2.	Condições cromatográficas	81
4.1.3.	Condições de carregamento da amostra na coluna de SPE <i>on-line</i>	85
4.2.	Preparo de amostras	94
4.2.1.	Preparo de amostra usando SPE Oasis HLB	95
4.2.2.	Procedimento QuEChERS (<i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>)	97
4.2.3.	Dispersão da matriz em fase sólida (MSDP)	98
4.2.4.	Extração em fase sólida com sorbente C18	99
4.3.	Seleção das amostras	107
4.4.	Estudo das matrizes selecionadas.....	107
4.5.	Validação do método	113
4.5.1.	Faixa linear e linearidade.....	113
4.5.2.	Limite de detecção e quantificação.....	115
4.5.3.	Precisão.....	116
4.5.4.	Exatidão.....	116
4.6.	Análise das amostras.....	117
	Capítulo 5: Conclusão	121
	Referências Bibliográficas	125
	Anexos	137
	Anexo I - Proposta para Fragmentação das N-nitrosaminas.....	138
	Anexo II - Cromatogramas do estudo da fase móvel e aditivos.....	141
	Anexo III - Composição das amostras de shampoo para bebê analisados	144
	Anexo IV - Cromatogramas das amostras fortificadas	148
	Anexo V - Cromatogramas da leitura das amostras	152

Capítulo 1

Introdução

1.1. Produtos para higiene pessoal, perfumes e cosméticos: uma breve história

Os produtos para higiene pessoal, perfumes e cosméticos (HPPC) fazem parte do dia a dia de milhões de pessoas em todo o mundo. Desde o antigo Egito os cosméticos eram usados para melhorar a aparência. Até um tempo atrás não havia regulação ou até mesmo uma definição para esses produtos. Entretanto, acidentes e problemas de saúde associados ao uso de produtos para HPPC ao longo da história motivaram a criação de leis para o controle desses produtos, de modo a garantir a segurança do usuário (BETTOM, 2007).

Os registros do uso de metais para fins cosméticos datam do período pré-dinástico. A galena, um mineral composto de sulfeto de chumbo, era usado na fabricação do *Kohl* e utilizado pelos egípcios para pintar os olhos (RODRIGUES, 2013). Apesar de ser usado até hoje em países do oriente médio, estudos mostraram que a exposição ao *Kohl* pode levar a intoxicação por chumbo, tendo esse metal sido relacionado a mortes de crianças (BETTOM, 2007).

Com a descoberta da radioatividade, o mercado dos cosméticos começou a produzir cremes para pele, *shampoo*, pasta de dente, entre outros, a base de materiais radioativos como o rádio e o tório. Nessa época não se conheciam os efeitos cancerígenos destes materiais, o que levou milhares de pessoas a consumirem esses produtos (GENET, 1998; MOULD, 1999).

Considerando a história dos cosméticos é possível perceber que os mesmos foram sendo aperfeiçoados e sofreram uma evolução ao longo do desenvolvimento da civilização. Essa evolução contribuiu para o estudo de novas formulações químicas e para o desenvolvimento de tecnologias para fabricação de produtos para HPPC.

Mesmo após a implementação de legislação para o controle de substâncias tóxicas e prejudiciais à saúde na produção de produtos para HPPC, acidentes envolvendo o uso de cosméticos são frequentemente relatados. Como exemplo recente, em 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) proibiu o uso de formaldeído em alisantes capilares, após relatos de intoxicação (ANVISA, 2009). No entanto, além de proibir o uso de substâncias tóxicas devem ser considerados, também, as contaminações decorrentes de matéria-prima contaminada, degradação de ingredientes ou por reações entre ingredientes no produto acabado (FAN *et al.*,

1977; KANE & MIGLIORESE, 1990; SCHOTHORST & SOMERS, 2005; RATH & CANAES, 2009).

1.2. Legislação

No decorrer da evolução dos cosméticos e dos produtos para higiene pessoal, percebeu-se a necessidade de fiscalizar e controlar substâncias utilizadas na fabricação desses produtos. Isso se deu devido às intoxicações, irritações e outros efeitos adversos sofridos pelos usuários de produtos cosmetológicos, e principalmente devido à evolução no estudo da toxicologia das substâncias químicas.

Produtos para higiene pessoal, cosméticos e perfumes são definidos, segundo o Mercado Comum do Sul (Mercosul), “*preparações constituídas de substâncias naturais e sintéticas ou suas misturas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, e órgãos genitais externos ou nos dentes e nas membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, mudar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado*”. Essa definição é adotada pela Anvisa e por agências regulatórias de outros países (MERCADO COMUM DO SUL, 1994). Esse conceito é importante, tendo em vista a cooperação entre as agências regulatórias de diversos países e a globalização do mercado de produtos para HPPC, que envolve a importação e a exportação desses produtos (BETTON, 2007).

A regulamentação de produtos para HPPC no Brasil é competência da Anvisa, que regulamenta os produtos através de critérios estabelecidos por lei. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 07 de 2015 esses produtos são classificados em:

- Grau 1: produtos que possuem propriedades básicas ou elementares, não sendo necessárias informações detalhadas quanto ao modo de uso e restrições de uso devido às características intrínsecas do produto.

- Grau 2: produtos que possuem indicação específica, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, assim como informações e cuidados, modo de uso e restrições de uso.

De acordo com a legislação estão sujeitos a registro alguns produtos de Grau 2, são eles: protetores solares e bronzeadores, produtos infantis, alisantes capilares, repelentes de insetos e géis antissépticos para as mãos. Esses produtos possuem indicações específicas, e suas características necessitam de comprovação

de segurança e eficácia (ANVISA, 2015). Os demais produtos para HPPC são isentos de registro por possuírem menor risco à saúde, sendo passíveis de comunicação prévia antes da comercialização (BRASIL, 1999).

Em princípio, produtos registrados não contêm substâncias que possam causar risco à saúde do usuário, uma vez que todos os dados referentes à formulação e especificações do produto são avaliados antes da comercialização através de testes apresentados pelos fabricantes. Entretanto, o produto acabado pode conter contaminantes. Entre os contaminantes de preocupação destacam-se as N-nitrosaminas, que podem ser formadas no produto cosmético pela nitrosação de componentes da matéria-prima ou pela presença de aminas nitrosáveis na formulação. Segundo a RDC N°83 de 2016 a N-nitrosodietanolamina, N-nitrosopirrolidina, N-nitrosopiperidina, N-nitrosometiletilamina, N-nitrosomorfolina, N-Nitrosodi-n-propilamina, N-nitrosodibutilamina, N-nitrosodietilamina, N-nitrosodimetilamina são substâncias proibidas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Além das N-nitrosaminas, está proibido o uso da alquilaminas (dimetilamina) e alcanolaminas (dietanolaminas) secundárias, pois são conhecidas como potenciais precursores para formação das N-nitrosaminas (ANVISA, 2016).

A legislação não especifica um limite máximo tolerado de N-nitrosaminas no produto acabado, apenas na matéria-prima utilizada na fabricação. Por exemplo, a cocamida dietanolamina (cocamida DEA), uma dialcanolamida de ácido graxo, é um tensoativo usado no *shampoo* cujo teor máximo de N-nitrosamina permitido é $50 \mu\text{g g}^{-1}$. Outros ingredientes usados em cosméticos, como as monoalcanolaminas e as trietanolaminas também possuem esse limite de N-nitrosamina descrito na legislação. É vedado, ainda, o uso de agentes nitrosantes e embalagens que possam conter nitritos (ANVISA, 2012a).

Até julho de 2018 os produtos para HPPC de uso infantil eram objetos de registro junto a Anvisa, no entanto, com a atualização da lei esses produtos passaram a ser considerados de baixo risco e, portanto, isentos de registro, com exceção dos protetores solares e dos repelentes para insetos (ANVISA, 2018).

A ideia é seguir as demais agências regulatórias do mundo, estimular a inovação e ampliar o acesso a esse tipo de produto (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL PERFUMARIA E COSMÉTICOS, 2017).

É importante destacar que a Anvisa não realiza testes para a concessão do registro, apenas analisa a documentação enviada e avalia a conformidade com a lei.

Levando em consideração as limitações regulatórias e a possibilidade de que produtos contaminados estejam sendo disponibilizados ao consumidor, esse trabalho teve como um dos objetivos fazer um levantamento de formulações no mercado que pudessem estar contaminadas com N-nitrosaminas, que conforme exposto, são substâncias proibidas em produtos para HPPC.

1.3. O mercado de produtos para higiene e cosméticos

O Brasil ocupa atualmente o quarto lugar na posição mundial de consumo de produtos para HPPC, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, da China e do Japão, o que representa 6,9% do consumo mundial. Além de produtos nacionais, o mercado brasileiro é abastecido com produtos importados de 76 países, sendo os maiores fornecedores, a Argentina, os Estados Unidos, a França e a China. O país também atua ativamente no mercado de exportação de produtos para HPPC, exportando produtos para 178 países (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL PERFUMARIA E COSMÉTICOS, 2018).

Um levantamento da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), mostrou que existem atualmente 2718 empresas de produtos para HPPC regularizadas na Anvisa, sendo que 41,7% são do estado de São Paulo. O panorama do setor mostrou, ainda, que nos últimos 10 anos o mercado consumidor brasileiro teve um crescimento composto de 8,2%, passando de um faturamento anual de R\$ 47 milhões para R\$ 102 milhões em 2017 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL PERFUMARIA E COSMÉTICOS, 2018).

O mercado de produtos para HPPC possui um segmento direcionado aos produtos de uso infantil e o Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos, ocupando o terceiro lugar no consumo mundial, em 2017. Esse segmento apresentou um crescimento de 45,6% entre 2011 e 2016, sendo que os produtos para cabelo representam um terço desse setor, com um crescimento de 83,3% nesse período (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL PERFUMARIA E COSMÉTICOS, 2018).

O crescente interesse por produtos direcionados às crianças requer atenção especial quanto à segurança destes. Dentre os produtos direcionados para o

público infantil está o *shampoo*, que contém ingredientes específicos apropriados para a pele delicada.

Considerando o exposto, o objetivo geral desse trabalho é determinar a presença de N-nitrosaminas em *shampoo* para bebê.

1.4. As N-nitrosaminas

As N-nitrosaminas e/ou seus precursores estão presentes numa variedade de produtos naturais e manufaturados, como: agrotóxicos, tabaco, detergentes, alimentos, medicamentos, plásticos, cosméticos, entre outros. Em geral as N-nitrosaminas não são intencionalmente adicionadas ao produto, mas podem ser formadas durante ou após sua produção (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1989; RATH & CANAES, 2009).

Os compostos N-nitrosos em geral e, em particular, as N-nitrosaminas, são considerados potentes carcinógenos, além de apresentarem ação teratogênica e mutagênica em animais de laboratório. Efeitos carcinogênicos das N-nitrosaminas já foram observados em mais de 40 espécies de animais, inclusive em macacos (BARTSCH & MONTESANO, 1984; RATH & CANAES, 2009).

Uma N-nitrosamina conhecida como contaminante presente em cosméticos, loções, *shampoos* e fluídos cutâneos é a N-nitrosodietanolamina (NDELA). Muitos estudos foram conduzidos após a primeira confirmação da presença da NDELA em cosméticos, em 1977, e foi comprovado o potencial de nitroação de várias matérias-primas empregadas na indústria cosmética. Em alguns casos, as N-nitrosaminas são formadas pela nitroação de componentes primários de matéria-prima, enquanto em outras situações a presença é decorrente da matéria-prima contaminada por aminas nitrosáveis. As aminas mais comumente encontradas em produtos cosméticos são a dietanolamina (DEA) e a trietanolamina, ambas podem levar a produção de NDELA (FAN *et al.*, 1977; KANE & MIGLIORESE, 1990; SCHOTHORST & SOMERS, 2005; RATH & CANAES, 2009).

Além da NDELA outras N-nitrosaminas são conhecidas pela sua ação carcinogênica, são elas: N-nitrosopirrolidina (NPYR), N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosometiletilamina (NMEA), N-nitrosomorfolina (NMOR), N-Nitrosodi-n-propilamina (NDPA), N-nitrosodibutilamina (NDBA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodimetilamina (NDMA). Essa última é considerada carcinogênica mesmo em baixas concentrações (0,7 ng L⁻¹) (FUJIAN *et al.*, 2016).

A seguir serão apresentadas algumas informações importantes sobre as N-nitrosaminas, como toxicologia, reação de formação, ocorrência em cosméticos e propriedades físico-químicas.

1.5. Toxicologia

A ação de compostos N-nitrosos em organismos vivos é estudado extensamente há muitos anos. Os compostos N-nitrosos, como as N-nitrosaminas, são capazes de induzir ações tóxicas crônicas e aguda em animais, como efeitos carcinogênicos, mutagênicos, e teratogênicos (MAGEE, 1971).

Apesar das N-nitrosaminas terem sido descobertas no século XIX, a toxicidade dessas substâncias começou a ser estudada mais profundamente somente 100 anos depois. Em 1954, estudos realizados com ratos e camundongos revelaram que a N-nitrosodimetilamina (NDMA) é capaz de causar danos ao fígado desses animais quando o composto é administrado no nível de 25 mg kg⁻¹ (ppm). Um estudo posterior demonstrou que essa N-nitrosamina é capaz de causar tumor hepático em ratos, quando estes são submetidos a uma dieta adicionada de NDMA, se tornando um dos primeiros estudos a evidenciar a carcinogenicidade de uma N-nitrosamina (MAGEE & BARNES, 1956).

O estudo da ação carcinogênica da NDELA teve início em 1967, tendo sido observado o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e adenoma renal em todos os ratos submetidos aos testes. Essa N-nitrosamina mostrou um potencial carcinogênico duzentas vezes menor do que a NDMA (FAN *et al.*, 1977; PREUSSMANN *et al.*, 1983).

Para que ocorra a ação biológica das N-nitrosaminas é necessário que substâncias intermediárias sofram uma transformação *in vivo*. A substância passa por ativação metabólica para formar agentes alquilantes que atuam como eletrófilos, que por sua vez interagem com os nucleófilos do DNA. Os efeitos causados por essa interação são responsáveis pela ação carcinogênica (PREUSSMANN, 1984).

Em roedores, a disposição metabólica da NDELA ocorre, principalmente, pela β -oxidação, conforme esquema apresentado na Figura 1.

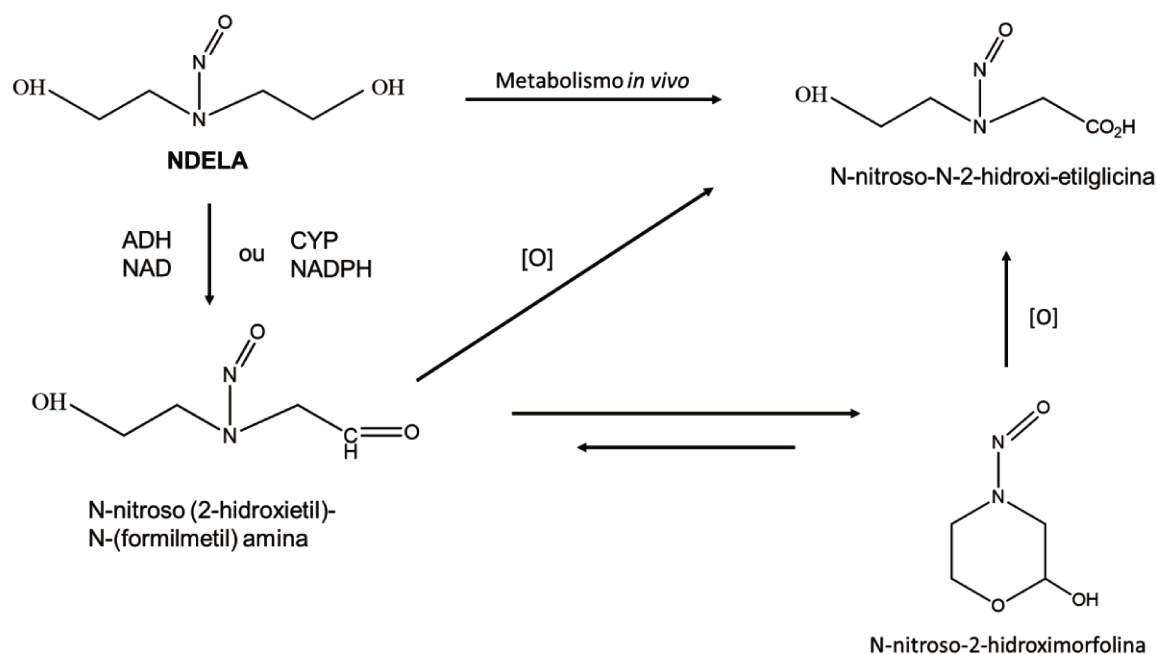


Figura 1: Disposição metabólica da NDELA em roedores. ADH – álcool desidrogenase; CYP, citocromo P450; NAD - nicotinamida adenina dinucleótido; NADPH - fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida). Fonte: (LOEPPKY, 1999).

Apesar do metabolismo dos compostos N-nitrosos ser bem estabelecido, é necessário entender outros mecanismos biológicos mais complexos, como a farmacocinética do composto, diferenças entre metabolismos e a especificidade de dano ao DNA (PREUSSMANN, 1984).

Para estimar quantitativamente o risco, estudos de dose-resposta são utilizados. Para a NDELA, testes realizados em ratos mostraram que mesmo em concentrações baixas, 1,5 mg/kg/dia, a NDELA é capaz de estimular o crescimento de tumores. Para as N-nitrosaminas NDEA e NDMA, doses de 0,025 mg/kg/dia, mostraram efeitos carcinogênicos, enquanto a NPYR apresentou maior incidência de câncer no nível de 10 mg/kg/dia (PREUSSMANN *et al.*, 1983).

Os estudos com a NDELA revelaram ainda que grande parte do composto é excretado na urina de forma não metabolizada. Isso indica que, provavelmente, o metabólito formado *in vivo* deva ser o intermediário com potencial carcinogênico (PREUSSMANN *et al.*, 1983). Em 1979, Edwards *et al.* verificaram que após a aplicação de 12,7 g de cosmético contaminado com 980 µg de NDELA (77 µg g⁻¹), em tecido humano, o composto foi excretado pela urina (< 50 µg kg⁻¹) com uma meia-vida superior a 13 horas (EDWARDS *et al.*, 1979). Esses resultados indicam que a substância é absorvida pela pele.

A ação carcinogênica de outras N-nitrosaminas cíclicas como a NPIP e NMOR também foram estudadas, tendo sido consideradas carcinogênicas, induzindo tumor no fígado e em outros órgãos em ratos e camundongos (MAGEE, 1971).

Ainda que os estudos toxicológicos tenham sido realizados com animais, observações toxicológicas e bioquímicas permitem extrapolar os resultados encontrados para o ser humano. Essa extrapolação justifica-se ainda mais se for considerado que os compostos N-nitrosos mostraram ser carcinogênicos em mais de 40 espécies diferentes de animais, incluindo o macaco, e que nenhuma espécie se mostrou resistente contra os efeitos biológicos (SPIEGELHALDER & PREUSSMANN, 1984; RATH & CANAES, 2009).

Várias pesquisas de acompanhamento foram realizadas com trabalhadores expostos a fluídos metalúrgicos contendo etanolaminas e nitrito de sódio. Devido ao uso de agentes precursores na formação da NDELA, suspeitava-se que esses fluídos estivessem contaminados com uma N-nitrosamina. Os estudos de acompanhamento revelaram alguns casos de morte por câncer, e concluiu-se que a co-exposição a nitrito e etanolaminas é considerada um indicativo de exposição às N-nitrosaminas (JÄRVHOLM *et al.*, 1986; PARK & MIRER, 1996; SULLIVAN *et al.*, 1998).

É importante destacar que as suspeitas da ação carcinogênica em humanos, causados pelas N-nitrosaminas, com base em estudos realizados, em animais, há décadas atrás não foram confirmadas por estudos mais recentes utilizando técnicas mais avançadas (BRYAN *et al.*, 2012).

Levando em consideração as evidências do efeito carcinogênico das N-nitrosaminas, além da facilidade com que esses contaminantes são formados, a determinação analítica desses compostos se torna de extrema importância.

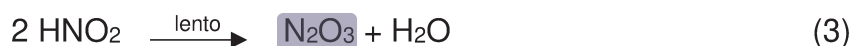
1.6. Formação das N-nitrosaminas

As N-nitrosaminas foram descobertas em 1863. Na época foi verificado que aminas secundárias reagem com nitritos ou ácido nitroso formando uma “amida nitrosa” (TELLING, 1982).

As N-nitrosaminas são formadas pela reação de nitrosação que acontece entre agentes nitrosantes e aminas secundárias e terciárias, como a dietanolamina e a trietanolamina (SCHMELTZ & WENGER, 1979). A reação das aminas nitrosáveis com agentes nitrosantes como o ácido nitroso, nitritos, ou óxidos de nitrogênio (ex. N_2O_3 e N_2O_4) é mostrada na Reação 1 (KANE & MIGLIORESE, 1990).

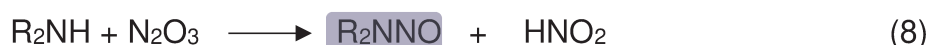


O mecanismo da reação de nitrosação é mostrado nas Reações de 2-4 (MIRVISH, 1975).



O nitrito reage em meio ácido para formar o anidrido nitroso (agente nitrosante) que por sua vez reage com a amina secundária, formando a N-nitrosamina. A reação é de segunda ordem em relação ao ácido nitroso e é favorecida em pH levemente ácido e em altas temperaturas (KANE & MIGLIORESE, 1990; RATH & CANAES, 2009). A reação pode ocorrer mais rapidamente quando os agentes nitrosantes anidrido nitroso e tetróxido de dinitrogênio reagem com aminas em meio básico. Pesquisas revelaram que o formaldeído, pode catalisar a reação de nitrosação em meio básico, até pH 11, indicando que a reação de formação das N-nitrosaminas pode ocorrer em meio ácido, neutro e básico, o que facilita a formação desses contaminantes (ROSENBERG *et al.*, 1980; KANE & MIGLIORESE, 1990). Apesar da reação acontecer nesses três meios, o pH ótimo é entre 3,0 e 3,4 para aminas com $\text{pK}_a > 5$ (RATH & CANAES, 2009).

A trietanolamina também pode sofrer reação de nitrosação para formar N-nitrosaminas. Porém, a reação é mais lenta e envolve a formação da dietanolamina através da clivagem nitrosativa. O mecanismo proposto encontra-se nas Reações de 5- 8 (KANE & MIGLIORESE, 1990).



A reação de nitrosação pode ser inibida por compostos que competem com a amina pelo agente nitrosante, como, por exemplo, o ácido ascórbico e o sulfamato

de amônio (KANE & MIGLIORESE, 1990). Enquanto isso, íons cloreto e brometo, por exemplo, podem agir como ânions nucleofílicos para catalisar a reação (RATH & CANAES, 2009).

Em cosméticos as N-nitrosaminas podem ser formadas pela reação de nitroação entre ingredientes do produto, pelo uso de matéria-prima contaminada por aminas nitrosáveis, degradação de ingredientes ou até mesmo pela migração de componentes da embalagem (RATH & CANAES, 2009; CHISVERT *et al.*, 2017).

Devido ao potencial de nitroação das dietanolaminas, essas estão proibidas de serem utilizadas em formulação de produtos para HPPC. No entanto, a trietanolamina ainda é permitida. Adicionalmente, esses produtos são formulados com alcanolamidas de ácidos graxos como a cocamida dietanolamina, que pode levar a formação de N-nitrosaminas. Essa alcanolamida é produzida pela condensação de ésteres metílicos de ácidos graxos com a dietanolamina. Sendo assim, a formação de N-nitrosaminas pode acontecer pelo uso de dietanolamina contaminada ou pela reação entre a dietanolamina livre presente na alcanolamida e agentes nitrosantes contidos na formulação do produto (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1986).

Outra substância usada em produtos para HPPC, é o agente antimicrobiano 2-bromo-2-nitropropano-1,3 diol (Bronopol[®]) usado como conservante. Essa substância é capaz de nitrosar a dietanolamina, mostrando uma maior eficiência de formação de NDELA em pH 12, após 96 horas de reação. Entre os produtos da decomposição do Bronopol[®] está o nitrito, conhecido como espécie nitrosante, e o formaldeído, um catalisador da reação (SCHMELTZ & WENGER, 1979; CHALLIS *et al.*, 1995). Atualmente, o bronopol é permitido em produtos para HPPC, como substância de ação conservante na concentração máxima de 0,1% (ANVISA, 2012b).

1.7. Ocorrência em cosméticos e produtos de higiene pessoal

Os primeiros estudos para determinação de N-nitrosaminas em cosméticos foram realizados nos anos 70. As investigações foram motivadas por estudos anteriores que mostraram a formação de N-compostos em produtos contendo etanolaminas secundárias e terciárias.

Em 1977, Fan *et al.* estudaram a presença de NDELA em produtos para cuidado com a pele e *shampoo*. Os resultados mostraram que alguns produtos estavam contaminados com, aproximadamente, 48000 ng g⁻¹ de NDELA (FAN *et al.*,

1977). Em 1981, uma pesquisa realizada com produtos comercializados na Bélgica, revelou a contaminação de produtos como creme facial no nível de 350 ng g⁻¹ (ROLLMANN *et al.*, 1981). Os cosméticos avaliados nas investigações iniciais, possuíam em sua formulação aminas secundárias e primárias ou seus derivados.

Mais de 8000 matérias-primas são utilizadas na fabricação de cosméticos. Por exemplo, as alcanolamidas são substâncias utilizadas como matéria-prima na fabricação de *shampoo*, podendo ser produzidas pela condensação de dietanolaminas e ácido graxo. Caso o produto contenha nitrito ou fontes desse íon é possível que ocorra a formação de N-nitrosaminas *in situ* (ROSENBERG *et al.*, 1979; RATH & CANAES, 2009).

Com a ampliação das pesquisas e o desenvolvimento de novos métodos de detecção de N-nitrosamina, avanços foram sendo obtidos. Em 1984, Spiegelhalder e Preussmann determinaram a presença de N-nitrosaminas voláteis e não voláteis usando a cromatografia a gás associada ao detector de quimioluminescência (GC-TEA, *gas chromatography - thermal energy analyzer*). Os resultados revelaram que 50 amostras estavam contaminadas com NDMA (≥ 24 ng g⁻¹), 26 amostras continham NMOR (≥ 640 ng g⁻¹) e 25 amostras apresentaram NDELA (≥ 1400 ng g⁻¹) (SPIEGELHALDER & PREUSSMANN, 1984).

No decorrer dos anos 80 e 90 vários estudos para determinação de N-nitrosaminas em cosméticos foram conduzidos. Mesmo após restringir o uso de agentes precursores da formação de N-nitrosaminas, como a dietanolamina, em formulações de produtos para HPPC, pesquisadores continuaram detectando contaminantes em produtos acabados.

Nos últimos 10 anos pesquisas utilizando técnicas mais avançadas foram realizadas e N-nitrosaminas continuaram sendo detectadas, em níveis mais baixos. A Tabela 1 mostram alguns dados recentes sobre a presença de N-nitrosaminas em cosméticos e produtos para higiene pessoal.

Tabela 1: Níveis de N-nitrosaminas encontradas em cosméticos e produtos para higiene pessoal.

N-nitrosamina	Produtos para HPPC	Nível de contaminante encontrado (ng g ⁻¹)	Ref.
NDMA, NDEA, NDPA, NMOR, NPYR, NPIP, NDBA, NDPhA, NDCHA, NDBzA	Creme, loção de limpeza, gel de banho, emulsão, perfume, pó, sombra, shampoo e batom	N.d	(MA <i>et al.</i> , 2011)
NDELA	<i>Shampoo</i> e sabão líquido	50-6800	(DAVARANI <i>et al.</i> , 2013)
NMEA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NMOR, NDPhA, NDBzA, NMPPhA, NEPhA, NDiNA, NDMA	Produtos de cuidado para a pele	207 (NDMA)	(DONG <i>et al.</i> , 2015)
NDELA	Suavizante de pele, limpador facial, limpador de espuma facial, máscara, <i>shampoo</i> , batom líquido, tintura para cabelo.	20-214*	(JOO <i>et al.</i> , 2015)
NMEA, NDMA, NDPA, NPIP, NPYR, NMOR, NEPhA, NMPPhA, NDBA, NDPhA, NDBzA	Produtos de cuidado para a pele	97 (NDBzA)	(FUJIAN <i>et al.</i> , 2016)
NDELA	<i>Shampoo</i>	60-323	(GHAZALEH & ZAHRA, 2017)
NDELA	Creme e gel de banho	136-345	(CHISVERT <i>et al.</i> , 2017)
NDELA, NDEA	<i>Shampoo</i> , gel de banho, loção, cremes, condicionador, protetor solar, produtos para bebê	56-597 (NDELA) 12-41 (NDEA)	(LIM <i>et al.</i> , 2018)

N.d – Não detectado

* Treze amostras apresentaram traços de N-nitrosaminas com valores abaixo do limite de quantificação (20 µg kg⁻¹).

Considerando que as N-nitrosaminas são proibidas e que pesquisas recentes realizadas fora do país confirmaram a presença desses compostos em

produtos de uso diário, como *shampoo*, fica evidente a importância de se desenvolver métodos para determinação desses contaminantes em matrizes nacionais.

1.8. Propriedades físico-químicas

As N-nitrosaminas são compostos de estrutura caracterizada, essencialmente, pelo grupo N-nitroso N-N=O. Os grupos R₁ e R₂, conforme mostra a Figura 2, ligados ao nitrogênio podem variar de um átomo de hidrogênio a um substituinte mais complexo, conferindo à molécula a forma alifática ou aromática.

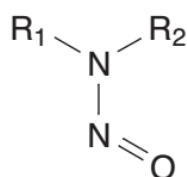


Figura 2: Estrutura geral das N-nitrosaminas.

As N-nitrosaminas podem apresentar os estados sólido, líquido e gasoso. São compostos estáveis em meio básico e são sensíveis à luz ultravioleta (RATH & CANAES, 2009).

As características físicas como volatilidade e polaridade podem ser utilizadas para classificar as N-nitrosaminas (TELLING, 1982).

Classe 1: Voláteis com cadeia dialquil curta (ex. NDMA) e heterocíclica (ex. NPIP).

Classe 2: Baixa polaridade, não volátil.

Classe 3: Alta polaridade, não iônica, não-volátil (ex. NDELA).

Classe 4: Alta polaridade, iônica, não-volátil (ex. aminoácidos N-nitrosos).

A característica volátil das N-nitrosaminas pode ser dada pelo valor da pressão de vapor. A Tabela 2 apresenta os valores de pressão de vapor para os compostos.

Tabela 2: Pressão de vapor das N-nitrosaminas.

N-nitrosaminas	Pressão de vapor (mm Hg)
NDELA	0,0005 em 20°C
NMOR	0,036 em 20°C
NPYR	0,06 em 20°C
NDBA	0,05 em 25°C
NDPLA	0,086 em 20°C
NPIP	0,092 em 20°C
NDEA	0,86 em 20°C
NMEA	1,10 em 25°C
NDMA	2,70 em 20°C

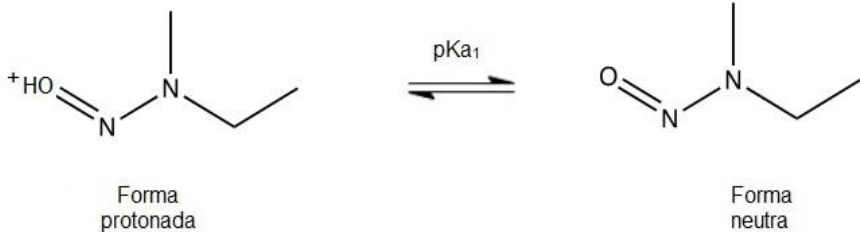
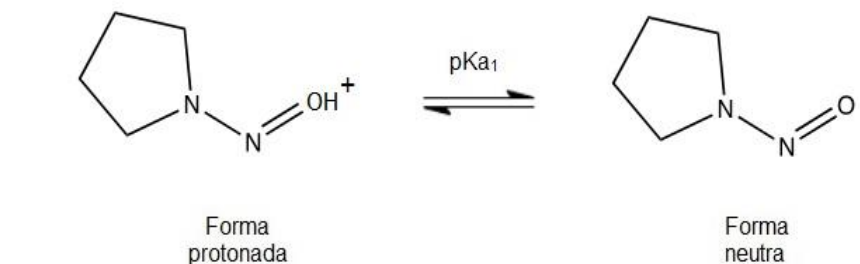
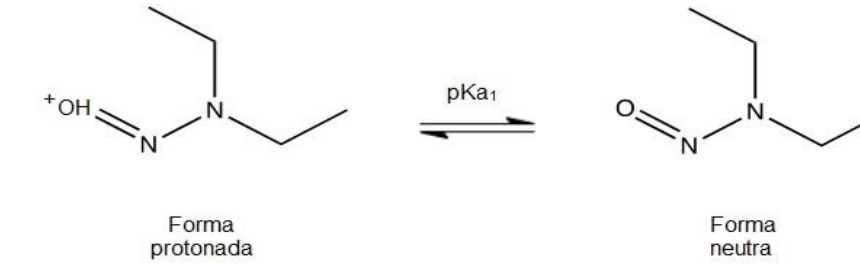
Fonte: (CHEMIDPLUS A TOXNET DATABASE, 2018)

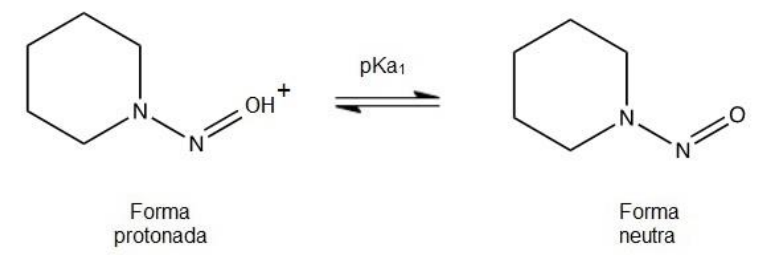
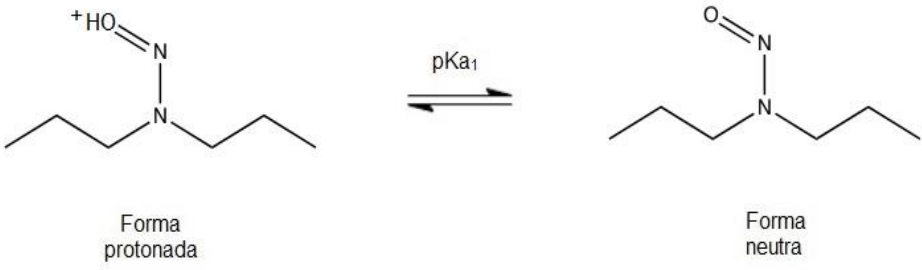
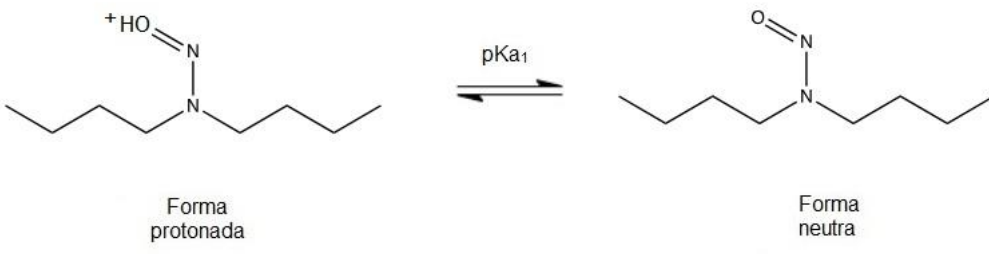
Quanto maior a pressão de vapor mais volátil é o composto. Portanto, podemos considerar a NDELA como não volátil. Essa característica deve ser levada em consideração quando for escolhida a técnica de determinação.

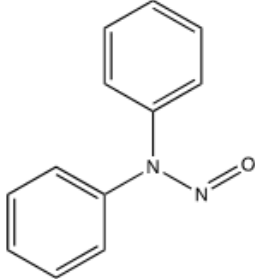
A Tabela 3 apresenta algumas propriedades físico-químicas das N-nitrosaminas selecionadas.

Tabela 3: Estrutura e propriedades físico-químicas das N-nitrosaminas (MM: massa molar em g mol⁻¹).

Nome/ Fórmula molecular/Abreviação	MM	Log K _{ow}	pKa	Formas protonada, neutra e/ou desprotonada
N-nitrosodietanolamina (C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₃) NDELA	134,13	-1,34	pKa ₁ = 3,15 pKa ₂ = 15,5	<p>Forma protonada Forma neutra Forma desprotonada</p>
N-nitrosomorfolina (C ₄ H ₈ N ₂) NMOR	116.11	-0,18	pKa ₁ = 3,14	<p>Forma protonada Forma neutra</p>
N-nitrosodimetilamina (C ₂ H ₆ N ₂) NDMA	74.05	0,04	pKa ₁ = 3,52	<p>Forma protonada Forma neutra</p>

Nome/ Fórmula molecular/Abreviação	MM	Log Kow	pKa	Formas protonada, neutra e/ou desprotonada
N- nitrosometiletilamina (C₃H₈N₂) NMEA	88.06	0,40	pKa ₁ = 3,42	 <p>Forma protonada</p> <p>Forma neutra</p>
N-nitrosopirrolidina (C₄H₈N₂) NPYR	100.06	0,44	pKa ₁ = 3,3	 <p>Forma protonada</p> <p>Forma neutra</p>
N-nitrosodietilamina (C₄H₁₀N) NDEA	102.08	0,75	pKa ₁ = 3,32	 <p>Forma protonada</p> <p>Forma neutra</p>

Nome/ Fórmula molecular/Abreviação	MM	Log K _{ow}	pKa	Formas protonada, neutra e/ou desprotonada
<p>N-nitrosopiperidina (C₅H₁₀N) NPIP</p>	114,08	0,89	pKa ₁ = 3,3	 <p>Forma protonada $\xrightleftharpoons{pK_{a1}}$ Forma neutra</p>
<p>N-Nitrosodi-n-propilamina (C₆H₁₄N₂O) NDPLA</p>	130,0	1,80	pKa ₁ = 3,3	 <p>Forma protonada $\xrightleftharpoons{pK_{a1}}$ Forma neutra</p>
<p>N-nitrosodibutilamina (C₁₈H₁₈N₂O) NDBA</p>	158,14	2,69	pKa ₁ = 3,3	 <p>Forma protonada $\xrightleftharpoons{pK_{a1}}$ Forma neutra</p>

Nome/ Fórmula molecular/Abreviação	MM	Log K _{ow}	pKa	Formas protonada, neutra e/ou desprotonada
N-nitrosodifenilamina (C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O) NDPhA	198,08	3,35	NE	 <p>Forma neutra</p>

1.9. Composição dos *shampoos*

Shampoos são detergentes sintéticos destinados a remover a sujeira dos cabelos. Em 1930, os alquil sulfatos começaram a ser utilizados na fabricação de *shampoos* e passaram a ser conhecidos como tensoativos ou surfactantes. Os tensoativos são classificados em aniônicos, catiônicos e anfóteros, de acordo com a carga da extremidade carregada (BARBOSA & SILVA, 1995; MITSUI, 1997). A Figura 3 mostra a representação dos tipos de tensoativos sintéticos.

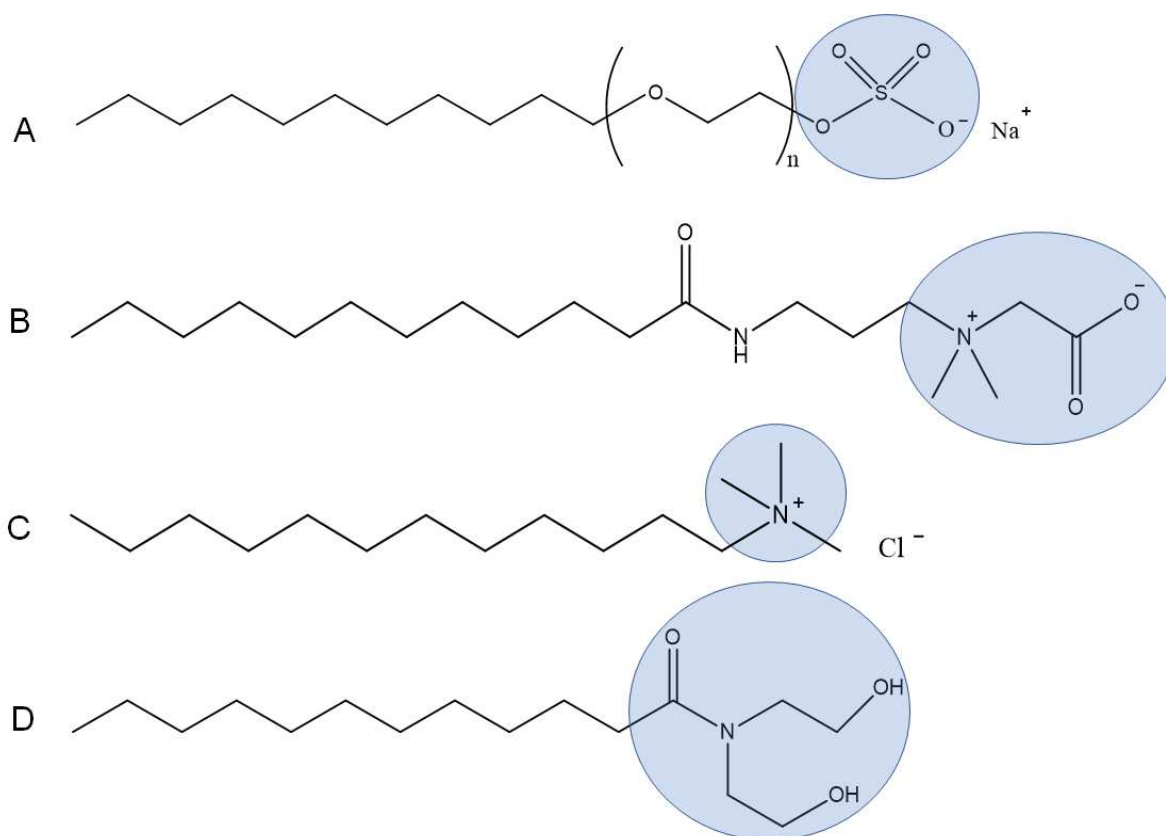


Figura 3: Exemplos de tensoativos e suas classificações. A: tensoativo aniônico lauril éter sulfato de sódio; B: tensoativo anfótero cocamidopropil betaína; C: tensoativo catiônico cloreto de dodecil trimetil amônio; D: tensoativo não iônico.cocamida dietanolamina

Em geral os *shampoos* são produzidos com um ou mais classes de tensoativos. No caso dos produtos específicos para os bebês, utiliza-se tensoativos anfóteros ou não iônicos, pois são menos irritantes. Usualmente os *shampoos* para bebê possuem pH entre 6 e 7 e são mais viscosos para evitar o contato com os olhos (BARBOSA & SILVA, 1995; BAREL *et al.*, 2009).

É comum associar a quantidade de espuma à propriedade de limpeza dos *shampoos*, no entanto, o fator de limpeza não se deve a essa. Os surfactantes utilizados para produzir maior quantidade de espuma, como por exemplo, os sulfatos de alquila, são muitas vezes irritantes e por isso não são utilizados como surfactante primário na fabricação de *shampoos* para bebê (BAREL *et al.*, 2009).

O *shampoo* é composto em sua maioria por água (~75%), surfactante primário, um ou mais co-surfactantes, sais solúveis e outros ingredientes adicionados em menor quantidade, como fragrâncias e conservantes. Os surfactantes aniônicos, como o lauril éter sulfato de sódio, são mais comumente utilizados como tensoativos primários. Essa substância é responsável pela limpeza, enquanto o co-surfactante é usado para aumentar a formação de micelas e a capacidade espumante do produto. Geralmente, os co-surfactantes são da classe dos não aniônicos, como por exemplo a cocamida dietanolamina (MITSUI, 1997; ROMANOWSKI & SCHUELLER, 2009).

1.10. Métodos analíticos para determinação de N-nitrosaminas em cosméticos

Um dos desafios da determinação de N-nitrosaminas em cosméticos e produtos de higiene de modo geral é a etapa de preparo da amostra, devido à complexidade da matriz, variação da composição de acordo com o fabricante e seleção de uma amostra branca para validação do método, além do baixo nível de concentração das N-nitrosaminas, na ordem de ng g^{-1} (CANAES, 2011). Devido às diferenças entre matrizes, tratamentos de amostras longos e distintos podem ser necessários. Na fase de preparação da amostra deve-se, além de eliminar interferentes e concomitantes, concentrar o analito. Entre os preparos de amostra reportados na literatura destacam-se a extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) (SCHOTHORST & SOMERS, 2005; FLOWER *et al.*, 2006; WANG, 2006; GHASSEMPOUR *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2011; JOO *et al.*, 2015; FUJIAN *et al.*, 2016), micro-extração em fase sólida (SPME, *solid phase microextraction*) (DAVARANI *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2016), micro-extração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *dispersive liquid-liquid microextraction*) (CHISVERT *et al.*, 2017) e, mais recentemente, o procedimento QuEChERS proposto por Anastasides *et al* (2003) e adaptado por Ghazaleh (2017).

A extração da NDELA de *shampoo* é outro desafio, devido à característica polar da molécula e da matriz, o que dificulta o emprego de sorbentes de fase reversa

na SPE. Muitos trabalhos publicados na literatura recomendam uma etapa de diluição em meio aquoso da amostra e percolação em fase C18 visando a retenção de compostos da matriz. A NDELA não tem afinidade pelo sorbente e, portanto, não é retida. Desta forma, o *clean-up* não é eficiente e a concentração do analito inviável.

Um dos objetivos desse trabalho foi desenvolver uma técnica de preparo de amostra capaz de eliminar os interferentes de modo a se alcançar um nível baixo de quantificação (ng g^{-1}). Além disso, buscou-se desenvolver uma técnica que pudesse extrair da matriz tanto as N-nitrosaminas polares quanto as apolares.

A NDELA é um composto de caráter polar e a técnica mais indicada para sua quantificação é a cromatografia líquida. Para as N-nitrosaminas voláteis, a cromatografia a gás é a técnica mais recomendada (ROLLMANN *et al.*, 1981; TELLING & DUNNETT, 1981; SPIEGELHALDER & PREUSSMANN, 1984; SOMMER & EISENBRAND, 1988; COLLIER *et al.*, 1988; WESTIN *et al.*, 1990; SCHOTHORST & STEPHANY, 2001; DAVARANI *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016).

Como detectores tem sido reportado o de quimioluminescência, ultravioleta, eletroquímico e a espectrometria de massas sequencial, sendo esse último de maior importância na atualidade, uma vez que permite a quantificação e a confirmação de identidade.

Na revisão bibliográfica apenas cinco artigos utilizando a técnica LC-MS/MS foram encontrados na literatura (SCHOTHORST & SOMERS, 2005; JOO *et al.*, 2015; FUJIAN *et al.*, 2016; GHAZALEH & ZAHRA, 2017; LIM *et al.*, 2018), sendo que apenas o artigo publicado por Lim (2018) utilizou a técnica para determinar a presença de N-nitrosaminas voláteis e não voláteis. Além disso, não foi encontrado na literatura, método utilizando a técnica de SPE *on-line* para a quantificação de N-nitrosaminas em cosméticos.

A Tabela 4, mostra as técnicas analíticas e os preparos de amostras mais relevantes encontrados na literatura, utilizando LC-MS/MS.

Tabela 4: Determinação de N-nitrosaminas em cosméticos usando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Dados da literatura.

Analito	Matriz	Preparo de amostras				Técnica analítica	Modo de ionização/ modo de quantificação	LOQ (ng/g)	Ref.
NDELA	Gel de banho, óleo para cabelo, <i>shampoo</i> , condicionador, cremes, espuma de banho, esfoliante, sabão para as mãos	Extração/clean up		Extração/clean up		LC-MS/MS	ESI+/SRM	45,6	(SCHOTHORST & SOMERS, 2005)
		Amostra (qtd.)	1 g	Técnica	SPE (amostras solúveis em água)				
		Técnica	LLE (para amostras menos solúveis em água)	Sorbente	Bakerbond C ₁₈				
		Solvente extrator	Diclorometano	Solvente de eluição	Amostra eluída pelo cartucho sem utilizar solvente para eluição				
NDELA	Suavizante de pele, limpador facial, máscara para cílios, <i>shampoo</i> , batom líquido, tintura para cabelo.	Extração		Clean-up		UHPLC-MS/MS	ESI+/SRM	20	(JOO <i>et al.</i> , 2015)
		Amostra (qtd.)	0,5 g/0,1 g	Técnica	SPE (amostras solúveis em água)				
		Técnica	LLE	Sorbente	Bond Elut AccuCAT troca aniônica e catiônica				
		Solventes extratores*	Água, diclorometano, acetonitrila, etanol, clorofórmio	Solvente de eluição	Água				

NDMA, NDEA, NPYR, NMOR, NPIP, NDPA, NDBA, NDPhA, NMPPhA NEPhA, NDBzA	Produtos de cuidado para a pele em creme e em loção	Extração		Clean-up		UHPLC-MS/MS	APCI+/SRM	20 (NPIP, NDPA, NDBA, NMPPhA); 25 (NPYR); 35 (NDPhA, NEPhA); 50 (NDEA); 80 (NMOR, NDBzA); 850 (NDMA)	(FUJIAN <i>et al.</i> , 2016)
		Amostra (qtd)	1 g	Técnica	Nanotubo de carbono multi-camadas				
		Técnica	UAE	Sorbente	MWCNT-10				
		Solvente extrator	Acetonitrila	Solvente de eluição	---				
NDELA	Shampoo	Extração		Clean-up		LC-MS/MS	ESI+/SRM	42	(GHAZALEH & ZAHRA, 2017)
		Amostra (qtd)	2 g	Técnica	QuEChERS				
		Solvente extrator	Acetonitrila	Clean up	MgSO ₄ , PSA, C18 e sílica				
		Salting out	MgSO ₄ , NaCl	Solvente de eluição	---				
NDELA, NDEA	Shampoo, gel de banho, loção, cremes, condicionador, protetor solar, produtos para bebê	Extração/ Clean-up				LC-MS/MS	ESI+/MSRM	10 ng mL ⁻¹ (NDELA) 5 ng mL ⁻¹ (NDEA)	(LIM <i>et al.</i> , 2018)
		Amostra (qtd)	1 g	Técnica	---				
		Técnica	SLE	Sorbente	---				
		Solvente extrator	Acetato de etila	Solvente de eluição	---				

Legenda: **SPE:** Extração em fase sólida; **LLE:** Extração líquido/líquido; **UAE:** Extração assistida por ultrassom; **SLE:** Extração sólido/líquido;

PSA: Amina primária secundária

*O tipo de solvente de extração depende do tipo de amostra: solúvel, pouco solúvel, insolúvel em água.

1.11. Preparo de amostras

A primeira técnica de preparo de amostras usada para a determinação de NDELA em matrizes cosméticas foi a cromatografia de adsorção usando sílica gel e acetona como solvente de eluição. No entanto, esse procedimento mostrou baixa recuperação e repetibilidade devido a diferença entre as formulações dos produtos. Foi verificado que essa variabilidade na formulação causa grandes alterações na eficiência de extração (FAN *et al.*, 1977; FUKUDA *et al.*, 1981).

A dificuldade encontrada no preparo de amostras envolvendo matrizes complexas como os cosméticos deve-se, em parte, a diversidade de ingredientes utilizados nas formulações, dentre eles substâncias orgânicas que podem ser co-extraídas devido à similaridade com o analito (ZHONG & LI, 2016). A seguir serão discutidas algumas técnicas utilizadas para o preparo de amostras de matrizes cosméticas.

Uma das técnicas mais reportada para o preparo de amostras cosméticas é a extração em fase sólida (SPE). Essa técnica consiste em reter o analito numa fase estacionária sólida, denominada sorbente, através da eluição da amostra líquida por um cartucho recheado com a fase sólida. Os interferentes são removidos percolando um solvente de lavagem, e em seguida os analitos são eluídos com um solvente de eluição. Portanto, essa técnica permite além da eliminação dos interferentes a concentração do analito (ZHONG & LI, 2016). A retenção dos interferentes, e não do analito, também é possível. Nesse caso, o analito não possui afinidade com o sorbente e é eluído através do sorbente enquanto os interferentes ficam retidos. No entanto, essa abordagem não possibilita a concentração do analito. Muitas vezes a técnica de SPE é combinada com a LLE para uma melhor extração e *clean up* (GHAZALEH & ZAHRA, 2017).

A fase reversa C₁₈ foi utilizada por Schothorst e Somers (2005), Flower *et al.* (2006) e Ghassempour *et al.* (2008). Essa fase possui característica apolar e por isso quando matrizes polares, como o *shampoo*, são percoladas as substâncias apolares são retidas, enquanto as polares são eluídas. Apesar da técnica SPE consumir menor quantidade de solventes orgânicos, envolve um número maior de etapas que pode causar perda do analito, além de consumir mais tempo (ZHONG & LI, 2016).

Como mencionado anteriormente, a cromatografia em coluna utilizando sílica gel foi uma das primeiras técnicas reportadas. A sílica é um sorbente de caráter polar (fase normal) utilizado para reter analitos polares em matrizes não polares. Para a extração da NDELA, um analito polar, essa técnica se mostra, teoricamente, adequada. Em seu estudo, Wang *et al.* (2006) relataram valores de recuperação de mais de 90%, utilizando sílica gel como sorbente para preparo de amostras como *shampoo*, creme para a pele e espuma de banho (WANG *et al.*, 2006).

Além dos sorbentes citados, são reportados, na literatura, o uso da fase reversa hidrofílica-lipofílica, Oasis HLB, e fases de troca iônica. Essas últimas se baseiam na atração eletrostática entre um grupo carregado do analito e um grupo carregado da superfície do sorbente.

Estudo realizado com os sorbentes Oasis HLB, Strata-X polymeric C18, Hypercarb PGC, Bond Elut Carbon, Oasis MCX e Bond Elut AccuCAT, para extração da NDELA de matrizes cosméticas, revelou que o mais apropriado é o sorbente de troca aniônica e catiônica com fase C8 Bond Elut AccuCAT. Esse sorbente mostrou eficiência na extração do analito de matrizes complexas, e na separação de interferentes de caráter anfipático, oferecendo maiores valores de recuperação e seletividade (JOO *et al.*, 2015).

A técnica de SPE é apropriada para matrizes solúveis em água. Para as matrizes menos solúveis é reportada a técnica de extração líquido-líquido, usando solventes de extração como o diclorometano, clorofórmio ou acetonitrila. É importante destacar que alguns preparos de amostra usando SPE envolvem uma etapa anterior de extração líquido-líquido para aumentar a eficiência do *clean up* (SCHOTHORST & SOMERS, 2005; JOO *et al.*, 2015; FUJIAN *et al.*, 2016).

A técnica de extração em fase sólida dispersiva (dSPE) utilizando nanotubos de paredes múltiplas (MWNT) foi proposto por Fujian *et al.* (2016). A dSPE é uma técnica simples na qual uma alíquota do extrato da amostra é adicionada a uma quantidade de sorbente. Em seguida, a mistura é agitada para total interação entre a alíquota e o sorbente. A separação do sorbente é feita por centrifugação e a alíquota final é recolhida para análise. Essa técnica permite a combinação de vários tipos de sorbentes, o que possibilita a otimização do procedimento de acordo com o tipo de analito e de matriz. Para a extração de N-nitrosaminas voláteis (polares e apolares) de produtos para pele na forma de creme e loção, essa técnica se mostrou apropriada,

com valores satisfatórios de recuperação e precisão (CABRERA *et al.*, 2012; FUJIAN *et al.*, 2016).

O procedimento QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) foi desenvolvido inicialmente por Anastasiades *et al.* (2003) para a determinação de pesticidas em alimentos com alto teor de água em sua composição e foi utilizado por Ghazaleh e Zahra (2017) para a determinação de NDELA em *shampoo*. A proposta da técnica é realizar uma extração inicial utilizando extração líquido-líquido, seguido de um *clean up* com d-SPE. A primeira etapa do QuEChERS consiste na extração com solvente, como por exemplo a acetonitrila, em banho ultrassônico. Em seguida é realizada a etapa de *salting out* utilizando sais como MgSO₄ e NaCl, para aumentar a eficiência de extração do analito. Por fim é realizada a limpeza do extrato através da d-SPE, utilizando sorbentes como C18 e amina primária secundária (PSA), para eliminação dos interferentes. A vantagem do QuEChERS está no menor consumo de reagentes e na rapidez na execução da técnica (CABRERA *et al.*, 2012; CAPELA *et al.*, 2016; GHAZALEH & ZAHRA, 2017).

A dispersão da matriz em fase sólida (MSDP) consiste na mistura da amostra com um sorbente e a transferência desse material para um cartucho para eluição. O suporte sólido faz a dispersão dos componentes da amostra em sua superfície, proporcionando o aumento da área superficial. Os componentes da amostra e o analito são distribuídos na fase sólida de acordo com a polaridade. O uso de co-colunas também é possível, proporcionando o aumento do *clean up*. Nesse caso, a amostra dispersa é colocada num cartucho contendo Florisil® ou sílica, por exemplo, e logo após é realizada a eluição do analito (BARKER, 2000).

Nesse trabalho foram avaliados diferentes preparos de amostra de modo a selecionar o que oferece o melhor *clean up* e eficiência de extração. A técnica selecionada foi otimizada de tal forma que o efeito matriz fosse minimizado para as amostras selecionadas. Além do preparo de amostra *off-line* foi avaliado nesse trabalho o uso da técnica SPE *on-line* para a concentração dos analitos.

1.12. SPE *on-line*

A etapa de preparo de amostra é a que consome mais tempo na análise e muitos erros analíticos podem ser gerados nessa etapa. Isso motivou o desenvolvimento de dispositivos automatizados e hifenados como o SPE *on-line* que

acopla a extração em fase sólida diretamente ao sistema cromatográfico (BARCELÓ & HENNION, 1995).

O método hifenado mais utilizado com a cromatografia líquida, em se tratando de amostras líquidas é a SPE (PAN *et al.*, 2014). A técnica de SPE *on-line* é baseada num esquema de válvulas que são configuradas no modo de carregamento e eluição. A Figura 4 mostra o esquema do sistema de acoplamento SPE-LC.

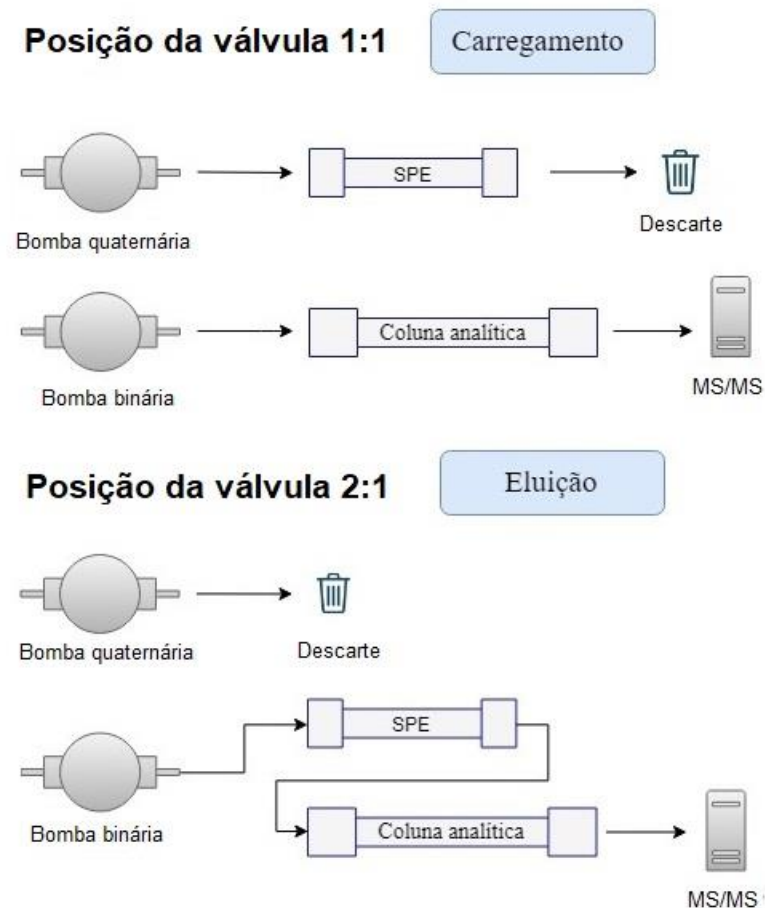


Figura 4: Esquema simplificado do SPE *on-line* à cromatografia líquida. A configuração permite o acoplamento da coluna SPE e da coluna analítica, viabilizando a concentração do analito, o *clean up* e a separação. Fonte: Próprio autor.

O preparo de amostras no modo *on-line* traz benefícios como: aumento da repetibilidade, da eficiência e da precisão do método, diminuição na perda do analito, menor tempo de execução, diminui a contaminação da amostra e sua possível degradação.

Nesse trabalho a técnica de SPE *on-line* foi utilizada para a concentração dos analitos e *clean-up* adicional do extrato anterior a quantificação. O princípio de funcionamento das válvulas foi detalhado no item 3.7 da “Parte experimental”.

1.13. Técnicas analíticas

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica muito utilizada para separação de compostos não voláteis ou pouco voláteis, onde uma pressão elevada é aplicada no sistema de forma que o solvente líquido (fase móvel) passe através da coluna cromatográfica, recheada com pequenas partículas, que separam as substâncias através da sua afinidade pela fase estacionária. A cromatografia líquida é uma técnica bem estabelecida e consolidada sendo, até hoje, muito utilizada para o desenvolvimento de métodos de separação, tendo disponível várias opções de colunas para as mais diversas aplicações (MALDANER *et al.*, 2012; LANÇAS, 2013).

A pesquisa por novas fases estacionárias permitiu o desenvolvimento de instrumentos capazes de diminuir o tempo da análise e aumentar a eficiência de separação. A cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) usa colunas cromatográficas com partículas porosas $\leq 2\mu\text{m}$. Além de permitir a diminuição do tempo da análise, as vantagens trazidas por esse sistema é o aumento da resolução e detectabilidade, economia de fase móvel e estacionária, volume menor de amostra e menor geração de resíduos (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O cromatógrafo à líquido acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS) traz muitas vantagens, dentre elas o aumento da seletividade, sendo esse sistema hifenado comumente utilizado para a análise de misturas complexas e análises quantitativas de traços. A técnica LC-MS/MS é recomendada para compostos muito polares e não voláteis ou com baixa volatilidade (BOYD *et al.*, 2008; CHIARADIA *et al.*, 2008).

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica baseada na medida da razão massa/carga (m/z) de moléculas ou fragmentos de moléculas. O detector possui a capacidade de distinguir os analitos dos interferentes mesmo que possuam o mesmo tempo de retenção, devido a sua alta seletividade quando operado no modo de reações selecionadas (SKOOG *et al.*, 2006).

A fonte de eletronebulização (ESI, *electrospray*) baseia-se na transferência de íons presentes em solução para a fase gasosa, sendo uma interface indicada para moléculas de baixa massa molecular e polaridade média/alta, sendo, portanto, indicada às N-nitrosaminas, objetos do estudo (COLE, 1997).

O analisador do tipo quadrupolo é muito utilizado por apresentar linearidade adequada em análises quantitativas. Nos instrumentos do tipo triplo quadrupolo, três

quadrupolos são colocados em série. O primeiro e o terceiro permitem a seleção de íons, enquanto o segundo é uma cela de colisão onde ocorre a fragmentação do íon selecionado no primeiro quadrupolo. A fragmentação que ocorre no segundo quadrupolo é realizada pela colisão do íon precursor com moléculas de um gás neutro, como, por exemplo, o argônio. Após a fragmentação a razão massa/carga do íon produto (íon precursor após a fragmentação) pode ser selecionada e é direcionada para o terceiro quadrupolo. Esse modo de análise é conhecido como monitoramento de reações selecionadas (SRM, *selected reaction monitoring*), que fornece uma alta sensibilidade e seletividade ao método (BOYD *et al.*, 2008; CHIARADIA *et al.*, 2008).

1.14. Validação do método

A validação analítica pode ser definida como a “*avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos*” (ANVISA, 2017).

A validação tem como propósito demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à análise específica para a qual foi desenvolvido (ANVISA, 2017).

Os parâmetros realizados para a validação podem variar de acordo com o objetivo analítico ou com as diretrizes estabelecidas pelas agências regulatórias. Alguns parâmetros utilizados na validação do método são: seletividade, faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra- e inter-ensaio e exatidão (ANVISA, 2017).

1.14.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico é a sua capacidade de identificar ou quantificar o analito na presença de componentes presentes na amostra, como impurezas, metabólitos ou componentes da matriz (ANVISA, 2017).

A espectrometria de massas sequencial, operando no modo SRM, associada a técnica cromatográfica tem como vantagem o aumento da seletividade se comparado com detectores espectrofotométricos de modo geral e permite, além da quantificação, a confirmação de identidade (ANVISA, 2017).

No caso de métodos quantitativos, de acordo com a RDC nº166 de 2017 da Anvisa, a seletividade pode ser demonstrada através da “*comprovação de que a*

resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação”.

1.14.2. Faixa linear e linearidade

A faixa linear ou faixa de trabalho é a faixa de concentração que fornece quantificações confiáveis com exatidão e precisão através do uso da relação concentração-resposta. Essa relação refere-se à curva analítica que relaciona a resposta instrumental com a concentração do analito. A faixa linear pode ser estabelecida a partir do estudo da linearidade (ANVISA, 2017).

A linearidade é a capacidade do método de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito. Após estabelecer a faixa de trabalho, deve ser avaliado a linearidade da mesma. Para isso, são utilizados pelo menos, cinco pontos de concentrações diferentes para a solução padrão, medidas em triplicata, no mínimo (ANVISA, 2017).

1.14.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado. De acordo com a RDC nº166 de 2017 da Anvisa a determinação do LOD pode ser feita por método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração. Na utilização do método razão sinal-ruído, a razão deve ser maior ou igual a 2:1, sendo que geralmente é utilizado a razão de 3:1 (ANVISA, 2017).

O limite de quantificação (LOQ) é a “*menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas*”. Para a determinação desse parâmetro através da avaliação da razão sinal/ruído, deve ser considerado uma razão de no mínimo 10:1. O LOD e o LOQ são expressos em concentração e a relação do LOQ com a precisão e a exatidão deve ser considerada (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017).

1.14.4. Precisão intra e inter ensaio

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos utilizando o método desenvolvido. Esse parâmetro é expresso por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (ANVISA, 2017).

Uma das formas de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV), calculado conforme Equação 1.

$$\text{RSD} = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Quando a precisão é expressa em termos de repetibilidade, a amostra deve ser avaliada sob as mesmas condições de operação, mesmo analista, mesmo equipamento, e leitura das réplicas realizadas em um único dia. Nesse caso, a precisão é referida como precisão intra-dia. A RDC nº166 da Anvisa preconiza que a reprodutibilidade deve ser obtida em laboratórios diferentes, através de proximidade dos resultados. Em termos de reprodutibilidade intra-laboratorial ou intermediária, a precisão pode ser obtida no mesmo laboratório, em dias diferentes, sob as mesmas condições de operação e operadores diferentes (ANVISA, 2017).

Os critérios de aceitação devem levar em consideração os objetivos do método, variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e concentração do analito na amostra (ANVISA, 2017). Os valores de aceitação do RSD podem ser determinados usando a tabela de Horwitz, que estabelece a relação entre os valores de RSD e concentração do analito (HORWITZ *et al.*, 1980).

1.14.5. Exatidão

A exatidão mede o nível de concordância entre a concentração experimental encontrada utilizando o método e a concentração teórica ou real. A exatidão pode ser expressa em termos de percentual de recuperação do analito, calculado pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica, conforme Equação 2 (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

1.14.6. Quantificação usando *surrogate* como padrão interno

Os *surrogates* são compostos similares ao analito quanto a composição química, podendo ser uma versão da substância modificada isotopicamente. Assim como o analito, o *surrogate* não está presente na matriz branca e deve ser adicionado às soluções padrão, à matriz branca e à matriz fortificada (RIBANI et al., 2004).

Para a técnica LC-MS/MS o efeito matriz pode ser caracterizado pelo incremento ou supressão do íon, causando o aumento ou a diminuição do sinal, respectivamente. Uma das possibilidades de corrigir esse efeito é utilizando uma curva analítica na matriz para a quantificação do analito. Entretanto, em algumas situações é inviável encontrar uma matriz branca que represente várias amostras, sendo esse o caso dos cosméticos e produtos para higiene pessoal, os quais possuem matrizes que variam de fabricante para fabricante. Essa diferença na matriz pode resultar em interferentes diferentes, e em concentrações distintas, que co-eluem com o analito (HEWAVITHARANA, 2011).

O principal objetivo do preparo de amostras, além de concentrar o analito, é eliminar concomitantes que possam causar um efeito matriz. No entanto, mesmo após *clean up* extensos, alguns compostos podem co-eluir com o analito, causando o efeito matriz, principalmente quando se trata de matrizes complexas como os cosméticos e se emprega a fonte ESI. Ainda que seja utilizado o modo SRM na quantificação e confirmação de identidade, os concomitantes, apesar de não serem detectados, podem prejudicar a ionização do analito e, em consequência, afetar negativamente o limite de quantificação do método.

Para corrigir o efeito matriz pode ser utilizado o método de padronização interna, onde um padrão interno (*surrogate*) é adicionado para corrigir esse efeito. A construção da curva analítica para quantificação do analito é construída plotando a razão entre as respostas do analito e do padrão interno *versus* concentração do analito. Essa razão será a mesma, independente da curva ser preparada na matriz branca ou no solvente. Isso pode ser explicado pela similaridade entre o *surrogate* e o analito, que normalmente eluem no mesmo tempo de retenção e sofrem os mesmos efeitos causado pelos concomitantes. Portanto, a razão das respostas individuais será sempre a mesma. Além de corrigir o efeito matriz, o padrão interno corrige as variações do preparo de amostras, perdas durante as etapas do preparo de amostras

e as variações intrínsecas da fonte ESI e do espectrômetro de massas (*GOSETTI et al.*, 2010; HEWAVITHARANA, 2011).

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivos

O objetivo geral do trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de um método, empregando a extração em fase sólida *on-line* à cromatografia líquida de ultra-alta eficiência associada a espectrometria de massas sequencial (SPE-UHPLC-MS/MS) visando a determinação de NDELA em *shampoo* para bebê.

Os objetivos específicos compreendem:

- ✓ Levantamento de formulações de *shampoo* para bebê no mercado e, pela composição discriminada no rótulo, avaliar a presença de aminas com potencial de serem nitrosadas;
- ✓ Desenvolvimento de método analítico para a determinação de NDELA usando SPE-UHPLC-MS/MS e avaliação se o mesmo pode ser estendido para outras N-nitrosaminas;
- ✓ Avaliação de diferentes preparos de amostras;
- ✓ Validação do método desenvolvido para a determinação de NDELA em *shampoo* para bebê;
- ✓ Análise de amostras de *shampoo*.

Capítulo 3

Parte experimental

3.1. Equipamentos

- ✓ Cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência Waters ACQUITY UPLC® com Espectrômetro de massas Waters tipo quadrupolo Xevo TQD *Zspray* e sistema de extração em fase sólida *on-line* (SPE-UHPLC-MS/MS) constituído de: sistemas de bomba quaternária H-Class e bomba binária I-Class, forno para coluna, injetor automático FTN I-Class, fonte de ionização por eletronebulização (ESI) e sistema de gerenciamento de coluna (*Column Manager*). Software MassLynx versão 4.1;
- ✓ Balança analítica Sartorius modelo CPA 225D com precisão de $\pm 0,01$ mg (Alemanha);
- ✓ Purificador de água Milli-Q Academic (Millipore, EUA);
- ✓ Bomba de vácuo modelo 089-CAL (Fanem, Brasil);
- ✓ Centrífuga modelo Rotofix 32A (Hettich, Alemanha);
- ✓ Agitador de solução tipo vórtex, modelo IKA® genius 3 (EUA);
- ✓ Banho de ultrassom Unique, modelo 1450 (Brasil);
- ✓ pH-metro Digimed, modelo DM-22 com eletrodo de vidro combinado (Brasil).

3.2. Materiais

- ✓ Cartucho para SPE em polipropileno com capacidade para 6 mL;
- ✓ Coluna cromatográfica Waters Acquity UPLC® CSH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μ m) (Waters, Irlanda);
- ✓ Coluna para SPE *on-line* Waters HLB OASIS Direct connect HP 20 μ m, 2,1 x 30 mm (Waters, Irlanda).
- ✓ Discos para cartucho SPE, feito em polietileno, 20 μ m de porosidade (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Cartucho de extração em fase sólida Oasis HLB 6cc, 200 mg, partícula de 30 μ m (Waters, EUA);
- ✓ Sistema tipo “manifold” de múltiplas extrações;
- ✓ Tubo para centrífuga tipo Falcon em polipropileno 15 mL;

3.3. Padrões analíticos

- ✓ N-nitrosodietanolamina (Sigma Aldrich, 99%);
- ✓ N-nitrosodietanolamina-d₈ (Sigma Aldrich, 99%);

✓ Solução de N-nitrosaminas (MIX): N-nitrosodibutilamina, N-nitrosodietilamina, N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodifenilamina, N-nitroso-n-propilamina, N-nitrosometiletilamina, N-nitrosomorfolina, N-nitrosopiperidina, N-nitrosopirrolidina (Sigma Aldrich, 99%).

3.4. Solventes e reagentes

- ✓ A água empregada no preparo de soluções e amostras foi obtida em sistema de purificação (Milli-Q, EUA).
- ✓ Acetato de amônio (Merck, Alemanha);
- ✓ Acetona (Honeywell, EUA);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Honeywell, EUA);
- ✓ Ácido fórmico (Merck, Alemanha);
- ✓ Bondesil PSA 40 µm (Agilent Technologies, Brasil);
- ✓ Cloreto de sódio 99,5 % (Merck, Alemanha);
- ✓ Diclorometano grau HPLC (Carlo Erba, França);
- ✓ Florisil® 100-200 *mesh* (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, Índia),
- ✓ Hexano (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Metanol grau HPLC (Honeywell, EUA);
- ✓ Sílica gel 60-200 *mesh* (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Sorbente a base de sílica quimicamente ligada com grupo octadecil (C₁₈) para SPE, Discovery® DSC-18 70 Å x 50 µm (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (Synth, Brasil);
- ✓ Sulfato de sódio anidro p.a (Vetec, Brasil)

3.5. Amostras

Doze amostras de *shampoo* para bebê, de fabricantes diferentes, foram adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente (25 °C) e protegidas de luz. Para a seleção das amostras foi feita a avaliação da composição indicada no rótulo do produto. Das 12 amostras, oito relatam em sua formulação substâncias precursoras na formação de N-nitrosaminas. As quatro amostras restantes, sem potenciais precursores na formação de N-nitrosaminas em sua formulação, foram adquiridas a fim de selecionar uma

possível matriz branca. A Tabela 5 apresenta as amostras, suas respectivas referências codificadas quanto ao fabricante, e a presença de substâncias precursoras.

Tabela 5: Amostras de *shampoo* para bebê e a presença de agentes precursores na formação de N-nitrosaminas.

Fabricante	Cocamida DEA	Cocamida MEA	Trietanolamina	Dimetilol-dimetil (DMDM) hidantoína
A		X	X	
B	X			
C	X			X
D				
E				
F	X			
G	X			
H	X		X	
I				
J	X			
K	X			
L ⁱ				

Legenda: DEA (dietanolamina); MEA (monoetanolamina); i: produto importado.

3.6. Preparo das soluções padrão

A solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NDELA foi preparada pela dissolução do padrão em metanol. A NDELA-d₈ foi preparada em metanol na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A solução padrão do MIX de N-nitrosaminas foi preparada na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da diluição do padrão em metanol. Todas as soluções estoque foram armazenadas em frasco âmbar, no freezer à -18 °C, por um período máximo de três meses.

As soluções intermediárias foram preparadas na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da diluição das soluções estoque em metanol como solvente de diluição. As soluções de trabalho foram preparadas, diariamente, a partir da diluição da solução intermediária, usando água como solvente.

3.7. Desenvolvimento do método espectrométrico e cromatográfico (SPE-UHPLC-MS/MS)

Para o desenvolvimento do método cromatográfico e espectrométrico foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra alta-eficiência (UHPLC), acoplado a um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS), com analisador triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização por eletronebulização (ESI). O método foi desenvolvido usando a tecnologia SPE *on-line*, um procedimento automatizado onde uma coluna de extração em fase sólida (SPE) é acoplada diretamente ao sistema cromatográfico, permitindo a injeção de volumes maiores de amostra, concentração do analito e limpeza.

O sistema SPE-UHPLC-MS/MS é composto por uma bomba binária (BSM) e uma bomba quaternária (QSM). A QSM é sincronizada com o amostrador (*sample manager*) e é responsável por fazer o carregamento da amostra na coluna de SPE *on-line*. No modo de carregamento a QSM bombeia a fase móvel pelo amostrador, levando a amostra para a coluna de SPE, onde os analitos serão concentrados. A BSM é responsável pela eluição dos analitos da coluna de SPE e direcionamento destes para a coluna analítica e sistemas de detecção.

As etapas do procedimento envolvem:

1. Carregamento/*clean up* da amostra na coluna SPE;
2. Mudança da válvula e eluição dos compostos da coluna SPE para a coluna analítica, no modo *direct flush*, onde ocorre a separação;
3. Mudança da válvula para a posição inicial, após a eluição de todos os analitos, permitindo a regeneração e reequilíbrio das bombas e das colunas;
4. Sistema pronto para próxima injeção.

As Figuras 6 e 7 mostram os diagramas do sistema ACQUITY UPLC da Waters no modo de SPE *on-line*.

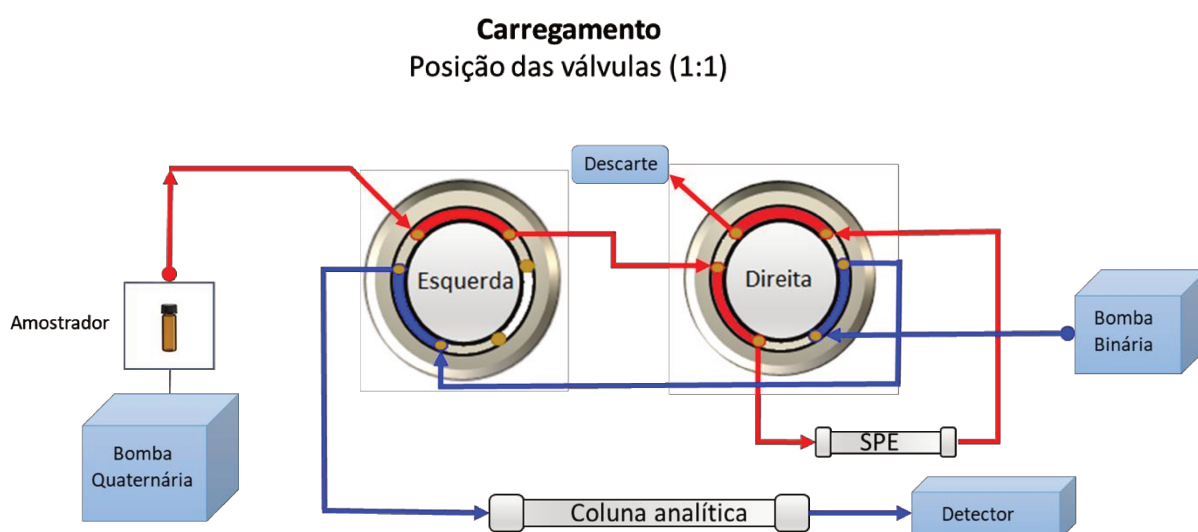


Figura 5: Configuração do sistema no modo de carregamento. A direção da fase móvel da bomba binária está representada pela linha azul e a direção do solvente propulsionado pela bomba quaternária pela linha vermelha. As válvulas são configuradas na posição 1:1.

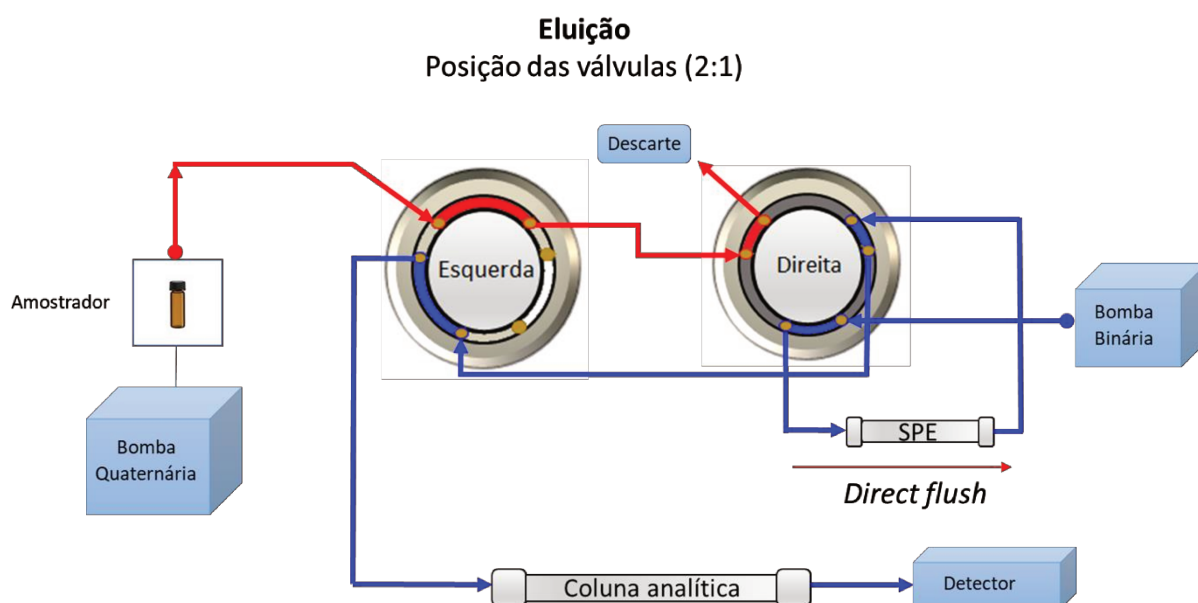


Figura 6: Configuração do sistema no modo de eluição. A direção da fase móvel da bomba binária está representada pela linha vermelha e a direção do solvente propulsionado pela bomba quaternária pela linha azul. As válvulas são configuradas na posição 2:1.

O carregamento da amostra na coluna SPE pode ser realizada utilizando uma vazão maior de solvente, devido ao tamanho das partículas da coluna (20 μm). Além disso, o tamanho da coluna permite que a amostra seja carregada num tempo menor.

O desenvolvimento do método de carregamento da amostra e de eluição estão descritos nos itens, 3.7.3 e 3.7.2, respectivamente.

3.7.1. Condições do espectrômetro de massas

Para o desenvolvimento do método analítico aplicado ao espectrômetro de massas foram estabelecidas, primeiramente, as condições ótimas do equipamento. Para isso, foram infundidas diretamente e individualmente soluções padrão de N-nitrosodietanolamina e N-nitrosodietanolamina- d_8 (padrão interno) preparadas em metanol na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para os demais analitos foi infundida uma solução padrão de MIX de N-nitrosaminas na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A infusão foi feita no modo combinado, usando ácido fórmico 0,1% em água: metanol (85:15, v/v) como fase móvel na vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$.

Para cada analito foram monitorados um íon precursor e um a dois íons produto, sendo selecionado um íon de quantificação e um ou dois de confirmação. As soluções padrão de N-nitrosaminas foram infundidas na vazão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$. A ionização por eletronebulização foi feita no modo positivo e os seguintes parâmetros de operação do equipamento foram otimizados: voltagem do capilar (kV), temperatura da fonte ($^{\circ}\text{C}$), temperatura de dessolvatação ($^{\circ}\text{C}$), vazão do cone e do gás de dessolvatação (L h^{-1}).

Após a otimização dos parâmetros citados acima, foram verificadas a voltagem do cone e a energia de colisão para cada analito. O *dwell time* foi ajustado após a determinação das condições cromatográficas. Foi estabelecido um intervalo de 15 a 30 pontos de aquisição para o pico do íon de quantificação de cada analito.

Tendo sido estabelecidas as condições ótimas do espectrômetro de massas, foi feita uma avaliação adicional dos aditivos utilizados na fase móvel. Foram avaliados, além do ácido fórmico 0,1%, o formiato de amônio (10 mmol L^{-1}) e o acetato de amônio (10 mmol L^{-1}). Para isso, foram injetados no sistema cromatográfico, no modo SPE *on-line*, $2 \mu\text{L}$ de solução padrão $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando a coluna cromatográfica Acquity UPLC CSH C18 e a coluna SPE Oasis HLB. Cada aditivo foi adicionado, individualmente, a fase móvel aquosa. A temperatura da coluna analítica foi mantida em $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e a temperatura do *sample manager* em $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada aditivo foi avaliado, utilizando três vazões da bomba binária: $0,30 \text{ mL min}^{-1}$, $0,35 \text{ mL min}^{-1}$ e $0,40 \text{ mL min}^{-1}$. As condições da bomba quaternária foram mantidas em 100% de água (v/v)

como solvente de carregamento, vazão da QSM de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de carregamento de 0,40 minutos.

3.7.2. Condições cromatográficas

A primeira etapa do desenvolvimento do método cromatográfico foi estabelecer um gradiente de eluição, de modo que a eluição dos analitos da coluna analítica resultassem em picos simétricos nos cromatogramas que permitissem a sua quantificação confiável pela área. Para o desenvolvimento do método cromatográfico, utilizando a coluna analítica *Acquity UPLC CSH C18*, foram avaliados como solventes da fase orgânica (FO), o metanol e a acetonitrila. Para a avaliação do metanol foi adicionado à fase móvel ácido fórmico 0,1% v/v. A avaliação da acetonitrila foi feita empregando a mistura de solventes orgânicos (metanol:acetonitrila, 98:2 v/v) com ácido fórmico 0,1% v/v. Foram injetados $2 \mu\text{L}$ de solução padrão $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, com temperatura da coluna analítica mantida em $40 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do *sample manager* em $10 \text{ }^\circ\text{C}$ e vazão da bomba binária de $0,30 \text{ mL min}^{-1}$. As condições da bomba quaternária foram mantidas em 100% de água (v/v) como solvente de carregamento, vazão da QSM de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de carregamento de 0,40 minutos. Todos os solventes e reagentes foram filtrados à vácuo em filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e desgaseificados na lavadora ultrassônica anterior ao uso.

3.7.3. Otimização das condições de carregamento da amostra na coluna SPE on-line

Após a seleção do aditivo e da composição da fase móvel foram avaliadas as variáveis de carregamento da amostra na coluna SPE *on-line* OASIS HLB. Um planejamento experimental multivariado do tipo Composto central foi escolhido como ferramenta de otimização para determinação das condições de carregamento da NDELA, devido à sua menor interação com a coluna de SPE Oasis HLB. Como fatores relevantes para o processo foram avaliados: proporção do solvente de carregamento, tempo de carregamento e vazão da bomba quaternária. Inicialmente, foi avaliado um modelo linear, formado por 2^3 pontos fatoriais, com um ponto central replicado 4 vezes. Após verificar a não aplicabilidade desse modelo, foi avaliado um modelo quadrático. Para isso, foram adicionados 6 pontos axiais ao modelo, totalizando 19 experimentos.

Os ensaios foram realizados na ordem -1, 0 e +1 que representam os valores padronizados dos níveis, sendo o nível 0 o ponto central conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Valores dos níveis padronizados para os parâmetros utilizados no planejamento experimental

	Fatores	-1	0	1
x₁	% H ₂ O (v/v)	97	98,5	100
x₂	t _{carregamento} (minutos)	0,30	0,40	0,50
x₃	vazão BQ (mL min ⁻¹)	0,90	1,00	1,10

BQ: bomba quaternária

Para os ensaios foram injetados 2 µL de uma solução padrão de NDELA na concentração de 1,0 µg mL⁻¹. A temperatura da coluna SPE foi mantida em temperatura ambiente. A temperatura da coluna analítica foi mantida em 40 °C, a temperatura do *sample manager* em 10 °C e a vazão da bomba binária foi de 0,30 mL min⁻¹.

As variáveis e os níveis escolhidos para o estudo foram definidos com base em experimentos preliminares. Os ensaios realizados para o planejamento fatorial com um ponto central estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Ensaios do planejamento experimental com 2^3 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e um ponto central replicado quatro vezes realizados em ordem aleatória. Os valores das colunas x_1 , x_2 e x_3 , representam os valores padronizados.

Ensaio	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	1	0	0
15	-1	0	0
16	0	1	0
17	0	-1	0
18	0	0	1
19	0	0	-1

Para avaliar os efeitos dos fatores e se esses possuíam efeitos de interação, os dados foram ajustados ao modelo quadrático, representado pela Equação 3.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1^2 + b_5x_2^2 + b_6x_3^2 + b_7x_1x_2 + b_8x_2x_3 + b_9x_1x_3 + b_{10}x_1x_2x_3 \quad (\text{Eq.3})$$

Onde:

- y representa a área do pico
- x_1 representa a variável % de H₂O em v/v
- x_2 representa a variável tempo de carregamento
- x_3 representa a variável vazão da bomba quaternária
- $b_0, b_1, b_2, b_3, b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$ são os coeficientes do modelo, que são estimados, e que definem a regressão.

A equação matricial e a matriz X utilizadas no cálculo, estão representadas na Equação 4 e Tabela 8, respectivamente.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y} \quad (\text{Eq. 4})$$

Tabela 8: Matriz X para cálculo do modelo quadrático completo.

M	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁ ²	x ₂ ²	x ₃ ²	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₃
1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1
1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1
1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1
1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1
1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1
1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
1	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0

A variância do coeficiente “b” foi estimada pela Equação 5, onde s² é a estimativa da variância experimental (variância do ponto replicado).

$$\mathbf{V}(\mathbf{b}) = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{s}^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

Os erros-padrão, $\sqrt{V(b_i)}$, e os intervalos de confiança (95%), $t \times \sqrt{V(b_i)}$, foram associados à variância do ponto replicado. Para avaliar a significância do modelo encontrado foi realizada uma análise de variância e um teste F, avaliando os valores de: média quadrática da regressão (MQ_R), média quadrática do resíduo (MQ_r), média quadrática da falta de ajuste (MQ_{Faj}) e média quadrática do erro puro (MQ_{ep}).

Após a determinação dos parâmetros de carregamento, foi realizado o estudo do volume de injeção. Para isso, foram injetados no sistema 50 μL , 100 μL , 150 μL , 200 μL e 250 μL de uma solução padrão de N-nitrosaminas de 10 ng mL^{-1} usando os parâmetros otimizados.

3.8. Medida do pH

O pH das amostras foi medido seguindo as orientações da norma técnica ASTM D 1172 – *Standard Guide for pH of Aqueous Solutions of Soaps and Detergents*. Para o preparo das soluções, $1,0 \pm 0,01$ g de cada amostra foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 1 L. Em seguida, o volume foi completado com água ultrapura até a marca da calibração e o balão foi agitado levemente até a completa dissolução do *shampoo* evitando a formação de espuma. O pH da solução foi medido com eletrodo de vidro combinado previamente calibrado (American Society for Testing and Materials, 1995).

3.9. Preparo das amostras

Para o desenvolvimento do preparo de amostras foram avaliados, primeiramente, os métodos encontrados na literatura. Após a determinação do método mais efetivo para a eliminação dos interferentes, a técnica foi otimizada para posterior validação. O preparo de amostras foi avaliado usando o *shampoo* do fabricante “E” com fortificação no nível de 200 ng g^{-1} de solução padrão das N-nitrosaminas em estudo e de padrão interno tipo *surrogate* NDELA-d₈. Esse *shampoo* foi selecionado uma vez que análises preliminares não revelaram a presença de N-nitrosaminas.

3.9.1. Extração em fase sólida – sorbente Oasis HLB (Procedimento I)

O procedimento consistiu em pesar $1,00 \pm 0,01$ g da amostra de *shampoo* em um tubo Falcon e adicionar 5 mL de solvente de extração (metanol:acetona, 1:1, v/v). Em seguida, a solução foi agitada em vórtex por 1 minuto e colocada no banho ultrassônico por 30 minutos. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada a 4226 g por 15 minutos e 2 mL do sobrenadante recolhido e o solvente evaporado sob fluxo de nitrogênio a 40 °C. O extrato foi reconstituído com 2 mL de metanol:água, 30:70, v/v. A amostra foi percolada no cartucho Oasis HLB (200 mg de sorbente), previamente condicionado com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura. O cartucho foi lavado com 3 mL de metanol:água, 30:70, v/v. A eluição foi realizada com 6 mL de metanol.

O eluato foi coletado e seco sob fluxo de nitrogênio e reconstituído com 1 mL de metanol:água, 10:90, v/v.

3.9.2. QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) (Procedimento II)

Foram pesados $1,00 \pm 0,01$ g da amostra para um balão volumétrico de 5 mL, o qual foi avolumado com água. A solução foi agitada por 3 minutos em vórtex e em seguida uma alíquota de 3 mL foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL. Foram adicionados ao tubo 6 mL de acetonitrila como solvente de extração e a solução foi agitada em vórtex por mais 3 minutos. Em seguida, o tubo foi colocado no banho ultrassônico por 10 minutos. A etapa de extração foi completada com a adição de 1,8 g de $MgSO_4$ e 0,6 g de NaCl. Essa mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos. Para a separação das fases, o tubo foi colocado na centrífuga a 4226 g por 10 minutos e 5 mL da fase orgânica foi coletada e transferida para um novo tubo Falcon. A essa fase foram adicionados 300 mg de $MgSO_4$, 100 mg de PSA (amina primária secundária), 100 mg de C18 e 100 mg de sílica. A etapa de *clean-up* foi finalizada pela agitação em vórtex por 3 minutos, seguida de centrifugação a 4226 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e seco sob fluxo de nitrogênio e reconstituído com 1 mL de água.

3.9.3. Dispersão da matriz em fase sólida (MSDP) (Procedimento III)

Foram pesados $1,00 \pm 0,01$ g da amostra para um almofariz e adicionado 0,5 g de sulfato de sódio anidro e sílica até a completa sorção da fase líquida do *shampoo*. Um cartucho SPE foi recheado com 1 g de Florisil® e condicionado com 3 mL de hexano. A amostra dispersa na sílica foi transferida para o cartucho contendo a fase Florisil®. Foram, então, percolados 2 mL de hexano. O cartucho foi seco sob vácuo por 10 minutos e logo em seguida foram percolados 5 mL de uma solução (diclorometano: acetona, 40:60, v/v). Os eluatos recolhidos foram secos sob fluxo de N_2 e reconstituídos com 500 μ L de água.

3.9.4. Extração em fase sólida - sorbente C18 (Procedimento IV)

Uma quantidade de $1,00 \pm 0,01$ g da amostra de *shampoo* foi pesada em um tubo Falcon de 15 mL, e água foi adicionada até aproximadamente 10 mL. O tubo foi agitado no vórtex por 10 minutos e centrifugado a 4226 g por 10 minutos. Uma

alíquota de 2 mL foi recolhida e percolada num cartucho Bond Elut C18 de 500 mg, previamente condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de água. O primeiro volume de 1 mL recolhido (eluato 1) foi descartado e o volume subsequente de 0,5 mL (eluato 2) foi recolhido para análise.

3.9.5. Extração em fase sólida - sorbente C18 (Procedimento V)

Com base nos resultados obtidos no procedimento IV, os seguintes parâmetros do procedimento de extração em fase sólida utilizando o sorbente C18 foram avaliados: quantidade de amostra, volume de diluição da amostra, quantidade de sorbente C18, volume dos eluatos 1, 2 e 3.

Primeiramente foi feita a avaliação da quantidade de sorbente e volume do eluato 1. Para isso, uma quantidade de $1,00 \pm 0,01$ g da amostra de *shampoo* foi pesada em um tubo Falcon de 15 mL e água foi adicionada até aproximadamente 10 mL. A mistura foi agitada em vórtex até homogeneização da amostra e em seguida o volume total foi percolado no cartucho SPE C18 (0,5 g, 1,0 g ou 1,5 g), previamente condicionado com 4 mL de metanol e 4 mL de água. Um volume (1 ou 2 mL) do eluato 1 foi descartado e o volume restante (eluato 2) foi recolhido num balão volumétrico de 10 mL que foi, posteriormente, avolumado com água. Um terceiro volume (eluato 3) foi obtido pela percolação de 5 mL de solução água:acetonitrila, 95:5, v/v pelo cartucho. O eluato 3 foi recolhido num balão volumétrico de 5 mL e avolumado com água.

A segunda parte consistiu na menor diluição da amostra e do eluato 2. Para isso, foi pesado $1,00 \pm 0,01$ g da amostra em um tubo Falcon de 15 mL e completando o volume com água até aproximadamente 5 mL. A mistura foi agitada em vórtex até completa dissolução da amostra e em seguida o volume total foi percolado no cartucho SPE C18 (1,5 g), previamente condicionado com 4 mL de metanol e 4 mL de água. Um volume de 2 mL do eluato 1 foi descartado e o volume restante (eluato 2) foi recolhido num balão volumétrico de 5 mL que foi, posteriormente, avolumado com água.

A última parte consistiu na pesagem de uma quantidade menor de amostra para avaliação da recuperação da NDELA no eluato 2. Para isso, foi pesado $0,50 \pm 0,01$ g da amostra em um tubo Falcon de 15 mL e completando o volume com água até aproximadamente 10 mL. A mistura foi agitada em vórtex até homogeneização da

amostra e, em seguida, o volume total foi percolado no cartucho SPE C18 (1,5 g), previamente condicionado com 4 mL de Metanol e 4 mL de água. Um volume de 2 mL do eluato 1 foi descartado e o volume restante (eluato 2) foi recolhido num balão volumétrico de 10 mL que foi, posteriormente, avolumado com água.

O esquema geral da preparação da amostra utilizando a SPE C18 está representada na Figura 8.

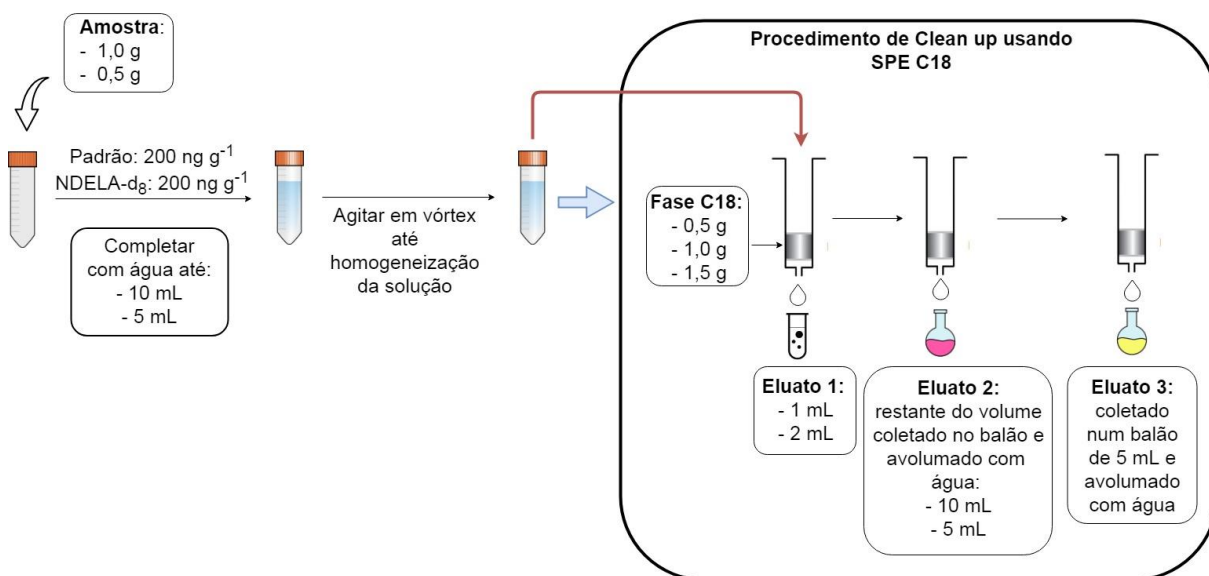
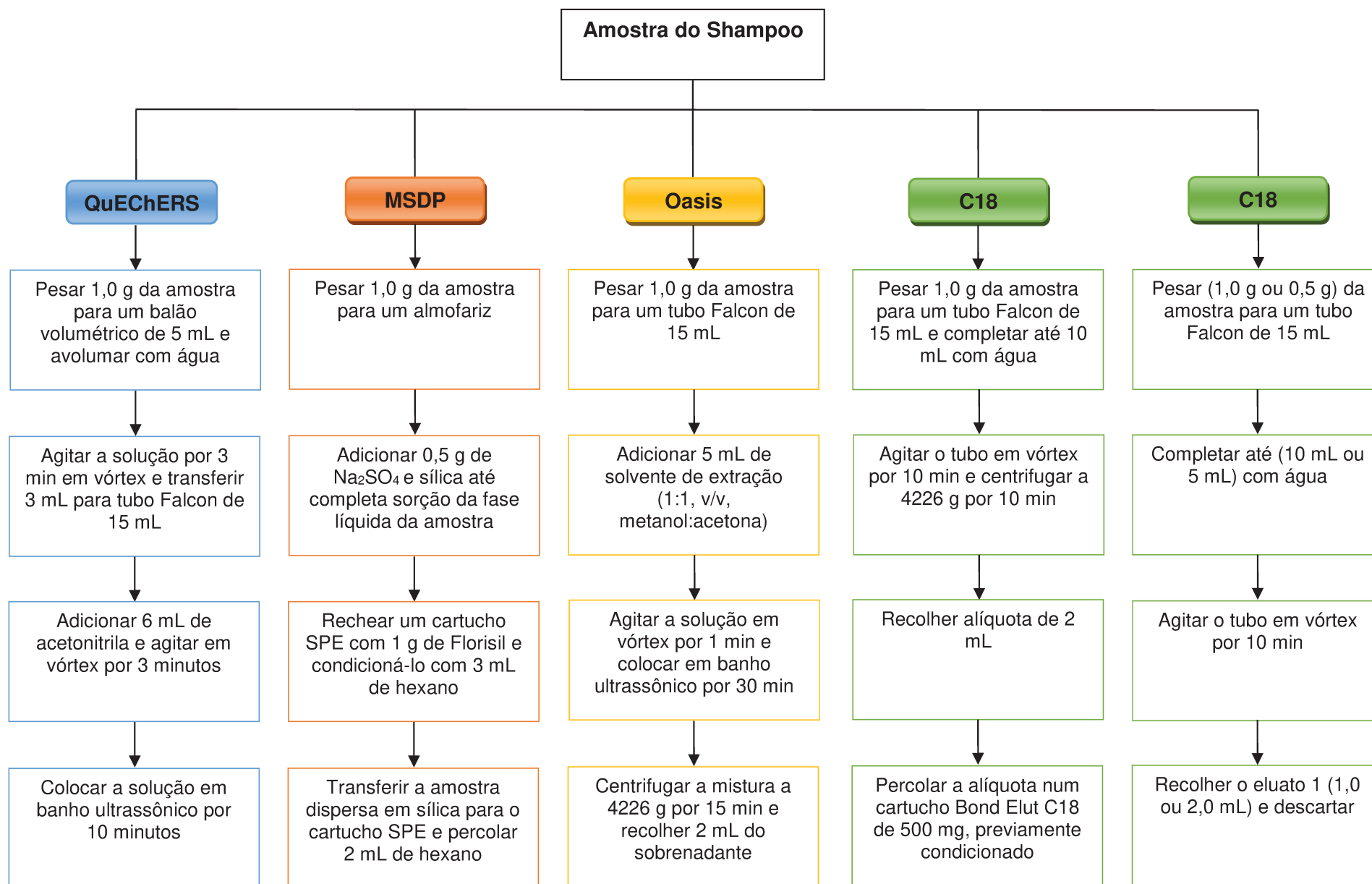
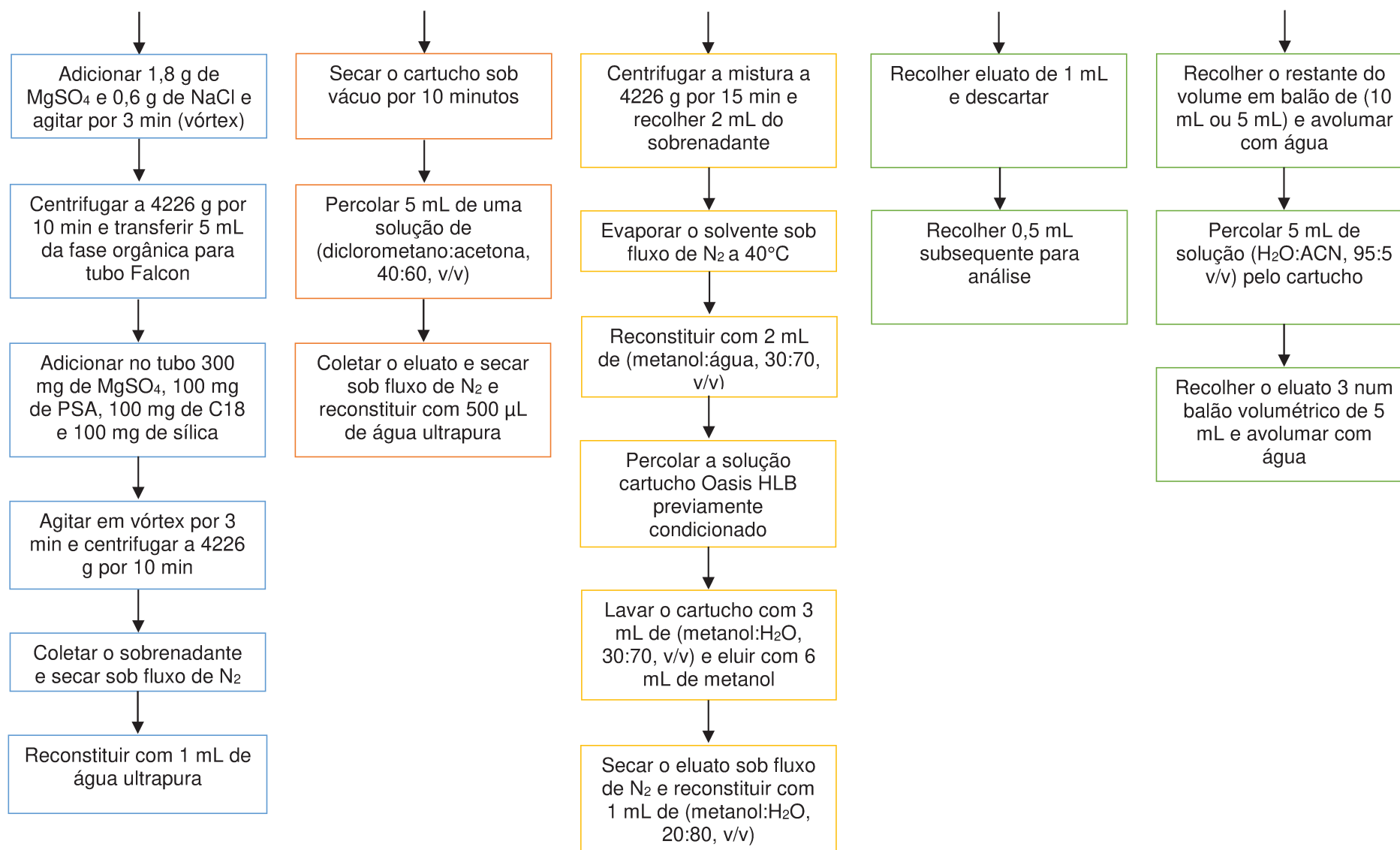


Figura 7: Esquema da avaliação do preparo de amostras utilizando a SPE C18. Fonte: Próprio autor.

O fluxograma a seguir mostra os procedimentos de preparo de amostra avaliados.





3.10. Validação de método SPE-UHPLC-MS/MS

Para a validação do método analítico desenvolvido foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra- e inter-ensaio e exatidão.

3.10.1. Faixa linear e linearidade

A faixa de trabalho foi estabelecida através do estudo da linearidade. Para isso foram construídas curvas no solvente, em triplicata de preparo independente, e em seis níveis de concentração (1,0 – 2,0 – 5,0 – 10,0 – 15,0 – 20,0 ng mL⁻¹). A NDELA-d₈ foi usada como padrão interno (*surrogate*) na concentração de 10,0 ng mL⁻¹. Para avaliação da linearidade, os seguintes dados foram analisados: representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; gráfico de dispersão dos resíduos, e a respectiva avaliação estatística; equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados ordinários; avaliação dos coeficientes de correlação linear (r); avaliação da significância do coeficiente angular. A homocedasticidade também foi investigada, usando o teste de *Levene*, para a utilização do modelo dos métodos dos mínimos quadrados ordinários. A possível presença de *outliers* foi avaliado pelo teste dos resíduos padronizados de *Jackknife*, com o limite de exclusão máxima de 22,2%. Nos testes estatísticos foi utilizado um nível de significância de 0,05.

3.10.2. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção e o limite de quantificação foram determinados pelo método instrumental (razão sinal-ruído), fortificando a amostra “A”, cuja matriz não apresentou sinal de NDELA, com concentrações do analito em níveis decrescentes até obter a razão sinal/ruído de 3:1 para o LOD e 10:1 para o LOQ.

3.10.3. Precisão

A precisão do método foi expressa em termos de repetibilidade, através da análise da amostra “A” fortificada no nível do LOQ, 10 ng g⁻¹. Para o estudo da repetibilidade, a amostra foi preparada conforme descrito no item 3.9.5, pelo mesmo analista, mesma instrumentação e única corrida analítica. A precisão intra-dia (mesmo dia) foi realizada em triplicata (n=3) e a precisão inter-dia (dias diferentes) foi realizada em três dias alternados em triplicata (n= 9). A precisão foi demonstrada pela dispersão

dos resultados, calculando a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) seguindo a seguinte fórmula:

$$RSD = \left(\frac{s}{CMD} \right) \times 100$$

Onde CMD é a concentração média determinada e s é a estimativa do desvio padrão absoluto.

3.10.4. Exatidão

A exatidão foi expressa pelo valor percentual da recuperação do analito de concentração conhecida adicionada à amostra “A” fortificada no nível do LOQ, 10 ng g⁻¹. As análises foram feitas em triplicata (n=3) e os analitos foram quantificados através da equação da curva analítica no solvente. A exatidão foi expressa em termos de recuperação, calculada conforme equação a seguir:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica da fortificação}} \times 100$$

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1. Desenvolvimento do método SPE - UHPLC-MS/MS

4.1.1. Condições do espectrômetro de massas

Primeiramente foi avaliado quais N-nitrosaminas poderiam ser ionizadas na fonte de eletronebulização (ESI), no modo positivo, e que pudessem ser analisadas por UHPLC-MS/MS, em especial aquelas mais voláteis para as quais a cromatografia gasosa é mais utilizada. Para esses analitos foram estabelecidas as condições do espectrômetro de massas com o objetivo de definir os íons precursores e produtos, visando a quantificação destes pelo modo de reações selecionadas (SRM).

Para a determinação das condições de operação do espectrômetro de massas foi infundida uma solução padrão de NDELA e NDELA-d₈ de 1,0 µg mL⁻¹ e solução padrão de uma mistura (MIX) de N-nitrosaminas voláteis (N-nitrosodibutilamina, N-nitrosodietilamina, N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodifenilamina, N-nitroso-n-propilamina, N-nitrosometiletilamina, N-nitrosomorfolina, N-nitrosopiperidina, N-nitrosopirrolidina) de 10 µg mL⁻¹ preparadas em metanol. A necessidade de usar uma concentração maior na infusão do MIX de N-nitrosaminas pode ser explicada pelas propriedades físico-químicas destes analitos. Como na técnica de ionização por ESI ocorre a evaporação do solvente, uma parte dos analitos voláteis pode evaporar no processo, diminuindo a sensibilidade. Estudos realizados com N-nitrosaminas voláteis indicam que a fonte de ionização APCI possui sensibilidade de 2-20 vezes maior do que a ESI. No entanto, como a fonte de ESI seria a mais adequada para a ionização da NDELA, principal composto a ser avaliado neste trabalho, essa fonte ionização foi escolhida (RIPOLLÉS *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013).

Para cada analito foram monitorados um íon precursor e um a dois íons produto, sendo um íon de quantificação e o(s) outro(s) de confirmação. A fonte ESI foi operada no modo positivo e os seguintes parâmetros de operação do equipamento foram avaliados: voltagem do capilar (kV), temperatura da fonte (°C), temperatura de dessolvatação (°C), vazão do cone e do gás de dessolvatação (L h⁻¹). As condições ótimas estabelecidas estão apresentadas na Tabela 9.

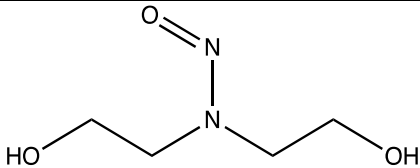
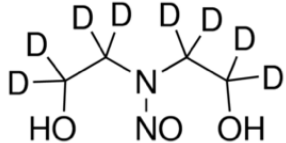
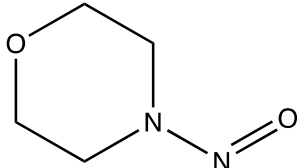
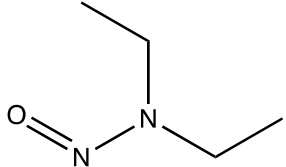
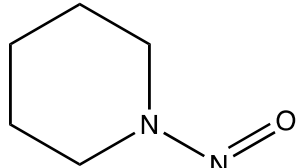
Tabela 9: Condições ótimas de operação do espectrômetro de massas para as N-nitrosaminas. Condições da infusão: concentração da solução padrão: 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (NDELA) e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (NA voláteis); fase móvel: ácido fórmico 0,1% em água: metanol (85:15, v/v), vazão de 0,40 mL min^{-1} .

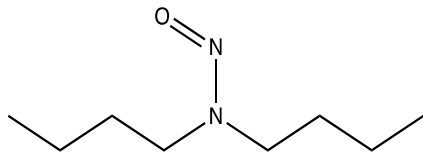
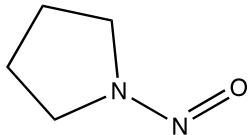
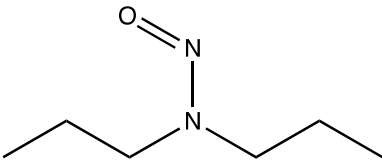
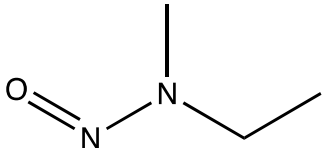
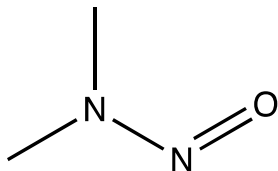
Parâmetros	Condição
Modo de ionização	+
Voltagem do Capilar (kV)	1,0
Temperatura da fonte (°C)	150
Temperatura de dessolvatação (°C)	350
Vazão do gás de dessolvatação N₂ (L h⁻¹)	600
Vazão do gás no cone (L h⁻¹)	50

Após a otimização dos parâmetros apresentados foi determinada a voltagem do cone para favorecer a detecção do íon precursor de cada analito, assim como a energia de colisão para cada fragmento escolhido. A otimização foi feita variando a voltagem do cone e em seguida a energia de colisão até se obter o sinal mais intenso. Na determinação da voltagem do cone evitou-se usar valores que pudessem ocasionar a fragmentação do íon na fonte.

O *dwell time* foi ajustado após a determinação das condições cromatográficas, tendo sido estabelecido um intervalo de 15 a 30 pontos de aquisição para o pico do íon de quantificação de cada analito. A Tabela 10 mostra os resultados ótimos determinados para cada N-nitrosamina.

Tabela 10: Íons precursores, fragmentos, voltagem do cone, energia de colisão e *dwell time* para a detecção das N-nitrosaminas.

Nome	Estrutura	Massa molar	Íon precursor (m/z)	Voltagem do cone (V)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Dwell time
N-nitrosodietanolamina NDELA		134,13	135	15	104*	4	0,015
					74	12	
N-nitrosodietanolamina NDELA-d8**		142,18	143	15	111	6	0,008
N-nitrosomorfolina NMOR		116,11	117	30	87*	10	0,025
					73	15	
N-nitrosodietilamina NDEA		102,13	103	27	75*	10	0,025
				19	47	14	
N-nitrosopiperidina NPIP		114,15	115	35	41	17	0,030
					69*	15	

Abreviação	Estrutura	Massa molar	Íon Precursor (m/z)	Voltagem do Cone (V)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Dwell Time
N-nitrosodibutilamina NDBA		158,24	159	30	57* 103	13 10	0,025
N-nitrosopirrolidina NPYR		100,06	101	30	55 41*	13 21	0,025
N-Nitrosodi-n-propilamina NDPLA		130,1	131	28	89* 43	9 12	0,025
N- nitrosometiletilamina NMEA		88,06	89	55	72*	10	0,050
N-nitrosodimetilamina NDMA		74,05	75.0	28	56.9* 40.9	14 16	0,07

*Íon de quantificação; ** Padrão interno

As rotas de fragmentação propostas para algumas N-nitrosaminas são apresentadas no Anexo I (ZHAO *et al.*, 2009).

O modo de ionização ESI está intrinsicamente ligada à fase móvel (FM) e aos aditivos utilizados. Portanto, após a determinação das condições ótimas do espectrômetro de massas foi feita uma avaliação dos aditivos a serem utilizados na fase móvel. O uso de fase móvel ácida pode dificultar a análise de compostos de caráter básico quando usada a cromatografia em fase reversa, devido a menor retenção dos analitos protonados (MALLET *et al.*, 2004). Por esse motivo buscou-se avaliar também aditivos com valor de pH > 7.

Foram avaliados além do ácido fórmico 0,1%, o formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ e o acetato de amônio 10 mmol L⁻¹. O limite de concentração de 10 mmol L⁻¹ foi estabelecido para evitar a supressão da ionização e a consequente redução da sensibilidade (KOSTIAINEN & KAUPPILA, 2009).

O sistema foi configurado no modo SPE *on-line*, conforme ilustrado nas Figuras 6 e 7 do Capítulo 3, de maneira que os aditivos pudessem ser avaliados de acordo com sua interação em ambas as colunas (SPE e analítica).

Para a determinação do melhor aditivo (ácido fórmico 0,1%, formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ e acetato de amônio 10 mmol L⁻¹) foram avaliados as áreas e os formatos dos picos cromatográficos para a NDELA, NMOR, NPIP, NPYR e NDBA em três vazões da fase móvel. Os resultados obtidos estão representados na Figura 9.

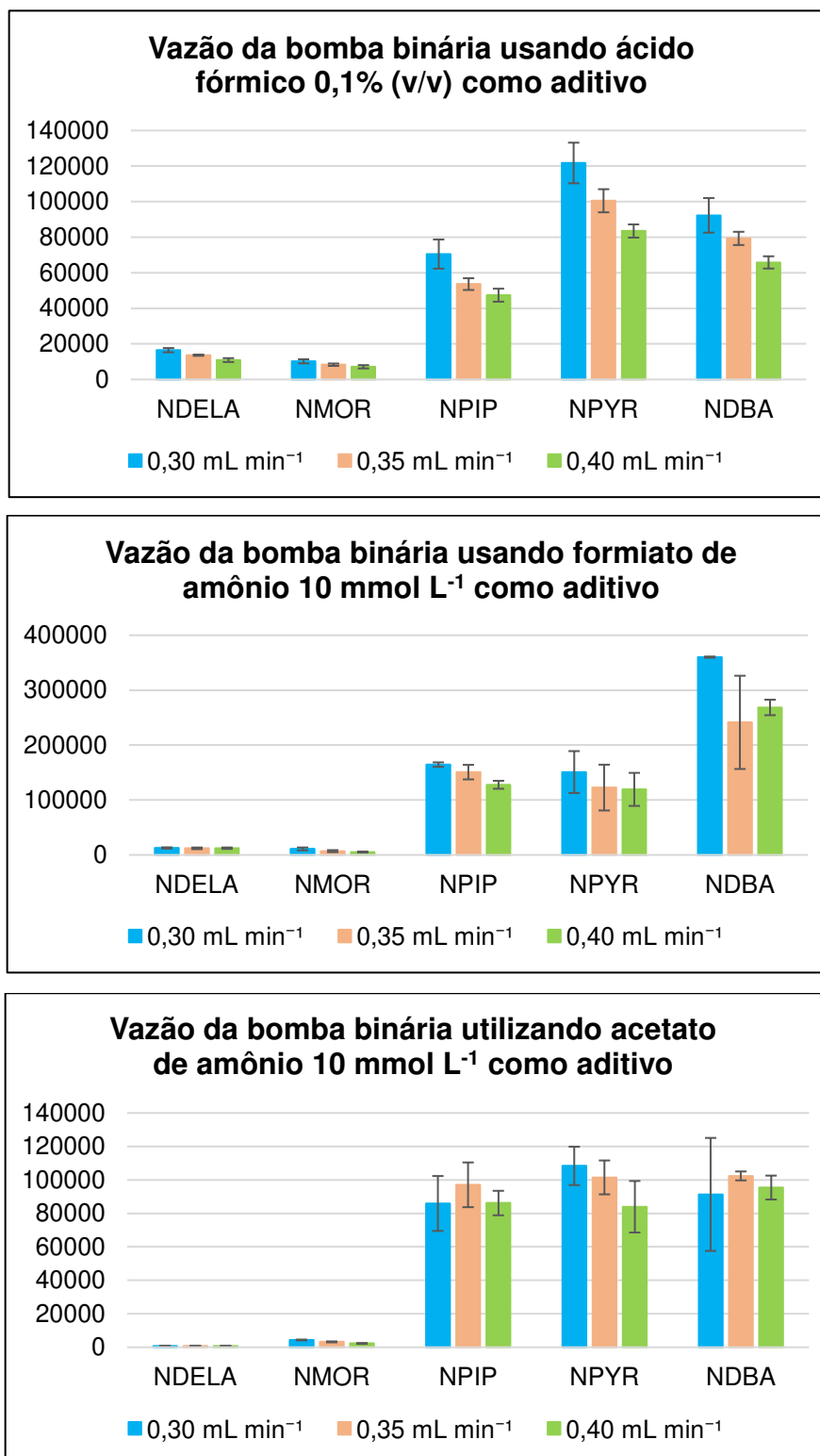


Figura 8: Valores das áreas dos picos em razão do aditivo e da vazão da bomba binária. Volume injetado: 2 μL de solução padrão 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, temperatura da coluna analítica: 40 $^{\circ}\text{C}$, temperatura do *sample manager*: 10 $^{\circ}\text{C}$. Condições de carregamento: 100% de água (v/v) como solvente de carregamento, vazão da QSM de 1,0 mL min^{-1} e tempo de carregamento de 0,40 minutos. A barra de erros expressa o desvio das três replicatas.

Para o estudo do melhor aditivo para a ionização dos analitos, foi priorizada a NDELA por ser o composto de interesse. Para a análise dos analitos menos polares foram avaliadas as respostas para algumas das N-nitrosaminas: NMOR, NPIP, NPYR e NDBA.

O ácido fórmico 0,1% promoveu um sinal maior para a NDELA, enquanto o formiato de amônio levou a uma melhor resposta para as N-nitrosaminas de caráter mais apolar. O acetato de amônio apresentou baixa resposta instrumental para os analitos, decorrente de uma menor eficiência de ionização. Isso pode ser explicado pela supressão do sinal devido à concentração do sal e/ou a formação de aduto de amônio [M-NH₄⁺].

O estudo da vazão foi realizado, uma vez que este fator possui influência na ionização por ESI. Os gráficos da Figura 9 mostram que para o ácido fórmico e o formiato de amônio, quanto maior a vazão menor a resposta em área, exceto para a NDBA, utilizando formiato de amônio. O uso de maiores vazões pode gerar picos cromatográficos mais estreitos, porém pode dificultar o processo de formação dos íons na fase gasosa, diminuindo a sensibilidade instrumental.

Apesar do formiato de amônio fornecer maiores áreas para os analitos mais apolares, o ácido fórmico foi escolhido como aditivo, pois para a NDELA esse aditivo gerou maior resposta instrumental.

4.1.2. Condições cromatográficas

Para a separação cromatográfica foi inicialmente escolhida a coluna cromatográfica de fase reversa ACQUITY UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm, x 2,1 mm x 100 mm. Os ensaios iniciais com a coluna foram realizados injetando 2 µL de solução padrão de 1 µg mL⁻¹ e verificando a afinidade dos analitos com a fase estacionária (FE). A escolha da coluna foi feita através da avaliação da interação da molécula mais polar do grupo, a NDELA, com a FE. A baixa massa molar desse analito e sua alta polaridade dificultam a sua retenção em coluna de fase reversa tradicional C18. Sendo assim, foi verificado se a N-nitrosamina possuía interação suficiente com a coluna de modo que não fosse eluída no tempo morto, além da observação da linha de base do pico.

Foi avaliada uma coluna CSH C18, cujas partículas incorporam na superfície um baixo nível de cargas. Essa fase tem como característica melhorar a

assimetria dos picos, mesmo de compostos de caráter básico, quando utilizado fase móvel com aditivos de baixa força iônica, como o ácido fórmico. Além disso, essa coluna suporta uma faixa ampla de pH, entre 1-11, permitindo a avaliação de diferentes aditivos para fase móvel. Os resultados mostraram uma boa afinidade dos compostos proporcionando a separação adequada dos mesmos. O analito mais polar, NDELA, apresentou um pico mais estreito, enquanto a NDBA (menos polar) apresentou um pico mais largo, o que indica uma maior afinidade desse composto pela fase estacionária.

Embora o modo SRM não exija a separação completa dos analitos na coluna, a separação pode contribuir para a diminuição do limite de quantificação, uma vez que no tempo de aquisição o detector irá monitorar um número menor de transições.

Tendo sido determinada a adequação da coluna CSH C18, foi estabelecido um gradiente de eluição, de modo que todos os analitos fossem eluídos da coluna analítica com picos simétricos que permitissem a sua quantificação confiável pela área. Para isso, foi utilizado metanol como fase orgânica. O gradiente estabelecido está apresentado na Tabela 11.

Tabela 11: Gradiente de eluição utilizado na avaliação dos solventes orgânicos da fase móvel.

Tempo (min)	%A (Ácido fórmico 0,1% v/v em água)	%B (Metanol)
1	80	20
0,4	80	20
1,0	10	90
2,6	10	90
2,7	80	20
7,0	80	20

Para verificar se a acetonitrila poderia aumentar a resposta em área, foi testada uma fase ternária, adicionando-se 2% v/v de acetonitrila à fase orgânica. Foi verificado que a adição desse solvente leva à diminuição significativa da área do pico da NDELA (aproximadamente uma ordem de magnitude), além de diminuir o tempo de retenção do analito na coluna. Isso pode ser explicado pela maior força cromatográfica da acetonitrila que permite que esse solvente arraste com mais

facilidade os compostos altamente polares, devido a sua menor interação com a fase estacionária. Sendo assim, foi selecionado o metanol como solvente, sendo possível obter picos cromatográficos mais simétricos e com maiores respostas em áreas para a NDELA.

Os cromatogramas dos analitos utilizando ácido fórmico 0,1% v/v como aditivo e metanol como fase orgânica é apresentado na Figura 10. Os demais cromatogramas com o estudo da fase móvel e aditivos são apresentados no Anexo II.

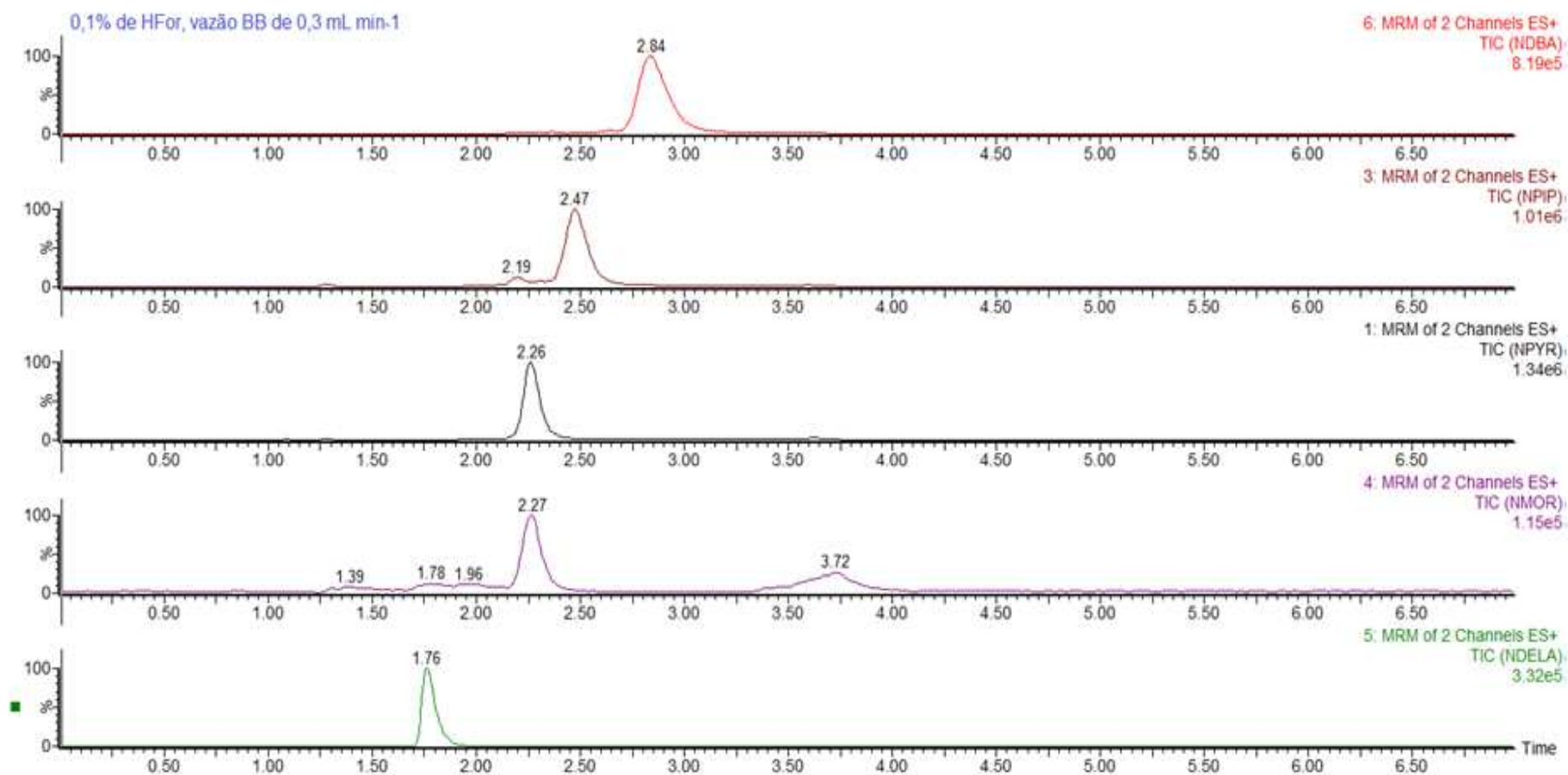


Figura 9: Cromatogramas dos analitos utilizando ácido fórmico 0,1% v/v como aditivo e metanol como fase orgânica. Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: 0,3 mL min⁻¹. Gradiente da BQ (água:metanol, v/v): inicial (100:0), 0,4 min (100:0), 2,7 min (0:100), 4,60 min (0:100), 4,61 min (100:0), 7,0 min (100:0); vazão da BQ: 1,0 mL min⁻¹; volume de injeção 2 µL; temperatura da coluna: 40 °C; temperatura do sample manager: 10 °C.

4.1.3. Condições de carregamento da amostra na coluna de SPE *on-line*

Para a etapa de extração em fase sólida *on-line* foi utilizada uma coluna Oasis HLB. A coluna C18 não foi avaliada uma vez que estudos da literatura já indicam que essa não é adequada para reter N-nitrosaminas. Lee (2013) realizou estudos comparando cartuchos de SPE Oasis HLB e C18 e verificou que a fase Oasis HLB apresentou uma eficiência de extração maior (11,6–43,7%) do que a fase C18 (9,5–25,7%) para as N-nitrosaminas.

A fase Oasis é um sorbente polimérico de balanço hidrofílico-lipofílico que permite a retenção de compostos de uma ampla faixa de polaridade. No entanto, foi verificado em ensaios preliminares que a NDELA também possui limitada interação com a coluna Oasis HLB, devido ao seu caráter altamente polar. A adição de pequena quantidade de fase orgânica (metanol) no solvente de carregamento gerava uma variação grande na área do pico do analito. Esse fato pode ser explicado pela força do solvente, fazendo com que o analito fosse eluído da coluna na etapa de carregamento da amostra.

Para determinar as condições ótimas de carregamento do analito NDELA na coluna Oasis HLB, um planejamento experimental multivariado foi escolhido como ferramenta de otimização.

A força da FM deve ser ajustada para maximizar a retenção do analito na coluna SPE. Caso o solvente possua uma força de eluição alta, ou um volume muito grande da amostra for injetado na coluna SPE, o analito pode ser eluído na fase de carregamento. Portanto, foi verificado a importância de se otimizar os parâmetros de carregamento (volume, vazão e tempo) para o analito NDELA. As condições experimentais foram descritas no item 3.7.3, do Capítulo 3.

O planejamento experimental teve início com o desenvolvimento de um modelo linear capaz de avaliar o efeito que fatores experimentais exercem um sobre o outro. A Tabela 12 mostra os resultados encontrados para os 13 ensaios realizados.

Tabela 12: Valores de área do pico (y) para os 13 ensaios.

M	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃	y
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	40470
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	72561
1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	410
1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	18467
1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	9225
1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	58217
1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	4737
1	0	0	0	0	0	0	0	7820
1	0	0	0	0	0	0	0	6824
1	0	0	0	0	0	0	0	6380
1	0	0	0	0	0	0	0	6649
1	0	0	0	0	0	0	0	6601
Desvio-padrão do ponto central (s)								562,3
Variância do ponto central (s²)								316190,7

Os valores obtidos para os coeficientes (b), assim como os respectivos erros padrão são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores dos coeficientes para o modelo linear, seus erros padrão e intervalos de confiança ($t_{(95\%,4)} = 2,776$).

Coeficiente	Valor	Erro-padrão = $\sqrt{V(b_i)}$	IC _{95%} = $t \sqrt{V(b_i)}$
b ₀	18165,7	129,0	± 358,1
b _{x1}	14163,4	177,8	± 493,7
b _{x2}	-20153,9	177,8	± 493,7
b _{x3}	-7229,6	177,8	± 493,7
b _{x1x2}	-7286,1	198,8	± 552,0
b _{x1x3}	447,6	198,8	± 552,0
b _{x2x3}	3931,1	198,8	± 552,0
b _{x1x2x3}	-3777,6	198,8	± 552,0

Os resultados mostram que o ponto b_{x1x3} não é significativo no nível de confiança de 95% com 4 graus de liberdade. Inicialmente, foi avaliado um modelo linear, no entanto, verificou-se diferença significativa entre o valor previsto pelo modelo e o valor experimental obtido para o ponto central (18656 ± 320), o que confirma a presença de curvatura e a impossibilidade de ajustar-se um modelo linear aos dados.

Para a avaliação da presença de curvatura no ponto central foi calculada a diferença entre a média dos oito primeiros resultados dos ensaios e a média dos 5 resultados obtidos no ponto central, conforme as Equações 6 e 7. Para avaliar a significância da diferença foi estimado um intervalo de 95% de confiança.

$$y_f - y_c = \frac{y_1 + \dots + y_8}{8} - \frac{y_9 + \dots + y_{13}}{5} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde y_f é a média dos pontos do planejamento fatorial 2^3 e y_c é a média dos valores do ponto central.

$$\text{Erro Padrão} = \frac{s^2}{8} + \frac{s^2}{5} \quad (\text{Eq.7})$$

Considerando que a avaliação do ponto central indicou curvatura significativa optou-se por avaliar um modelo quadrático para ajuste da curvatura. Para isso foram adicionados seis pontos experimentais adicionais. A Equação 8 representa o modelo quadrático.

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_2X_3 + b_9X_1X_2X_3 \quad (\text{Eq. 8})$$

A Tabela 14 mostra os valores encontrados para a avaliação do modelo quadrático.

Tabela 14: Valores de área do pico (y) encontrados para o modelo quadrático.

Ensaio	M	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁ ²	x ₂ ²	x ₃ ²	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₃	Resposta
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	40470
2	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	72561
3	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	410
4	1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	18467
5	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	9225
6	1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	58217
7	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	0
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4737
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7820
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6824
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6380
12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6649
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6601
14	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	39022
15	1	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1265
16	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1032
17	1	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	45712
18	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3595
19	1	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	16162

Os valores obtidos para os coeficientes (b), assim como os respectivos erros padrão são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores dos coeficientes para o modelo quadrático, seus erros padrão e intervalos de confiança ($t_{(95\%,4)} = 2,776$).

Coeficiente	Valor	Erro-padrão = $\sqrt{V(b_i)}$	IC _{95%} = $t \sqrt{V(b_i)}$
b₀	9193	205,9	± 571,5
b_{x1}	14163	177,8	± 493,7
b_{x2}	-20154	177,8	± 493,7
b_{x3}	-7230	177,8	± 493,7
b_{x1}²	8028	340,2	± 944,5
b_{x2}²	11257	340,2	± 944,5
b_{x3}²	-2237	340,2	± 944,5
b_{x1x2}	-7286	198,8	± 552,0
b_{x2x3}	3931	198,8	± 552,0
b_{x1x2x3}	-3778	198,8	552,0

O modelo quadrático encontrado está representado na Equação 9:

$$y = 9192,7 + 14163,4 x_1 - 20153,9 x_2 - 7229,6 x_3 + 8028,4 x_1^2 + 11256,9 x_2^2 - 2236,6 x_3^2 - 7286,1 x_1x_2 + 3931,1 x_2x_3 - 3777,6 x_1x_2x_3 \quad (\text{Eq. 9})$$

Para avaliar a significância do modelo encontrado foi realizado uma análise de variância com os dados do modelo e um teste F, avaliando os valores de MQ_R , MQ_r , MQ_{Faj} e MQ_{ep} . A Tabela 16 mostra os dados da ANOVA para o modelo quadrático.

Tabela 16: Valores da análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático

Fonte de variação	Somas quadráticas	Nº de graus de liberdade	Médias quadráticas
Regressão	17926729424	9	1991858825
Resíduo	1486735470	9	165192830
F ajuste	1179698091	5	235939618
Erro puro	307037379	4	76759345
Total	10385534033	18	576974113
$F_{ajuste} (MQ_{fa}/MQ_{ep})$	3,07		
$F(GL_{fa}, GL_{ep}) (F_{5;4})$	6,26		

O teste F_{ajuste} confirma que os dados se ajustam bem ao modelo quadrático, já que $F_{ajuste} < F_{tabelado}$.

A Figura 11 mostra as superfícies de resposta, ou seja, a representação gráfica da equação que descreve o comportamento do sistema.

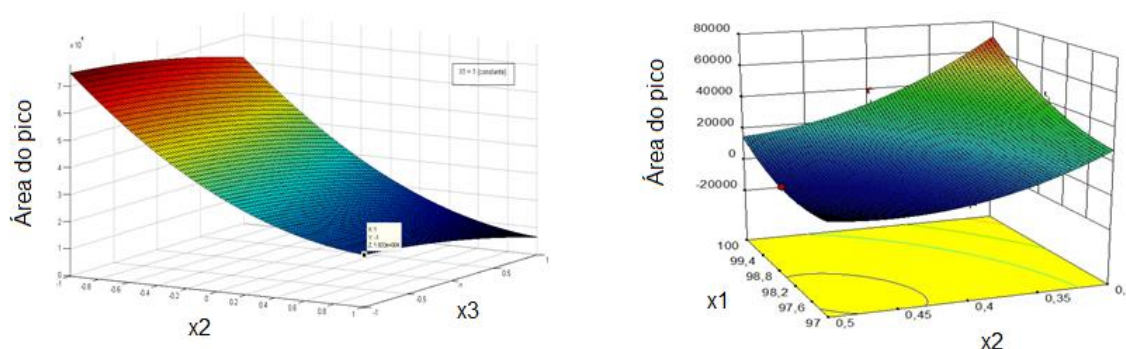


Figura 10: Superfícies de resposta do modelo quadrático para a interação entre as variáveis. Figura à esquerda: x_2 (tempo de carregamento em minutos) e x_3 (vazão mL min^{-1})
Figura à direita: x_1 (% de H_2O) e x_2 (tempo de carregamento em minutos)

Por fim, de acordo com a previsão do modelo, os valores das variáveis que maximizam a resposta são: solvente de carregamento 100% de H₂O, tempo de carregamento da amostra e lavagem da coluna de 0,27 min e vazão do solvente de 0,87 mL min⁻¹.

A fase final do desenvolvimento consistiu na definição do volume de injeção. A princípio, volumes maiores levam a uma maior resposta em área e, em consequência, menores limites de quantificação podem ser alcançados. No entanto, volumes grandes, podem levar a perda do analito na coluna SPE durante a etapa de carregamento, principalmente os que possuem menor afinidade pela fase sorbente. Os gráficos apresentados na Figura 12 mostram os resultados obtidos usando solução padrão de 10 ng mL⁻¹ de N-nitrosaminas.

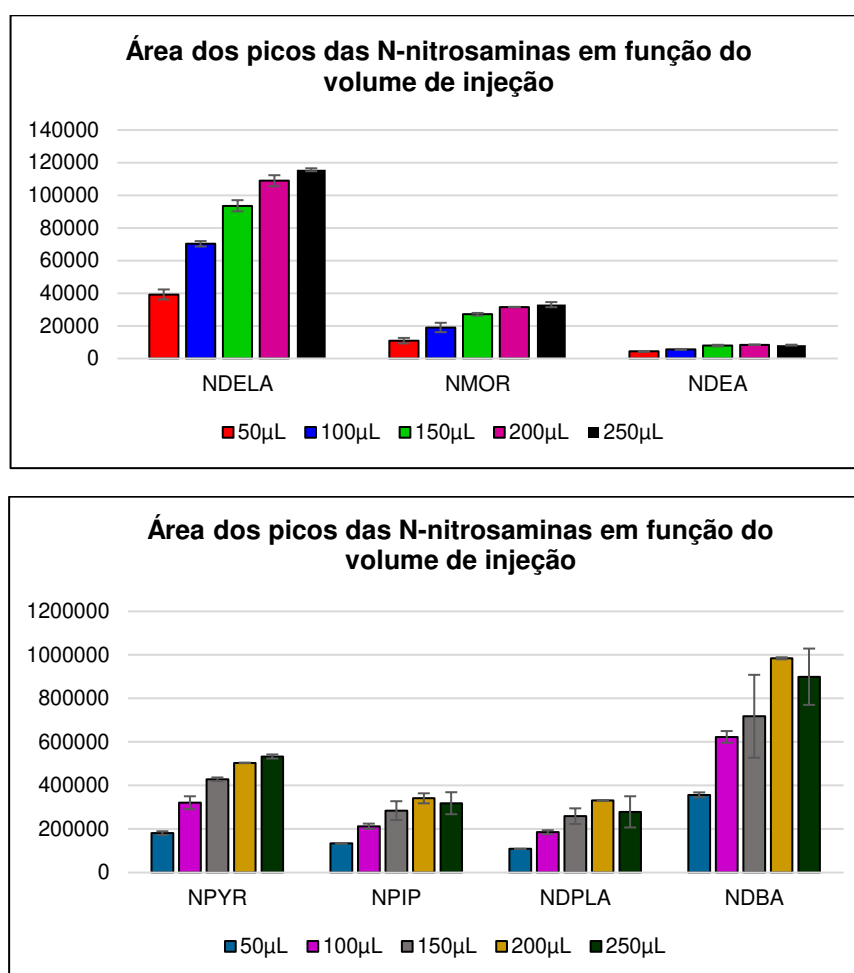


Figura 11: Área dos picos cromatográficos das N-nitrosaminas usando o sistema SPE-UHPLC-MS/MS em função do volume de injeção de 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL e 250 µL de solução padrão 10 ng mL⁻¹ de N-nitrosaminas. Condição de carregamento na coluna SPE Oasis: 100% de H₂O, vazão da BQ: 0,870 mL min⁻¹, tempo de carregamento da amostra 0,27 min;

Os dados mostraram, de modo geral, que a área do pico aumenta com o volume de injeção (até 200 μL) para todas as N-nitrosaminas avaliadas, o que é decorrente da concentração dos analitos na coluna de SPE. Entretanto, com volumes a partir de 250 μL , não ocorre um aumento significativo do sinal e para algumas N-nitrosaminas, como a NDEA, NDPLA e NDBA ocorre uma diminuição da área o que indica perda do analito na etapa de carregamento da amostra. No caso da NDELA foi observado uma distorção do pico cromatográfico para um volume de 250 μL . Ademais, para a NMOR e a NPIP a injeção de 250 μL apresenta desvios maiores entre injeções. Sendo assim, para a quantificação dos analitos foi selecionado o volume de injeção de 200 μL .

As N-nitrosaminas voláteis, ou seja, aquelas com valores de pressão de vapor maiores que 0,01 mmHg também apresentaram sinal nas condições estabelecidas, o que a princípio viabiliza a determinação dessas por cromatografia líquida. A N-nitrosamina volátil NDEA (0,86 mm Hg em 20 °C) apresentou sinal menor se comparado com as outras N-nitrosaminas menos voláteis, o que vai inferir em um maior LOQ. Os analitos NDMA e NMEA, N-nitrosaminas com maior pressão de vapor, não apresentaram sinais, em área, usando o método desenvolvido. A Tabela 17 mostra as condições finais do método SPE-UHPLC-MS/MS. A Figura 13 apresenta a linha do tempo para cada bomba e os eventos das válvulas.

Tabela 17: Tabela com as condições de carregamento e eluição, incluindo eventos das válvulas para o método SPE *on-line*.

Tempo	Bomba quaternária (QSM)						Bomba binária (BSM)				Posição da válvula			
	Vazão (mL min ⁻¹)	%A	%B	%C	%D	Curva	Tempo	Vazão (mL min ⁻¹)	%A	%B	Curva	Tempo (min)	Evento	Posição
I	0,87	100	0	0	0	6	I	0,30	80	20	6	0,27	Válvula esquerda	2
0,27	0,87	100	0	0	0	6	0,27	0,30	80	20	6	2,60	Válvula esquerda	1
2,70	0,87	0	100	0	0	6	1,00	0,30	10	90	6			
4,60	0,87	0	100	0	0	6	2,60	0,30	10	90	6			
4,61	0,87	100	0	0	0	6	2,70	0,30	80	20	6			
7,00	0,87	100	0	0	0	6	7,00	0,30	80	20	6			

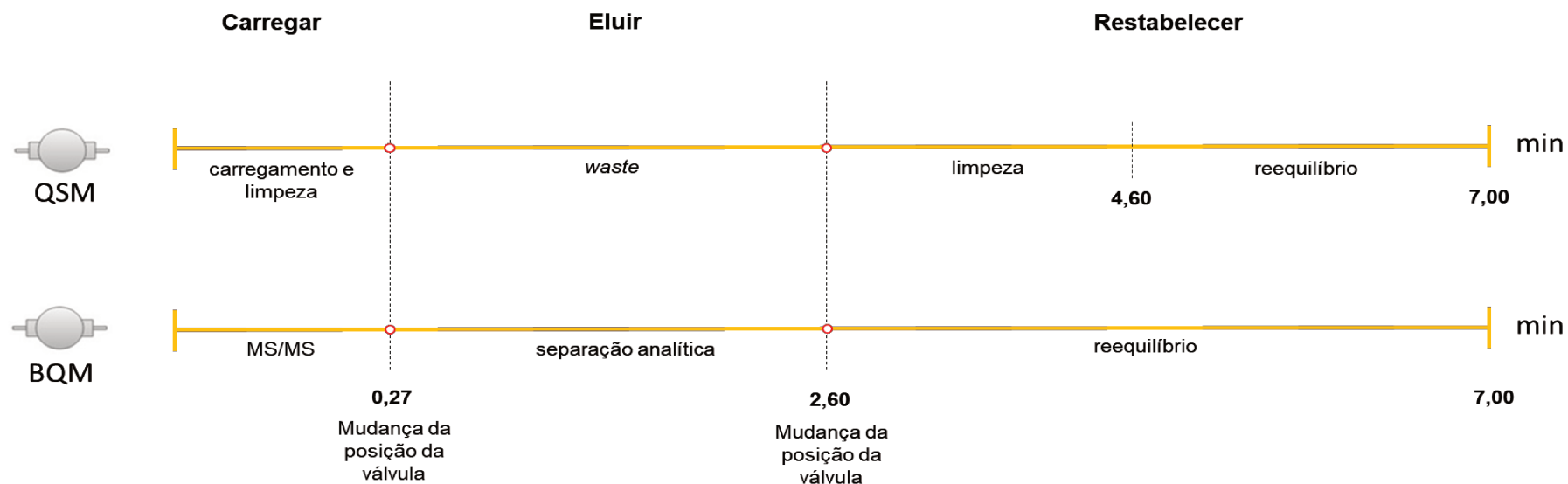


Figura 12: Linha do tempo para a bomba binária e quaternária, incluindo os eventos das válvulas.

Um cromatograma característico com as condições otimizadas está apresentado na Figura 14.

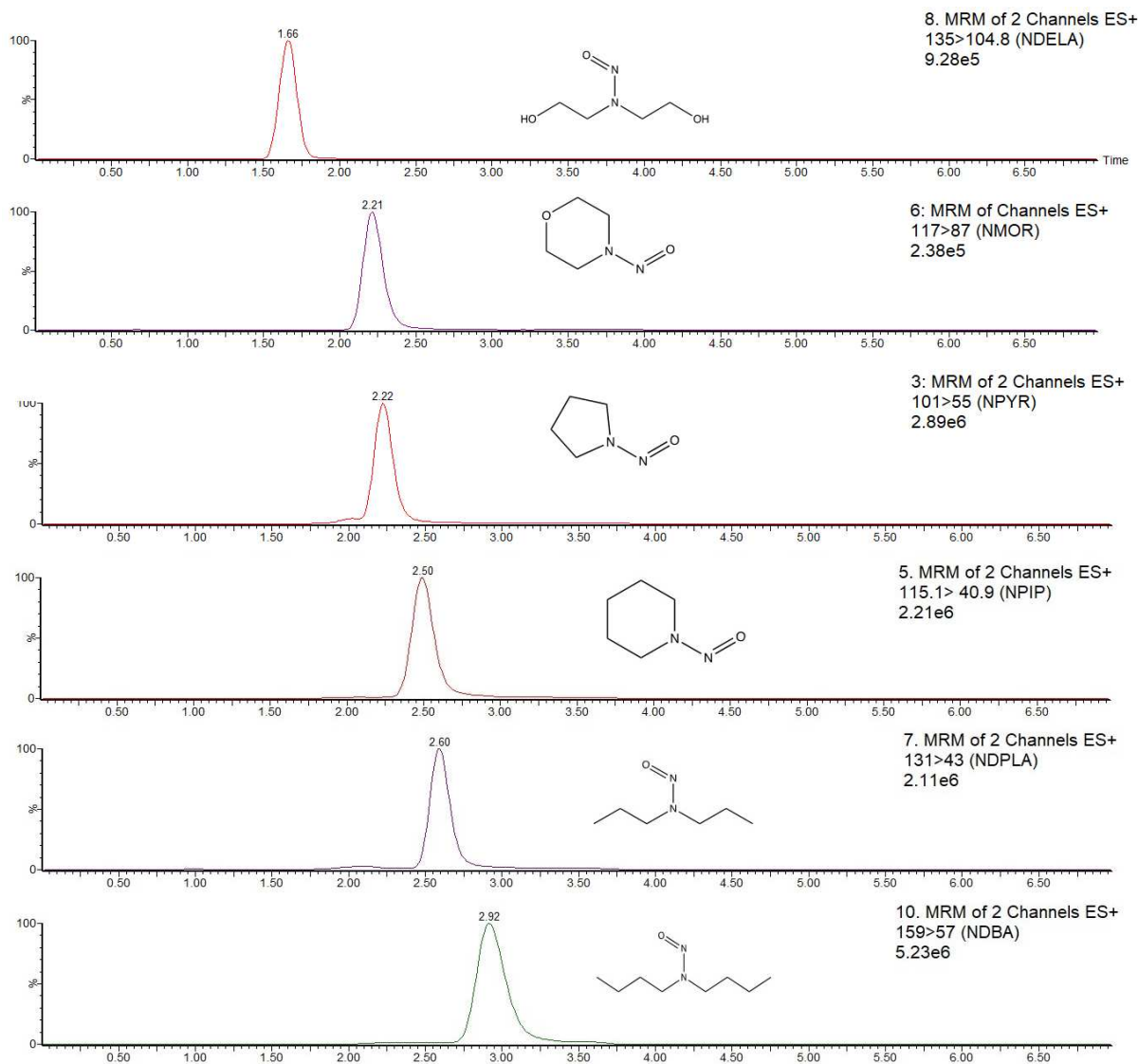


Figura 13: Cromatograma do método final SPE-UHPLC-MS/MS para solução padrão de MIX de N-nitrosaminas na concentração de 10 ng mL^{-1} . Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,27 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Gradiente da BQ (água:metanol, v/v): inicial (100:0), 0,27 min (100:0), 2,7 min (0:100), 4,60 min (0:100), 4,61 min (100:0), 7,0 min (100:0); vazão da BQ: $0,870 \text{ mL min}^{-1}$, tempo de carregamento da amostra 0,27 min; volume de injeção $200 \mu\text{L}$; temperatura da coluna: 40°C ; temperatura do sample manager: 10°C .

Uma vez estabelecidas as condições analíticas para a quantificação dos analitos por SPE-UHPLC-MS/MS foram iniciados os estudos de preparo de amostra.

4.2. Preparo de amostras

Para avaliar diferentes preparos de amostras, em um primeiro momento foram caracterizadas as amostras quanto ao seu pH, conforme especificado no item 3.8. Os resultados são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18: Valor de pH para cada amostra de *shampoo*.

Fabricante	pH
A	4,8
B	7,6
C	7,5
D	5,0
E	4,6
F	6,8
G	6,7
H	7,1
I	6,2
J	7,3
K	7,4
L	5,0

As amostras apresentaram um valor de pH a faixa de 4,6 a 7,6, sendo que quatro amostras apresentaram valores abaixo do pH neutro, entre 4,6 e 5,0.

A fase de desenvolvimento do preparo de amostras partiu da revisão dos métodos publicados na literatura e do trabalho realizado anteriormente no grupo de pesquisa (CANAES, 2011), no qual diferentes preparos de amostras de *shampoo* para a determinação de N-nitrosaminas foram avaliados. O ideal é que o procedimento seja pautado no menor número possível de etapas, sem, no entanto, comprometer a seletividade e detectabilidade do método. O emprego do espectrômetro de massas, pela seletividade inerente quando operado no modo SRM, permite em muitas situações um procedimento simplificado de preparo de amostras. No entanto, a presença de componentes da matriz pode afetar negativamente o limite de quantificação, uma vez que podem prejudicar o processo de ionização do analito na fonte de ESI (efeito matriz).

O desafio de concentrar os analitos foi superado pelo uso da técnica de SPE *on-line*, que além disso, também pode realizar um *clean up* adicional da amostra.

Restou, portanto, desenvolver um preparo de amostras capaz de eliminar os interferentes, permitindo alcançar níveis de concentração em ng g^{-1} (ppb). Outro desafio foi desenvolver um procedimento capaz de recuperar tanto o analito polar NDELA, quanto os demais analitos de caráter apolar.

Cabe destacar que o *shampoo* além de ser uma matriz complexa possui formulação que varia de fabricante para fabricante, o que pode inviabilizar um procedimento único de preparo para todas as amostras. Portanto, foi necessário avaliar a aplicabilidade do método para as amostras selecionadas.

Os procedimentos descritos na literatura foram desenvolvidos usando produtos cujas matrizes são diferentes das comercializadas no Brasil. Portanto, fez-se necessário investigar, inicialmente, a aplicabilidade desses métodos aos produtos nacionais. A seguir serão apresentados os preparos de amostra avaliados e seus resultados e discussões.

4.2.1. Preparo de amostra usando SPE Oasis HLB

O primeiro procedimento de extração em fase sólida em sorbente Oasis HLB avaliado foi reportado por MA *et al* (2011) para determinação de N-nitrosaminas voláteis em *shampoo*, entre outros cosméticos, e utilizado por Jones *et al* (2016) na determinação de N-nitrosaminas voláteis e de NDELA em *shampoo*, sabonete e batom (MA *et al.*, 2011; JONES & GLOVER, 2016). O procedimento empregado está descrito no item 3.9.1.

A extração assistida por ultrassom foi utilizada com o objetivo de extrair os analitos da matriz, levando-os para o meio líquido (sobrenadante), para posterior concentração na fase estacionária Oasis HLB.

Foram utilizadas uma amostra nacional (amostra E) e outra importada de *shampoo* para bebê (amostra L) para a avaliação do método. O uso da amostra importada teve como objetivo verificar se a matriz da amostra era diferente e o procedimento era aplicável a produtos comercializados fora do país.

Os resultados mostraram que este não é eficaz na eliminação dos tensoativos, já que a solução final apresentou formação de espuma. Isso pode ser explicado pela solubilidade dos tensoativos no solvente de extração (metanol:acetona) utilizado, devido à parte polar da molécula. Tendo em vista que a finalidade da extração ultrassônica é separar as N-nitrosaminas dos demais componentes da matriz

e que tanto aquelas quanto os tensoativos são solúveis em solventes polares, não é possível obter uma separação efetiva usando o método abordado. O uso de acetona e metanol como solvente de extração, ambos miscíveis em água, necessitaria da adição de um solvente não polar para a separação de fases, levando a uma maior diluição e baixa recuperação de analitos polares. Além disso, o sorbente Oasis HLB se mostrou ineficaz na eliminação dos tensoativos, já que após o processo de lavagem a solução apresentou formação de espuma.

Estudos realizados com a coluna Oasis HLB *on-line* mostraram que a NDELA possui baixa afinidade com a fase estacionária, sendo assim, na lavagem utilizada no método é esperado a perda desse analito, dado o uso de metanol 30%, um eluente forte.

O sorbente polimérico Oasis HLB é composto por um sítio hidrofílico e outro lipofílico, conforme mostra a Figura 15. Devido ao caráter anfipático dos surfactantes, estes podem ser retidos na coluna e na fase de eluição utilizando metanol podem ser eluídos causando a formação de espuma no eluato final.

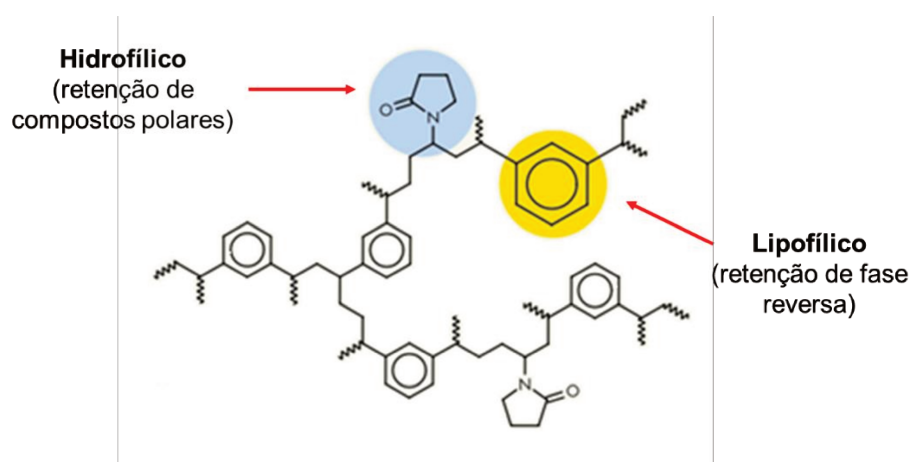


Figura 14: Estrutura do sorbente OASIS HLB. A estrutura destacada em azul é a N-vinilpirrolidona e a estrutura destacada em amarela é o divinilbenzeno. Fonte: (WATERS, 2008).

Por fim, para evitar contaminação do detector do equipamento a solução final não foi injetada no sistema.

4.2.2. Procedimento QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*)

O segundo procedimento avaliado foi proposto por Ghazaleh e Zahra (2017) e consistiu em uma adaptação do método de extração QuEChERS para a determinação de NDELA em *shampoo*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Devido a versatilidade do procedimento, este tem sido empregado para as mais diferentes aplicações. Cabe destacar que o procedimento foi originalmente proposto para a determinação de pesticidas em alimentos com alto teor de água, em particular, vegetais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A amostra de *shampoo* utilizada na avaliação foi a amostra “E”. O eluato obtido conforme procedimento detalhado no item 3.9.2 apresentou espuma, o que evidencia a co-extração de surfactantes da amostra. O *shampoo* testado possui em sua composição, majoritariamente, o lauril éter sulfato de sódio e o cocoamidopropil betaína, ambas moléculas possuem uma parte hidrofílica e outra lipofílica. As seguintes hipóteses podem ser levantadas para justificar a co-extração dos surfactantes:

- Solvente de extração: a acetonitrila apesar de extrair uma menor quantidade de componentes lipofílicos, foi capaz de extrair os tensoativos. Isso pode ser explicado pela natureza anfifílica dos surfactantes e sua solubilidade tanto em solventes polares quanto apolares.
- *Salting out*: a etapa de adição dos sais para a separação das fases, mostrou que o uso de MgSO₄, usado para remover a água, também é capaz de extrair os surfactantes. De acordo com Anastassiades *et al.* (2003), o uso desse sal gera uma reação exotérmica, levando ao aquecimento da amostra entre 40° a 45 °C, o que pode levar à extração de compostos apolares, beneficiando a extração dos surfactantes (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).
- *Clean up*: a extração em fase sólida dispersiva utilizando MgSO₄, PSA, C18 e sílica teve como objetivo retirar o resíduo de água, e reter os interferentes de caráter polar, porém evitando a co-extração da NDELA. O PSA foi usado para reter interferentes polares presentes na matriz, enquanto a fase C18 foi usada para reter os interferentes apolares. Devido ao caráter polar da sílica, está foi utilizada para a adsorção dos interferentes polares, podendo, entretanto, provocar a retenção da NDELA,

diminuindo a eficiência da extração e em consequência levar a uma menor recuperação. A etapa de *clean up* não apresentou eficiência na eliminação dos tensoativos, uma vez que o extrato final apresentou formação de espuma. Isso pode ser explicado, pela pouca quantidade de fase C18 utilizada no método. Sendo assim, o mesmo procedimento foi avaliado, dobrando a quantidade de PSA, C18 e sílica, entretanto, a variação não mostrou melhoras na eliminação dos referidos interferentes, e por isso o extrato não foi injetado no sistema cromatográfico.

4.2.3. Dispersão da matriz em fase sólida (MSDP)

O procedimento de dispersão da matriz em fase sólida empregado e descrito no item 3.9.3 seguiu o método descrito por Canaes (2011). Para o estudo utilizou-se um nível alto de fortificação da amostra com as N-nitrosaminas, $1 \mu\text{g g}^{-1}$, no entanto, o método não apresentou recuperação dos analitos.

O procedimento utilizado, originalmente, para extração de matrizes sólidas e semi-sólidas, baseia-se no princípio da dispersão da amostra em um adsorbente. Para a matriz em estudo, a técnica MSDP foi empregada usando sílica como fase dispersante da matriz e Florisil[®] como adsorbente para uma etapa adicional de *clean up*.

Como exposto no Capítulo 1, item 1.9, o *shampoo* é constituído por quase 75% de água, o que confere à matriz um caráter polar. Portanto, o procedimento de preparo de amostra precisa ser capaz de extrair o analito polar, NDELA, da matriz que também possui caráter polar.

A escolha da sílica (-Si-OH) foi feita devido ao seu caráter polar, o que permite que a água seja adsorvida, através de interações do tipo ligação de hidrogênio. O sulfato de sódio anidro foi utilizado para auxiliar na retenção da água da matriz. Devido a sua alta polaridade o Florisil[®] foi escolhido como adsorbente para retenção da NDELA na coluna.

A técnica elaborada não se mostrou eficaz na recuperação da NDELA. Isso pode ser explicado pela semelhança entre a polaridade da matriz e do analito, que pode ter ocasionado a co-extração de interferentes polares. A ineficiência na recuperação pode ser explicada, também, por uma má dispersão da matriz. Apesar disso, o eluato final não apresentou formação de espuma o que indica a eficiência do *clean up* utilizando hexano como solvente de extração e Florisil[®] como adsorbente.

4.2.4. Extração em fase sólida com sorbente C18

Na fase exploratória do estudo envolvendo o sorbente C18, foi necessário avaliar se o método era capaz de realizar uma limpeza efetiva, de modo a eliminar os tensoativos. Inicialmente foi empregado o protocolo elaborado por Chanwirat (2012), descrito no item 3.9.4.

Usando este modo de preparo de amostra foi possível produzir extratos sem formação de espuma, o que evidencia a eliminação da maior parte dos tensoativos, e por isso as amostras foram injetadas no sistema SPE-UPLC-MS/MS. De acordo com Chanwirat (2012), a quantificação da NDELA é realizada no eluato 2. Entretanto, nesse eluato não foi verificada a presença da NDELA, enquanto no eluato 1, uma recuperação de NDELA abaixo do LOQ foi estimada. Avaliando o efeito matriz, para essa amostra (E), através da fortificação do extrato com NDELA no nível de 15 ng g⁻¹, foi verificada a supressão do sinal em 39%. Nessa etapa não foram avaliadas a presença das demais N-nitrosaminas, uma vez que o objetivo principal foi avaliar a capacidade de eliminação dos tensoativos. Além disso, o método proposto por Chanwirat (2012) é usado apenas para determinação da NDELA.

Visto que o preparo de amostra, utilizando o sorbente C18 como fase sorbente, mostrou ser o mais promissor, o método foi avaliado com mais detalhe. Para isso, foram estudadas novas porções de eluatos e quantidades de sorbente, seguindo o preparo de amostra mostrado na Figura 8 do item 3.9.5.

A primeira avaliação consistiu em verificar em qual eluato era possível obter a maior recuperação dos analitos, através da análise da intensidade do sinal nos cromatogramas. Para tanto, dois parâmetros foram variados e avaliados: quantidade de volume a ser descartado (eluato 1) e quantidade de sorbente C18 (0,5 g, 1,0 g e 1,5 g). Para a análise da quantidade de volume que deveria ser removido do cartucho, foram avaliados dois volumes: 1 mL e 2 mL. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19: Valor médio da área do pico (n= 3) para cada N-nitrosamina, de acordo com o eluato e a quantidade de sorbente utilizado para um volume de eluato 1 de 1 mL, fortificado com N-nitrosaminas no nível de 200 ng g⁻¹.

Volume eluato 1: 1 mL		N-Nitrosaminas					
		NDELA	NMOR	NPIP	NDBA	NPYR	NDPLA
0,5 g de C18	Eluato 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Eluato 2	29185	20264	ND	ND	ND	ND
	Eluato 3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1,0 g de C18	Eluato 1	ND	ND	1739	ND	ND	ND
	Eluato 2	40819	ND	ND	ND	ND	ND
	Eluato 3	2691	23002	76394	ND	ND	ND
1,5 g de C18	Eluato 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Eluato 2	37969	ND	ND	ND	ND	ND
	Eluato 3	2435	64922	56961	ND	ND	ND

Legenda: NA: não analisado; ND: não detectado.

Tabela 20: Valor médio da área do pico (n=3) para cada N-nitrosamina, de acordo com o eluato e a quantidade de sorbente utilizado para um volume de eluato 1 de 2 mL, fortificado no nível de 200 ng g⁻¹.

Volume eluato 1: 2 mL		N-Nitrosaminas					
		NDELA	NMOR	NPIP	NDBA	NPYR	NDPLA
0,5 g de C18	Eluato 1	10405	ND	ND	ND	ND	ND
	Eluato 2	29438	18523	ND	ND	ND	ND
	Eluato 3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1,0 g de C18	Eluato 1	4396	ND	ND	ND	ND	ND
	Eluato 2	47572	1253	ND	2459	ND	ND
	Eluato 3	1856	28491	129905	2267	ND	ND
1,5 g de C18	Eluato 1	ND	ND	2288	ND	ND	ND
	Eluato 2	51802	16459	569	4410	ND	ND
	Eluato 3	3614	51385	91454	1013	ND	ND

Legenda: NA: não analisado.

- **0,5 g de sorbente C18:** Os dados para essa quantidade de sorbente mostraram que recolhendo tanto 1 mL quanto 2 mL do eluato 1 a NDELA e a NMOR são recuperadas no eluato 2, apresentando resposta instrumental com mesma ordem de grandeza. O eluato 1 foi injetado para verificar se havia perda dos analitos. Foi constatado que há perda da NDELA quando recolhido um volume maior de eluato 1. O eluato 3 não foi injetado no sistema, pois apresentou formação de espuma. Isso pode ser explicado pela quantidade insuficiente de fase C18, o que impossibilita a retenção dos surfactantes presentes em grande quantidade na amostra. Utilizando essa quantidade de sorbente não foi possível recuperar os analitos mais apolares, uma vez que era esperado que esses fossem eluídos no eluato 3.

- **1,0 g de sorbente C18:** Os dados para o dobro de quantidade de fase C18 utilizado inicialmente, confirmaram que a NDELA é recuperada no eluato 2, apresentando mesma ordem de grandeza, tanto para 1 mL quanto para 2 mL de volume do eluato 1 recolhido. Com o uso dessa quantidade de sorbente a resposta em área do pico aumentou aproximadamente 15000 para a NDELA. A NMOR foi recuperada no eluato 3, não apresentando um aumento significativo do sinal. Utilizando 1,0 g de fase C18 foi possível recuperar a NPIP, no eluato 3. A afinidade desse composto pela fase C18, devido ao seu caráter apolar, resulta numa maior interação, tendo sido necessário um solvente mais forte para sua eluição da coluna. A NDBA apresentou picos intensos fora do tempo de retenção, nos eluatos 2 e 3, não permitindo, desta forma, a confirmação de sua presença. A não recuperação das N-nitrosaminas mais apolares pode ser explicada pela força do solvente de eluição. Para a eluição dos analitos mais fortemente retidos na coluna é necessário o uso de solvente mais apolar (forte). No entanto, isso poderia fazer com que os interferentes mais fortemente retidos na coluna, também fossem eluídos, causando a co-eluição de componentes da matriz capazes de suprimir o sinal dos analitos, em especial os tensoativos. Não foi observado perda significativa dos analitos, nos eluatos 1.

- **1,5 g de sorbente C18:** O aumento da quantidade de fase C18 possibilitou o incremento da resposta em área da NDELA, no eluato 2, quando recolhido 2 mL de eluato 1. Esse aumento não foi observado quando recolhido 1 mL do eluato 1.

A área do pico da NMOR aumentou em aproximadamente três vezes, no eluato 3, com o uso dessa quantidade de sorbente, sendo que esse aumento foi mais acentuado com a coleta de 1 mL de eluato 1. O aumento da resposta pode ser explicado pela maior retenção dos interferentes, diminuindo o efeito matriz. Esse efeito pode prejudicar a eficiência de ionização dos analitos, devido a quantidade de íons provenientes da matriz que são introduzidos na fonte, diminuindo a sensibilidade do método. Além disso, os componentes da matriz podem distorcer o pico cromatográfico, pois competem com os analitos pelos sítios ativos da fase estacionária, causando alargamento do pico e mudança no tempo de retenção. O analito NPIP apresentou um decréscimo na resposta do instrumento, enquanto a NDBA apresentou picos fora do tempo de retenção, não sendo possível, portanto, confirmar sua identidade. Mesmo utilizando quantidade maior de sorbente não foi possível recuperar os analitos mais apolares, NPYR e NDPLA. Essas N-nitrosaminas competem com os interferentes por sítios da fase C18, o que pode diminuir a concentração dos analitos. Para a eluição desses compostos seria necessário usar um solvente de eluição mais forte, em razão de sua maior afinidade pela fase C18. No entanto, isso poderia causar a co-eluição de interferentes retidos na coluna. Ensaio exploratórios mostraram que o uso de um solvente de eluição mais forte (água:acetonitrila, 90:10, v/v) faz com que os surfactantes sejam eluídos, causando a formação de espuma no eluato 3. Para evitar a contaminação do equipamento foi estabelecido o uso da solução (água:acetonitrila, 95:5, v/v). Não foi observado uma perda representativa dos analitos no eluato 1.

Os resultados mostraram que a NDELA possui maior recuperação no eluato 2, enquanto a NMOR e a NPIP são recuperadas no eluato 3. As demais N-nitrosaminas não foram recuperadas utilizando o método de preparo abordado. Portanto, foi estabelecido que a quantificação da NDELA deve ser feita no eluato 2 e dos demais analitos no eluato 3.

Para a NDELA e a NMOR foi verificado que o uso de 1,5 g de sorbente fornece sinais mais intensos, ou seja, uma melhor eficiência de extração foi alcançada. A recuperação da NPIP foi maior quando utilizado 1,0 g de sorbente. Entretanto, foi estabelecido 1,5 g de fase C18 para a extração, com o objetivo de alcançar um maior *clean up*. A quantidade de volume do eluato 1 a ser desprezado foi avaliado e constatou-se que removendo 2 mL de eluato 1, é possível obter sinais maiores e com

menor dispersão para a NDELA e a NPIP. Sinais mais intensos para a NMOR foram obtidos com volume do eluato 1 de 1 mL. Os gráficos da Figura 16 mostram os resultados obtidos para as áreas dos picos dos analitos em função do volume de eluato 1 e de quantidade de sorbente.

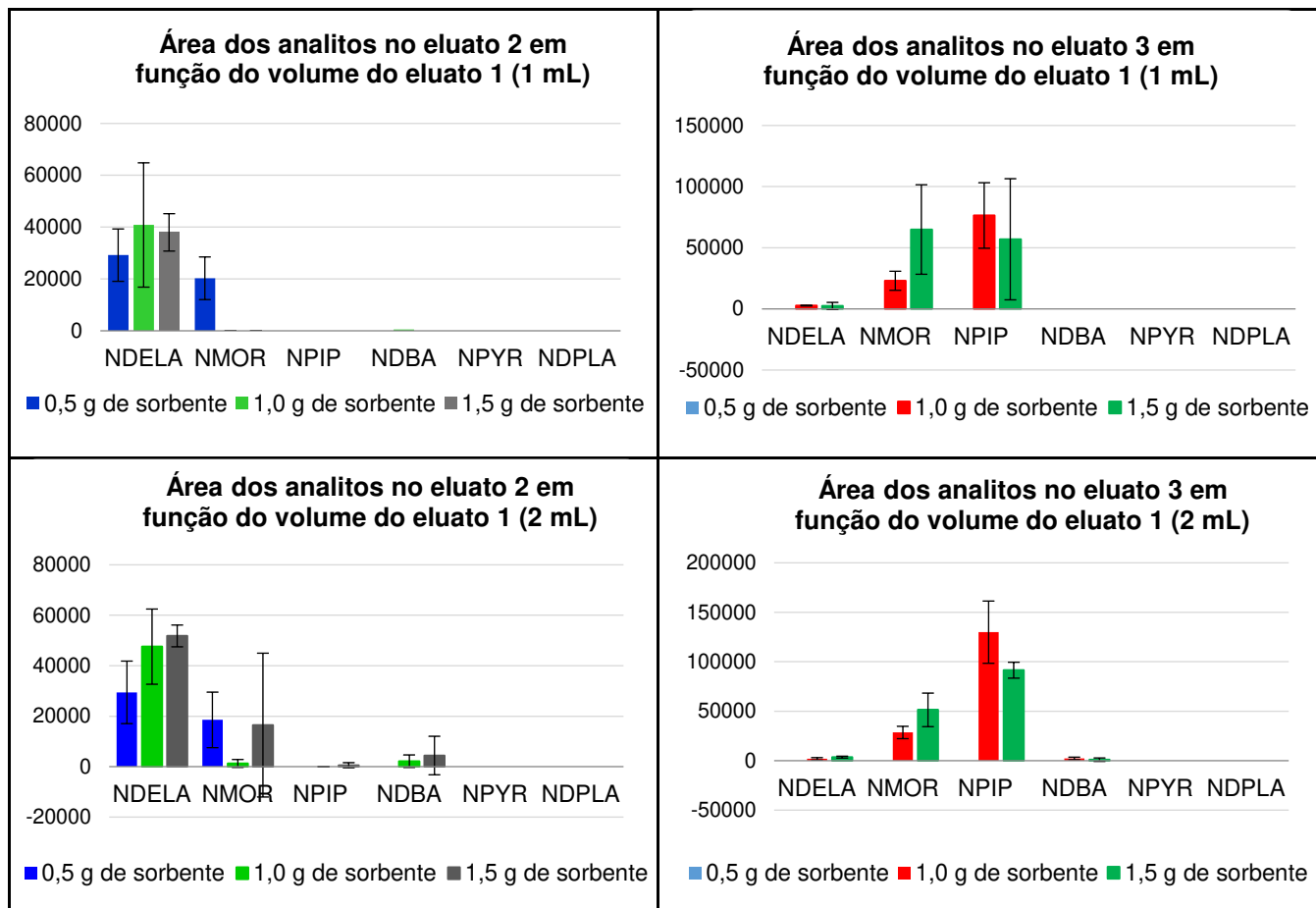


Figura 15: Área dos analitos em função da quantidade de sorbente, volume de eluato 1 e eluato 2 e 3.

O princípio do preparo de amostras desenvolvido para a NDELA está em concentrar os interferentes enquanto o analito é percolado pelo cartucho, ou seja, ocorre a adsorção da matriz na fase C18. Esse modo foi escolhido devido à pouca afinidade da molécula pela fase estacionária. Sendo assim, a técnica proposta consiste na limpeza utilizando SPE *off-line* e posterior concentração da NDELA utilizando SPE *on-line*.

A maioria dos *shampoos* possui em sua composição, os surfactantes lauril sulfato de sódio (Figura 17) e/ou lauril éter sulfato de sódio (Figura 18). Ambos tensoativos aniônicos que possuem a parte hidrofílica carregada negativamente.

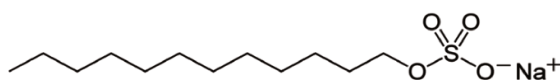


Figura 16: Lauril sulfato de sódio

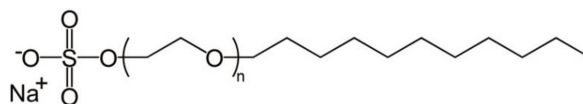


Figura 17: Lauril éter sulfato de sódio

Os resultados obtidos mostraram que com uma quantidade maior de fase estacionária é possível obter maior recuperação para a NDELA, isso pode ser justificado pela maior retenção de concomitantes que aumentam o efeito matriz. Tendo em vista que o método proposto se baseou no princípio da extração em fase reversa de compostos apolares à moderadamente polares, que é o caso dos tensoativos aniônicos, foi possível concluir que a retenção dos tensoativos é mais eficaz com o uso de maior quantidade de fase C18. A interação da cadeia hidrofóbica dos tensoativos com a cadeia C18 se mostrou eficaz na remoção desses compostos. A Figura 19 mostra a possível interação entre a cadeia C18 e o tensoativo lauril éter sulfato de sódio por forças do tipo Van der Waals.

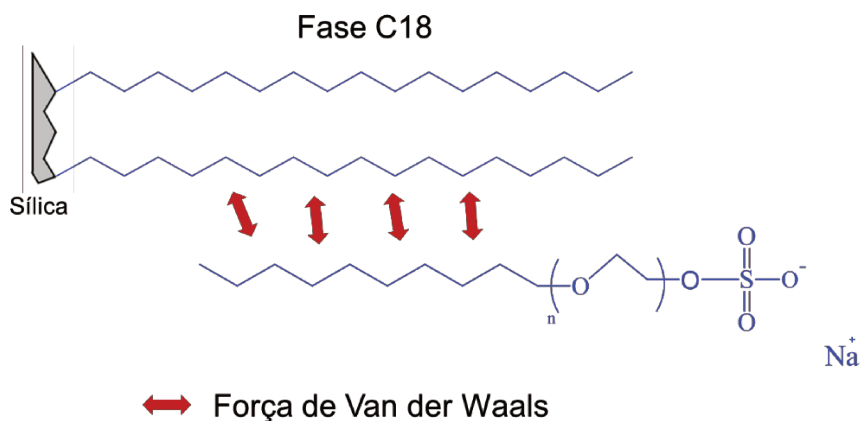


Figura 18: Interação entre a fase estacionária C18 e o tensoativo lauril éter sulfato de sódio. Fonte: figura adaptada de (MAJORS, 2013)

Com o objetivo de verificar se seria possível realizar uma menor diluição da amostra, o mesmo preparo mostrado na Figura 8 foi realizado, alterando a diluição no tubo Falcon e o volume do eluato 2 para 5 mL. Nesse procedimento, 1,0 g da amostra

foi fortificada com 100 ng g^{-1} . A Figura 20 mostra os resultados obtidos para a NDELA, uma vez que esse analito é o único recuperado no eluato 2.

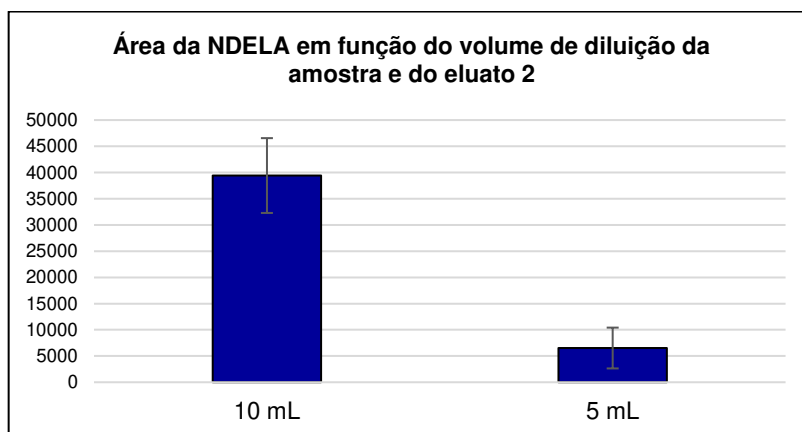


Figura 19: Área da NDELA em função do volume de diluição da amostra e do eluato 2.

Usando uma menor diluição da amostra houve menor recuperação do analito. Isso pode ser explicado pela menor diluição dos componentes da matriz, resultando na co-eluição de compostos que suprimem o sinal da NDELA (efeito matriz). Sendo assim, foi mantido a diluição da amostra em, aproximadamente, 10 vezes.

Após definir a quantidade de sorbente, foi investigado o uso de quantidade menor de amostra, 0,5 g, fortificando-a com 200 ng de padrão de N-nitrosaminas. A Figura 21 mostra os resultados obtidos.

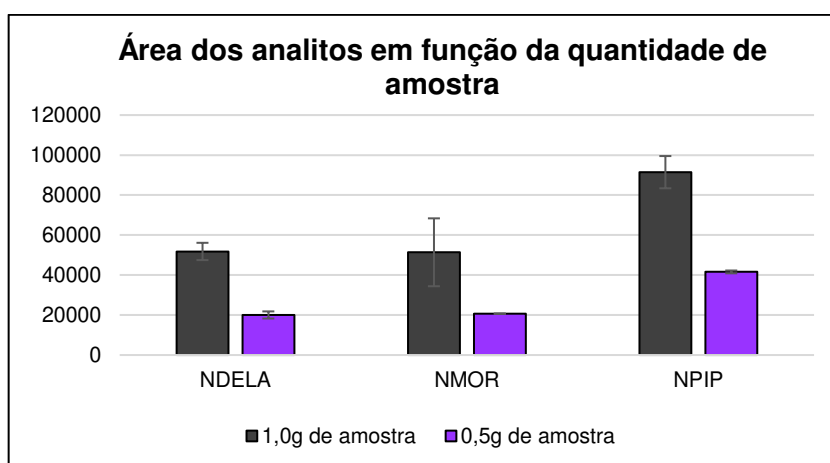


Figura 20: Área dos analitos em função da quantidade de amostra “E” fortificada com 200 ng de padrão: 1,0 g (200 ng g^{-1}) e 0,5 g (400 ng g^{-1}).

Os resultados mostraram que o uso de quantidade menor de amostra produz desvios menores, no entanto, aumentaria o valor do LOQ. Além disso, usando

0,5 g de amostra obteve-se uma menor eficiência de extração do analito. No entanto, era esperado que, usando menor quantidade de amostra, haveria maior recuperação do analito, devido a menor quantidade de compostos que aumentam o efeito matriz provenientes da amostra. Com base nesses resultados foi selecionado 1,0 g de amostra.

4.3. Seleção das amostras

Um dos objetivos do trabalho foi fazer um levantamento de formulações no mercado e, pela composição descrita no rótulo, avaliar a presença de amins com potencial de serem nitrosadas.

Em pesquisa realizada no site da Anvisa foram encontradas 211 formulações de *shampoo* para uso infantil registrados. Já na pesquisa realizada nos mercados da cidade de Campinas – SP foram verificadas, aproximadamente, 30 formulações diferentes. Foram selecionadas doze amostras, sendo uma delas, importada. Essas amostras apresentam em seu rótulo, no item “composição”, substâncias precursoras na formação de N-nitrosaminas, conforme mostra a Tabela 5 do item 3.5. A composição completa das doze amostras está descrito no Anexo III.

4.4. Estudo das matrizes selecionadas

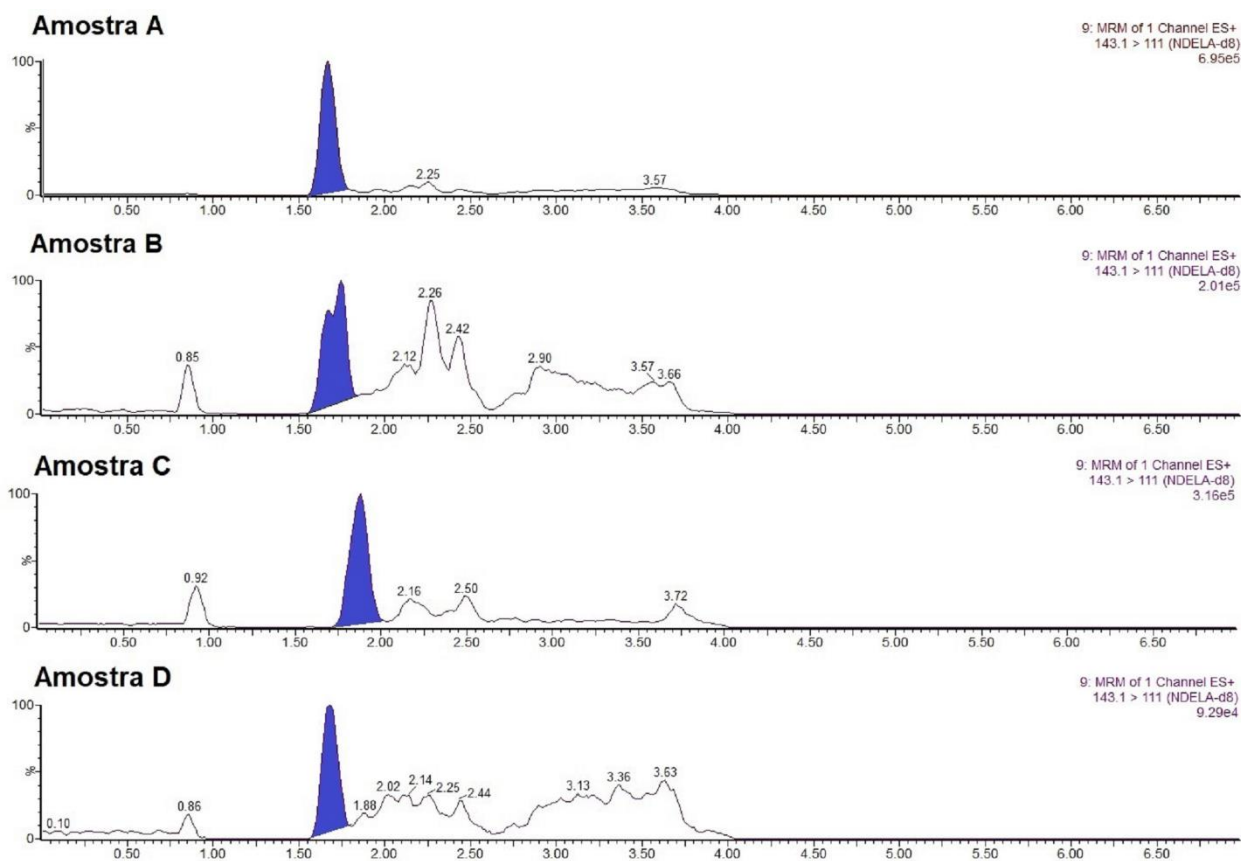
Devido à diferença na composição das matrizes, foi realizado um estudo para avaliar a aplicabilidade do preparo de amostras desenvolvido para as amostras selecionadas. Além disso, para a validação do método foi necessário selecionar uma amostra que pudesse ser usada como matriz branca para a determinação da NDELA.

As amostras foram analisadas utilizando o preparo de amostras descrito no item 3.9.5. Os resultados mostraram que cada matriz possui um comportamento diferente quando submetido ao método de preparo de amostra desenvolvido, indicando a complexidade e a diferença entre elas. Enquanto algumas amostras foram facilmente percoladas pelo cartucho, outras, mesmo sob vácuo, apresentaram resistência ao passar pela fase sorbente, tornando difícil a coleta dos eluatos. O *shampoo* importado (amostra L) teve que ser submetido a um processo adicional no preparo da amostra antes de ser percolado pelo cartucho: 10 minutos em banho ultrassônico e centrifugação a 4226 g por 15 minutos.

Extratos de duas outras amostras (amostra F e J) não puderam ser injetados, devido à formação de espuma na solução final, indicando que esse

procedimento não foi eficaz na eliminação dos tensoativos presentes nessas amostras.

Inicialmente as amostras foram fortificadas com 100 ng g^{-1} de *surrogate* como padrão interno. Os resultados para as nove amostras analisadas permitiram verificar a diferença entre as matrizes em relação ao pico da NDELA-d₈. Algumas amostras apresentaram sinais mais intensos para o *surrogate*, enquanto outras apresentaram picos deformados e com menor intensidade evidenciando novamente o efeito matriz. Os picos do *surrogate* para as amostras fortificadas no nível de 100 ng g^{-1} são mostrados nos cromatogramas apresentados na Figura 22.



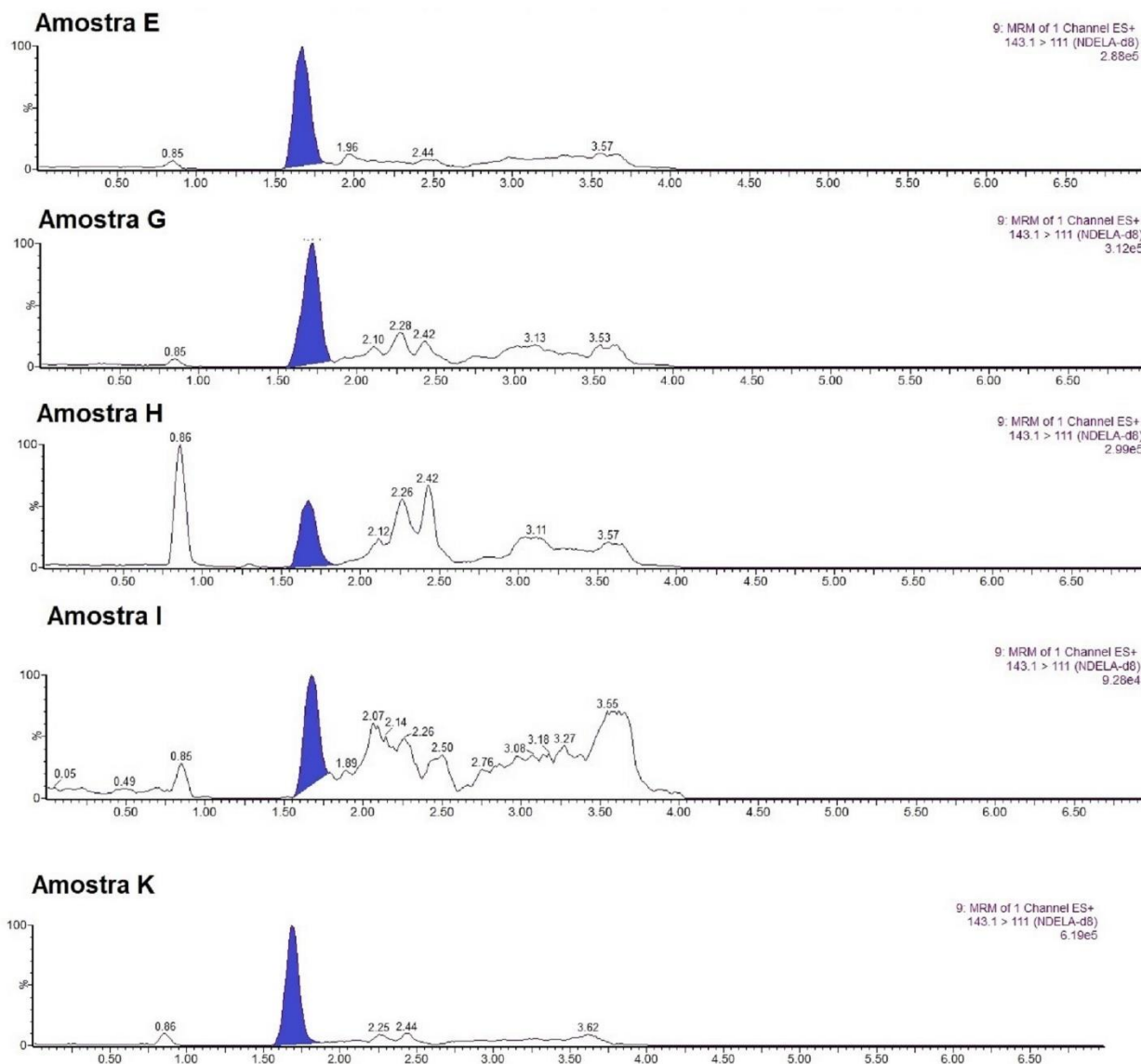


Figura 21: Cromatograma SRM de nove amostras fortificadas com NDELA-d₈ no nível de 100 ng g⁻¹. O preparo das amostras seguiu o descrito no item 3.9.5, usando cartucho SPE C18. Condições do SPE *on line*: coluna de SPE Oasis HLB, 100% H₂O como solvente de carregamento, tempo de carregamento de 0,27 min, volume de injeção 200 µL, vazão da BQ: 0,870 mL min⁻¹. Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,27 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: 0,3 mL min⁻¹. Temperatura da coluna: 40 °C; temperatura do *sample manager*: 10 °C.

A Tabela 21 apresenta os valores da resposta em área do pico para a NDELA-d₈, fortificada no nível de 100 ng g⁻¹ para cada amostra de shampoo analisada.

O efeito matriz foi avaliado pela área da NDELA-d₈, sendo que a matriz da amostra “D” apresentou a maior supressão de sinal. A supressão na ionização pode ser justificada pela competição entre analito e componente da matriz na fonte ESI. A amostra que apresentou maior resposta para o *surrogate* foi a amostra “A”, o que

indica que o preparo de amostra foi eficiente nas etapas de concentração e *clean-up* para esse *shampoo*. Sendo assim, o *surrogate* é afetado fortemente pela matriz e seria necessário o estabelecimento de uma concentração adequada a ser usada com a finalidade de padronização interna para cada amostra independente.

A princípio o LOQ almejado para a NDELA era 10 ng g^{-1} e por isso foi feito o estudo com um nível de fortificação menor para a NDELA- d_8 , utilizando a amostra “E”. Para isso, a matriz foi fortificada com 50 ng g^{-1} de *surrogate*. A Figura 23, mostra o cromatograma da amostra avaliada.

15_03 elu 2_50ppb

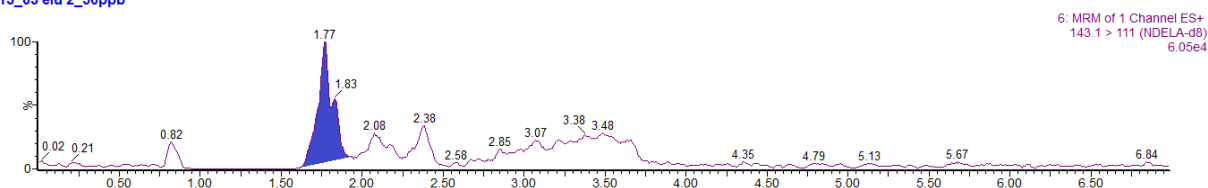


Figura 22: Cromatograma SRM da amostra “E” fortificadas com NDELA- d_8 no nível de 50 ng g^{-1} . O preparo das amostras seguiu o descrito no item 3.9.5, usando cartucho SPE C18. Condições do SPE *on line*: coluna de SPE Oasis HLB, 100% H_2O como solvente de carregamento, tempo de carregamento de 0,27 min, volume de injeção $200 \mu\text{L}$, vazão da BQ: $0,870 \text{ mL min}^{-1}$. Gradiente de eluição da BB (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,27 min (80:20), 1,0 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20); vazão da BB: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Temperatura da coluna: $40 \text{ }^\circ\text{C}$; temperatura do *sample manager*: $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

A resposta em área do pico foi de 6032, valor quase seis vezes menor do que a resposta obtida com a fortificação de 100 ng g^{-1} , o que corresponde a uma perda significativa na resposta instrumental. As amostras “B”, “D”, “H” e “I” mostraram picos distorcidos e baixa resposta instrumental para a fortificação com 100 ng g^{-1} de *surrogate*, o que indica que uma fortificação em nível maior deva ser realizada. Portanto, essas amostras não poderiam, a princípio, serem analisadas pelo método desenvolvido. Para as demais amostras, a concentração de 100 ng g^{-1} do *surrogate* seria adequada.

É importante destacar que uma vez que a quantificação da NDELA seria realizada pelo uso do *surrogate* como padrão interno, a curva analítica para a quantificação da NDELA poderia ser realizada por uma curva analítica construída no solvente. Entretanto, o LOQ pode variar de amostra para amostra e precisou ser estimado para cada uma, separadamente.

Sendo assim, as amostras foram fortificadas com 10 ng g^{-1} , em triplicata, usando a curva no solvente para a quantificação e o *surrogate* na concentração de 100 ng g^{-1} . As amostras “C” e “K” foram fortificadas em um nível um pouco maior, 15

ng g⁻¹, pois foi detectado a presença de NDELA. A amostra “I” não foi avaliada, pois o preparo de amostras não foi adequado. A fortificação das amostras com NDELA tinha como objetivo avaliar a exatidão dos resultados, a partir da recuperação dos analitos.

A Tabela 21 mostra as respostas para as amostras fortificadas. Os cromatogramas das amostras fortificadas estão no Anexo IV.

Tabela 21: Valores das respostas em área do pico da NDELA e do padrão interno para as amostras fortificadas.

Amostra	Nível de fortificação (NDELA)	Área da NDELA	Área da NDELA-d ₈ (100 ng g ⁻¹)	Recuperação (média, n=3) (%)
A	10 ng g ⁻¹	6238	67723	114
B	10 ng g ⁻¹	7574	22694	336
C	15 ng g ⁻¹	15409	23514	104
D	10 ng g ⁻¹	2138	8070	270
E	10 ng g ⁻¹	5698	35711	146
G	10 ng g ⁻¹	12540	30889	443
H	10 ng g ⁻¹	2737	16625	150
K	15 ng g ⁻¹	10068	51257	155

A recuperação da NDELA foi avaliada pelo valor percentual do analito usando a equação da curva analítica no solvente (padronização interna).

Pelos resultados obtidos (n=3) a recuperação variou de 104% a 443%. As amostras “A”, “C”, “E”, “H” e “K” apresentaram valores de exatidão ≤ 155%, valores aceitáveis levando em consideração a complexidade da matriz e o nível da fortificação. No entanto, as amostras “B”, “D” e “G”, apresentaram valores de recuperação, significativamente maiores do que 155%. Esses valores altos indicam que o procedimento de preparo de amostras não é adequado para essas matrizes, ou até mesmo que um incremento do sinal é provocado pelos interferentes da matriz. Sendo assim, essas amostras não poderiam ser analisadas pelo método desenvolvido. A amostra H, embora tenha apresentado uma recuperação de 150%, apresentou uma área muito pequena tanto para a NDELA como NDELA-d₈ o que evidencia um elevado efeito matriz e por esse motivo também foi considerado que teria que ser desenvolvido um outro preparo de amostra para contornar esse problema.

Sendo, assim, de todas as amostras selecionadas, apenas as amostras A,C, E e K poderiam ser analisadas pelo método desenvolvido.

Com base nos resultados obtidos, foram estimados para as amostras A, C, E e K os valores de LOQ e LOD (Tabela 22). A concentração do *surrogate* foi fixada em 100 ng g⁻¹. Para fins práticos, foi estabelecido o LOQ em 10 ng g⁻¹ e o LOD de 3 ng g⁻¹ para as quatro amostras em questão.

Tabela 22: Valores de LOQ e LOD estimados para cada amostra de *shampoo*.

Amostra	LOQ (NDELA)	LOD (NDELA)
A	10 ng g ⁻¹	3 ng g ⁻¹
C	10 ng g ⁻¹	3 ng g ⁻¹
E	5 ng g ⁻¹	2 ng g ⁻¹
K	10 ng g ⁻¹	3 ng g ⁻¹

Vale ressaltar que o menor LOQ reportado na literatura para a NDELA em cosméticos, utilizando a técnica UHPLC-MS/MS, foi de 20 ng g⁻¹ (JOO *et al.*, 2015).

Por fim, através das fortificações realizadas, tanto com NDELA quanto com o *surrogate*, foi possível avaliar a amostra que poderia ser usada na validação. É importante enfatizar que devido a diferença na composição das matrizes, não foi possível selecionar uma matriz branca representativa para todas as amostras. Para a seleção da amostra que seria utilizada na validação foi feita uma comparação do cromatograma da matriz isenta de NDELA com a matriz fortificada (10 ng g⁻¹), tendo sido escolhida aquela que apresentou menor interferência ao longo do intervalo do pico de interesse, e que apresentou a maior resposta para o *surrogate* no nível de fortificação de 100 ng g⁻¹. A Figura 24 mostra os cromatogramas da amostra “A” selecionada para a validação.

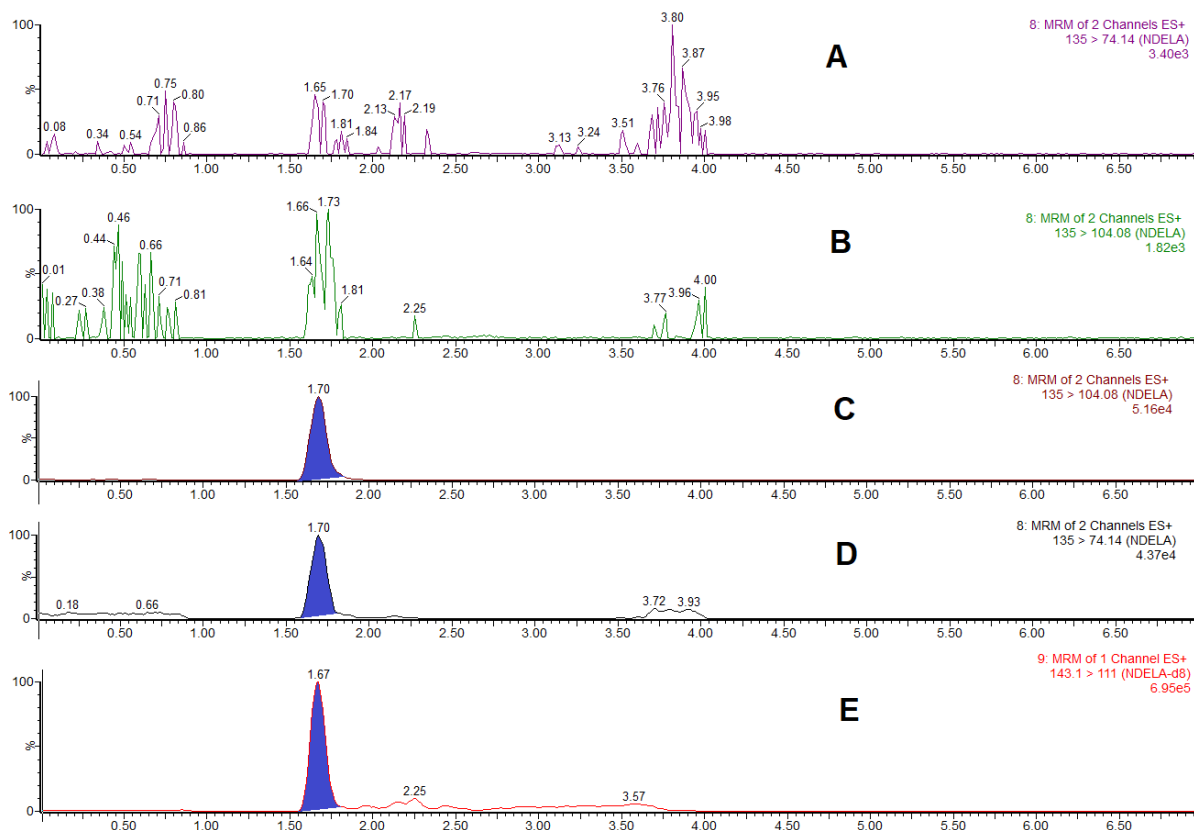


Figura 23: Cromatogramas da análise da amostra "A". Cromatogramas A e B: transições de confirmação e quantificação, respectivamente, da NDELA para a amostra não fortificada. Cromatogramas C e D: transições de confirmação e quantificação, respectivamente, da NDELA para a amostra fortificada com 10 ng g⁻¹ da solução padrão. Cromatograma E: pico do padrão interno (*surrogate*) adicionado no nível de 100 ng g⁻¹.

4.5. Validação do método

Após o desenvolvimento do método SPE-UHPLC-MS/MS para determinação e quantificação da NDELA, foi realizada a avaliação dos seguintes parâmetros de validação: faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra- e inter-ensaio e exatidão. A validação foi feita apenas para a NDELA, uma vez que a ausência de uma matriz branca representativa, impossibilita a quantificação do analito sem o uso do *surrogate* (padrão isotopicamente marcado).

4.5.1. Faixa linear e linearidade

Com o uso do *surrogate* da NDELA, a faixa linear e a linearidade puderam ser avaliadas por meio de curvas analíticas por padronização interna construídas no solvente. Cada nível de concentração, seis ao total (1,0 – 2,0 – 5,0 – 10,0 – 15,0 –

20,0 ng mL⁻¹), foi preparado em triplicata independente. A NDELA-d₈ foi usada como *padrão interno* na concentração de 10,0 ng mL⁻¹.

As curvas analíticas foram construídas plotando as razões das áreas dos picos da NDELA e da NDELA-d₈ em função da concentração do analito (ng mL⁻¹). A Figura 25, mostra os gráficos da curva analítica no solvente e dos resíduos, construídos para a NDELA.

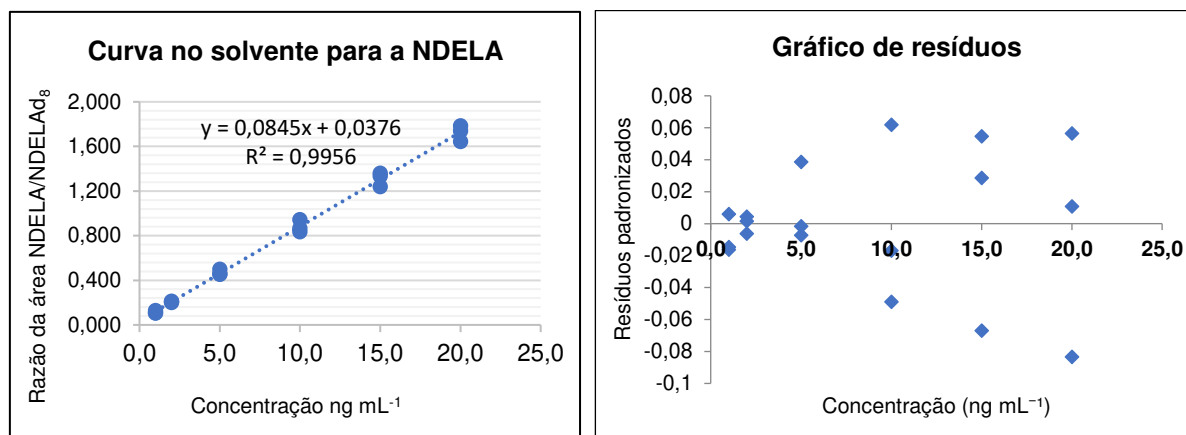


Figura 24: Curva analítica para a NDELA no solvente (1 a 20 ng mL⁻¹) com adição de padrão interno NDELA-d₈ na concentração de 10 ng mL⁻¹.

A significância do coeficiente angular foi avaliada aplicando um teste t. O resultado mostrou que o valor de b é estatisticamente diferente de zero, estando dentro do critério de aceitação.

A Tabela 24 apresenta os parâmetros estatísticos para a curva analítica no solvente. A possível presença de *outliers* foi avaliado pelo teste dos resíduos padronizados de Jackknife e a homocedasticidade das variâncias confirmadas pelo teste de Levene.

Tabela 23: Parâmetros estatísticos para a curva analítica no solvente.

Curva no Solvente		
	Coeficientes	Variância
Coeficiente linear (a)	0,0376	0,0158
Coeficiente Angular (b)	0,0845	0,0014
R ²	0,9954	0,9956
r	0,9977	0,9978
S _{res} (Variância do resíduo)	0,0412	
Equação da regressão linear (método dos mínimos quadrados ordinários)	y = 0,0845x + 0,0376	
Número de <i>outliers</i>	0	

O coeficiente de determinação (R²) mostrou bom ajuste do modelo, com regressão explicando 99,54% da variação total em torno da média. O valor do coeficiente de correlação linear (r) indica uma alta correlação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo ajustado. Considerando que para as curvas não houve falta de ajuste, tomou-se o S_{residual} como uma medida representativa do erro experimental. Sendo assim, foi calculado, com 95% de confiança, uma faixa na qual os valores que estivessem fora, seriam considerados anômalos (*outliers*) e por isso excluídos. Aplicando esse método nenhum valor experimental apresentou ser um dado anômalo.

O gráfico de resíduos indica uma distribuição aleatória destes em função da concentração, no entanto, com um leve incremento para concentrações maiores.

O teste de *Levene* foi feito para comprovar a homocedasticidade da variância dos resíduos. Esse teste permite verificar se a variância dos erros é constante ao longo da faixa de trabalho. O valor obtido de t_L , 0,3142, é menor do que $t_{(n1+n2-2)}$, 2,1199, para o nível de confiança de 95%, indicando a homocedasticidade das respostas observadas e, em consequência, a aplicabilidade de ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

4.5.2. Limite de detecção e quantificação

O limite de quantificação para a amostra "A" foi de 10 ng g⁻¹, tendo sido estabelecido através do método instrumental razão sinal/ruído de 10:1. O LOD para essa amostra foi estimado como sendo de 3 ng g⁻¹. Para todas as amostras esses limites tiveram que ser avaliados de forma independente, conforme já discutido anteriormente.

4.5.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada pela análise da amostra “A” fortificada no nível do LOQ, 10 ng g⁻¹ e expressa pela estimativa do desvio padrão relativo. A precisão intra-dia (realizada no mesmo dia, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista) foi realizada em triplicata (n=3) e a precisão inter-dia (dias diferentes, no mesmo equipamento e mesmo analista) foi realizada em três dias alternados em triplicata (n= 9).

Para o ensaio de repetitividade o coeficiente de variação (CV) intralaboratorial foi calculado usando a equação de *Horwitz*. Para uma concentração de 10 ng g⁻¹, a equação de Horwitz preconiza um CV aceitável de 32%. Esse valor pressupõe que as análises sejam realizadas em laboratórios diferentes. Sendo assim, como as análises foram realizadas no mesmo laboratório usou-se como critério de aceitação 2/3 do valor calculado pela equação de Horwitz. Esse valor representa um CV aceitável de 21,3%, o que é apropriado ao objetivo deste trabalho.

A Tabela 25 apresenta os valores para os ensaios de precisão.

Tabela 24: Valores do ensaio de precisão realizado com a amostra “A”, fortificada no nível de 10 ng g⁻¹.

Replicata	Resposta (Área da NDELA/Área do <i>surrogate</i>)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	0,080	0,11	0,10
2	0,11	0,090	0,12
3	0,080	0,12	0,11
Média	0,090	0,11	0,11
s (desvio padrão)	0,017	0,015	0,010
CV (%)	19,2	14,3	9,09
CV (%) inter-dia	15,3		

O método possui precisão adequada aos objetivos que se propõe, pois todos os CV (RSD) encontrados são menores que 21,3%, conforme mostra a Tabela 25. A precisão intra-dia ficou na faixa de 9,09 a 19,2 % e a precisão inter-dia foi de 15,3 % (n=9).

4.5.4. Exatidão

A exatidão foi expressa pelo valor percentual da recuperação do analito de concentração conhecida adicionada à amostra “A” fortificada no nível do LOQ, 10 ng

g⁻¹. As análises foram feitas em triplicata (n=3) e os analitos foram quantificados através da equação da curva analítica no solvente, usando padronização interna com *surrogate*.

O valor médio da exatidão, calculado em termos de recuperação, para a amostra “A” fortificada com 10 ng g⁻¹ foi de 114% (estimativa do desvio padrão relativo de 18,3 %), sendo este um valor aceitável para o método proposto, considerando a complexidade da matriz e o nível de fortificação.

Com base nos resultados da validação, o método desenvolvido foi considerado adequado para a amostra validada e para o nível de quantificação (ng g⁻¹). É importante salientar, que devido a diferença entre a composição das matrizes, seria necessário que cada amostra fosse avaliada, individualmente, considerando o limite de quantificação de cada uma.

4.6. Análise das amostras

Para a análise das amostras foi utilizado o procedimento descrito no item 3.9.5. A quantificação foi realizada por padronização interna (uso de *surrogate*) com a curva no solvente. Ainda foi construída uma curva analítica pela fortificação da amostra “E”, na qual não foi detectada a presença de NDELA, para fins de comparação, em especial do efeito matriz. As duas curvas com os respectivos gráficos de resíduos são apresentadas nas Figuras 26 e 27. A curva construída na matriz da amostra, expressa em ng g⁻¹, seria o correspondente a curva no solvente, após o preparo de amostra, considerando uma diluição de 10 vezes. É possível verificar que as duas curvas apresentam coeficientes angulares concordantes e corroboram que a quantificação pode ser realizada pela curva no solvente. Esse procedimento foi considerado mais adequado, considerando que a matriz da amostra varia de fabricante para fabricante e a amostra A não poderia ser considerada representativa de todas as demais.

Para verificar se os coeficientes angulares são estatisticamente iguais, foi aplicado o teste t pareado. Primeiramente, foi feito o teste F para verificar se existe ou não diferença significativa entre as variâncias das duas inclinações, utilizando a Equação 10.

$$F_{b,calc} = \frac{s_{b1}^2}{s_{b2}^2} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde: s_{b1}^2 e s_{b2}^2 são as variâncias das inclinações das curvas na matriz e no solvente com a maior variância no numerador.

Como o $F_{\text{calculado}}$ (0,91) foi menor do que o $F_{(0,05;10,5)}$ crítico (4,74) conclui-se que não existe diferença significativa entre as variâncias das duas curvas analíticas. Em seguida foi aplicado, no conjunto de dados, o teste t pareado para comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas no solvente e na matriz. Como hipótese nula foi formulada que os coeficientes angulares das duas curvas são iguais ao nível de significância de 0,05 e como hipótese alternativa que as duas inclinações são diferentes.

Como o valor de t calculado (0,298) foi menor do que o $t_{(0,05; 15)}$ crítico, conclui-se que a hipótese nula pode ser aceita, ou seja, não existe diferença significativa entre a inclinação das duas curvas analíticas.

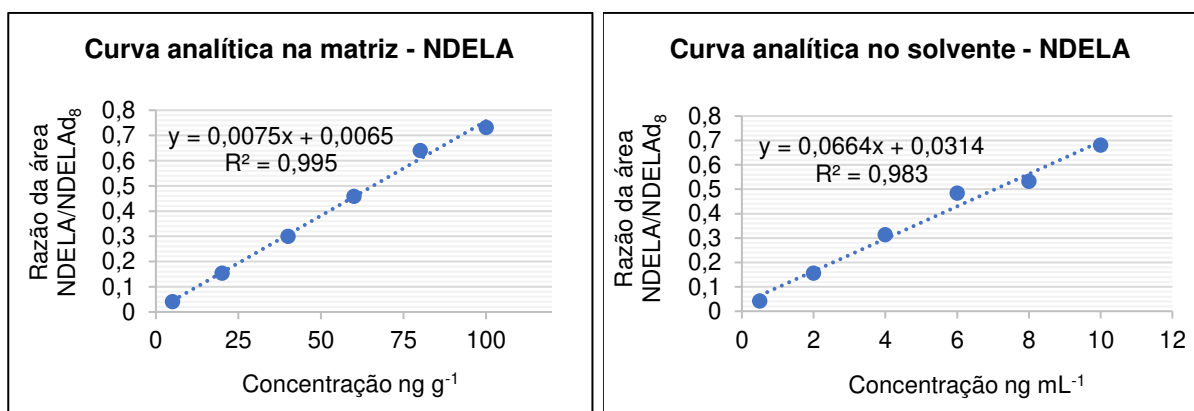


Figura 25: Curva analítica no solvente (0,5 a 10 ng mL⁻¹) e na matriz “E” (5 a 100 ng g⁻¹). Padrão interno (*surrogate*) em 10 ng mL⁻¹ na curva no solvente e 100 ng g⁻¹ na curva na matriz.

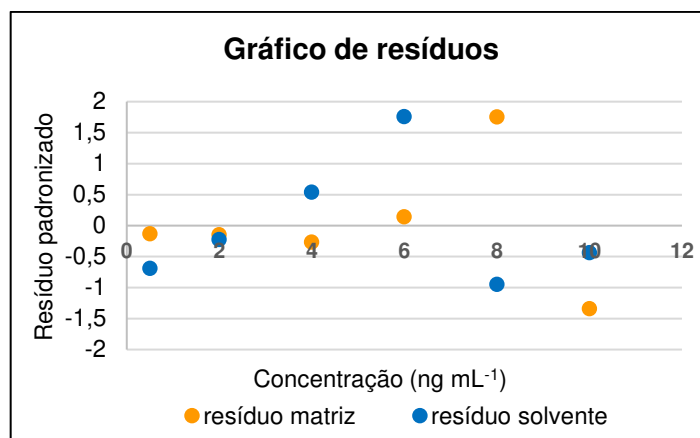


Figura 26: Gráfico de resíduos para a curva no solvente e na matriz branca.

A Tabela 26 mostra as concentrações de NDELA determinados nas quatro amostras analisadas, utilizando o método desenvolvido. Todas as análises foram realizadas em triplicata ($n=3$). A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, fortificando as amostras com NDELA anterior ao preparo de amostras.

Tabela 25: Resultado das análises de *shampoo*. Concentração média ($n=3$) de NDELA com as respectivas estimativas dos desvios padrão relativos (RSD) e valores de exatidão, com RSD, após fortificação das amostras.

Amostra	Teor de NDELA nas amostras		Exatidão	
	Concentração média de NDELA (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
A	< LOD	-	114 ^a	18,3
C	54	6,9	104 ^b	4,2
E	< LOD	-	146 ^a	17,0
K	< LOQ	-	155 ^b	19,4

LOD: 3 ng g⁻¹; LOQ: 10 ng g⁻¹; a: nível de fortificação de 10 ng g⁻¹ e b: nível de fortificação de 15 ng g⁻¹.

Os cromatogramas de todas as amostras analisadas estão no Anexo V.

Uma amostra apresentou NDELA em sua composição num nível acima de 50 ng g⁻¹, que é o valor máximo do contaminante permitido em matérias-primas utilizadas na fabricação de *shampoo*. As amostras A e E apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método e a amostra K abaixo do limite de quantificação do método.

Em resumo, das amostras analisadas, apenas uma, a amostra C, tem uma concentração de NDELA em um nível de preocupação. De modo geral, os valores estão abaixo dos reportados na literatura quando utilizado a técnica LC-MS/MS:

mínimo de 20 ng g⁻¹ e máximo de 945 ng g⁻¹ (SCHOTHORST & SOMERS, 2005; JOO *et al.*, 2015).

Conforme explicado no item 4.3.4 os analitos apolares que mostraram recuperação com o preparo de amostras desenvolvido foi a NMOR e a NPIP. Os eluatos 3 das amostras foram injetados no sistema para análise. A Tabela 23 mostra a resposta em área do pico para cada um dos dois analitos.

Tabela 26: Área dos picos da NMOR e da NPIP para as amostras analisadas.

Amostra	NMOR	NPIP
A	nd	5905
C	nd	36464
E	nd	5266
K	nd	na

na: não analisado, nd: não detectado

O eluato 3 da amostra K não foi injetado, pois a solução final apresentou formação de espuma.

Os analitos apolares não foram quantificados devido à ausência de matriz branca representativa e por não ter sido utilizado o *surrogate* da NMOR e da NPIP.

Capítulo 5

Conclusão

As amostras de *shampoo* para bebê disponíveis no mercado são, de modo geral, diferentes quanto a sua formulação, especialmente com relação à quantidade de tensoativos. Das doze amostras adquiridas no comércio, oito possuem etanolaminas que podem ser nitrosadas e levar a formação de N-nitrosaminas. Uma das amostras possui em sua composição, além da cocoamida dietanolamina, a dimetilol-dimetil (DMDM) hidantoína, substância conhecida por liberar formaldeído que é um catalisador da reação de nitrosação.

A presença de tensoativos em altas concentrações no *shampoo* e a baixa concentração de N-nitrosaminas (ng g^{-1}) é um fator importante a ser considerado no preparo de amostras. Dos procedimentos avaliados: extração em fase sólida (SPE) em fase C18 e Oasis HLB, QuEChERs e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), a extração em fase sólida (C18) foi a mais promissora quanto a eliminação dos tensoativos e outros concomitantes que afetam o sinal analítico.

Cabe destacar que a matriz do *shampoo* varia de fabricante para fabricante o que limita o estabelecimento de um procedimento único de preparo de amostras. Procedimentos reportados na literatura para *shampoos* comercializados em outros países não levaram a resultados satisfatórios com amostras nacionais. Foi verificado que a quantidade do sorbente C18 é um fator limitante no procedimento de preparo de amostras empregando a extração em fase sólida. Para uma amostra de 1 g de *shampoo* se faz necessário o emprego de no mínimo 1,5 g de sorbente.

Procedimentos únicos de preparo de amostras para as mais diversas matrizes cosméticas (ex. espuma para banho, sabonete líquido, limpador facial, máscara, *shampoo* e produtos para cuidados com a pele) foram encontrados na literatura. Entretanto, nesse trabalho foi possível concluir que as amostras de *shampoo* não possuem o mesmo comportamento no preparo de amostra desenvolvido, mesmo sendo constituídas majoritariamente por surfactantes, como o lauril éter sulfato de sódio, e água. Portanto, o método de preparo de amostra deve ser avaliado para cada amostra de *shampoo* de forma independente e um preparo único, conforme reportado na literatura de forma frequente, não é recomendável.

Outro fator a ser considerado é a polaridade da NDELA, que tem baixa afinidade pela fase C18. Assim, o procedimento de preparo de amostra usando SPE com sorbente C18 tem a finalidade de reter os tensoativos e outros concomitantes que podem levar a um elevado efeito matriz na quantificação. Sendo assim, um

procedimento adicional de concentração do analito é imprescindível, que nesse trabalho foi possível pelo uso do SPE *on-line* ao UHPLC-MS/MS, usando a coluna Oasis HLB como fase sorbente.

Embora o método desenvolvido usando SPE-UHPLC-MS/MS seja adequado para a quantificação da NDELA e de N-nitrosaminas voláteis, o preparo de amostras desenvolvido para a NDELA se mostrou adequado apenas para a NMOR e a NPIP. No caso das demais N-nitrosaminas, o preparo de amostra teria que ser modificado.

Uma vez que o efeito matriz é influenciado pela matriz da amostra e não se tem uma matriz branca que represente todas as amostras de *shampoo*, é indispensável o uso do *surrogate* como padrão interno (NDELA-d₈). Embora o *surrogate* permita a quantificação da NDELA pela curva no solvente o LOQ pode variar de amostra para amostra e isso precisa ser levado em consideração na análise de amostras.

O planejamento experimental utilizado para otimização das condições de carregamento se mostrou uma ferramenta adequada para alcançar a maior retenção do analito NDELA na coluna Oasis HLB. Os fatores que mostraram maior influência no sistema foi a % de água no solvente de carregamento e o tempo de carregamento. O uso de uma quantidade maior de metanol no solvente de carregamento ocasionou a perda do analito, devido a pouca afinidade da NDELA com o sorbente da coluna SPE. Essa pouca afinidade permitiu, ainda, um tempo de carregamento curto, viabilizando o carregamento da amostra no cartucho, porém prejudicando uma limpeza mais eficiente dos interferentes. As respostas obtidas pelo equipamento no conjunto de experimentos realizados variaram entre 0 e 72561, o que mostrou que pequenas variações nos fatores avaliados ocasionava uma variação grande na resposta instrumental, evidenciando a importância da otimização.

Das dez amostras analisadas, uma apresentou concentração de 54 ng g⁻¹, valor superior ao limite permitido para o contaminante na matéria-prima. Outras duas apresentaram NDELA abaixo do limite de detecção (3 ng g⁻¹) e outra abaixo do limite de quantificação (10 ng g⁻¹). Todas as amostras contaminadas com NDELA possuem em sua composição a cocamida dietanolamina.

Embora não exista na legislação um valor máximo tolerado de NDELA no *shampoo*, a legislação estabelece o teor máximo de 50 ng g⁻¹ de N-nitrosaminas na

matéria prima utilizada na fabricação do produto. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de que agências regulatórias estabeleçam um limite máximo tolerado para N-nitrosaminas em produtos acabados. Além disso, deve-se considerar a importância de manter os métodos para a determinação de N-nitrosaminas em matrizes cosméticas atualizados, de modo a auxiliar o estudo de risco dos produtos.

Referências Bibliográficas

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. 7 Final Report on the Safety Assessment of Cocamide DEA, Lauramide DEA, Linoleamide DEA, and Oleamide DEA. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 5, n. 5, p. 415–454, 1986.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for N-nitrosodimethylamine**, 1989. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp141.pdf>.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; TAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada, **RDC n.º 36, de 17 de junho de 2009**. Dispõe sobre a proibida a exposição, a venda e a entrega ao consumo de formol ou de formaldeído (solução a 37%) em drogaria, farmácia, supermercado, armazém e empório, loja de conveniência e drugstore. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 jun. 2009. Seção 1, p. 47.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **2012a**. Resolução da diretoria colegiada, **RDC n.º 03, de 20 de janeiro de 2012**. Aprova o Regulamento Técnico "Listas de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas" e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 jan. 2012. Seção 1, edição extra, p. 2-11.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **2012b**. Resolução da diretoria colegiada, **RDC n.º 29, de 1 de junho de 2012**. Aprova o regulamento técnico mercosul sobre "lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 jun. 2012. Seção 1, p. 81-83.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada, **RDC n.º 07, de 10 de fevereiro de 2015**. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 fev. 2015. Seção 1, p. 39-42

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada, **RDC n.º 83, de 17 de junho de 2016**. Dispõe sobre o "Regulamento Técnico MERCOSUL sobre lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes". Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 jun. 2016. Seção 1, p. 57-70.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada, **RDC n.º 166, de 24 de junho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Seção 1, p. 87-89.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria colegiada, RDC n.º 237, de 16 de julho de 2018**. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n.º 7, de 10 de fevereiro de 2015, e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n.º 15, de 24 de abril de 2015. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jul. 2018. Seção 1, p. 70-71.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D1172-95: Standard Guide for pH of aqueous solutions of soaps and detergents, ASTM International, West Conshohocken, PA, 1995. Disponível em: <file.yizimg.com/175706/2011120809012626.pdf>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Cresce consumo de produtos de higiene e cosméticos infantis**. 2017. Disponível em: <<http://patrocinados.estadao.com.br/abihpec/2017/04/28/consumo-de-produtos-de-higiene-pessoal-e-cosmeticos-infantis-cresce-456-em-5-anos/>>. Acesso em: 16 de setembro de 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Panorama do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**. 2018. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>>. Acesso em: 26 de maio de 2018.

BARBOSA, A. B.; SILVA, R. R. Xampu. **Química nova na escola**, n. 2, 1995.

BARCELÓ, D.; HENNION, M.C. On-line sample handling strategies for the trace-level determination of pesticides and their degradation products in environmental waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 318, n. 1, p. 1-41, 1995.

BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. **Handbook of cosmetic science and technology (3^a ed.)**. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2009.

BARKER, S. A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, n. 1-2, p. 63-8, 2000.

BARTSCH, H.; MONTESANO, R. Relevance of nitrosamines to human cancer. **Carcinogenesis**, v. 5, n. 11, p. 1381-1393, 1984.

BETTON, C. I. **Global Regulatory Issues for the Cosmetics Industry**; v.1. New York, NY: William Andrew, 2007.

BOYD, B; BETHEM, R.; BASIC, C. **Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry**. Hoboken, N. J.: John Wiley, 2008.

BRASIL. Anvisa. **Lei n.º 9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Seção 1, p. 1.

BRYAN, N. S.; ALEXANDER, D. D.; COUGHLIN, J. R.; MILKOWSKI, A. L.; BOFFETTA, P. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: an updated review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3646-65, 2012.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CANAES, L. D. S. **Desenvolvimento de métodos para determinação de n-nitrosaminas em amostras de xampu por cromatografia líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos, eletroquímica e espectrometria de massas**. Tese (doutorado em ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2011.

CAPELA, D.; HOMEM, V.; ALVES, A.; SANTOS, L. Volatile methylsiloxanes in personal care products - Using QuEChERS as a "green" analytical approach. **Talanta**, v. 155, p. 94-100, 2016.

CHALLIS, B. C.; TREW, D. F.; GUTHRIE, W. G.; ROPER, D. V. Reduction of nitrosamines in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 17, n. 3, p. 119-31, 1995.

CHANWIRAT, R. Rapid and sensitive determination of N-nitrosodiethanolamine in baby shampoo. Bangkok Agilent Technologies, 2012. Disponível em: http://www.ingenieria-analitica.com/downloads/dl/file/id/2285/product/304/rapid_and_sensitive_determination_of_n_nitrosodiethanolamine_in_baby_shampoo.pdf

CHEMIDPLUS A TOXNET DATABASE. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>. Acesso em: 12 de maio de 2018.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHISVERT, A.; BENEDÉ, J. L.; PEIRÓ, M.; PEDRÓN, I.; SALVADOR, A. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. **Talanta**, v. 166, p. 81-86, 2017.

CHOI, N. R.; KIM, Y. P.; JI, W. H.; HWANG, G.S.; AHN, Y. G. Identification and quantification of seven volatile n-nitrosamines in cosmetics using gas chromatography/chemical ionization-mass spectrometry coupled with head space-solid phase microextraction. **Talanta**, v. 148, p. 69-74, 2016.

COLE, R. B. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications**. New York, NY: John Wiley, 1997.

COLLIER, S. W.; MILSTEIN, S. R.; ORTH, D. S. Quantitative assay of volatile and non-volatile N-nitrosamines by gas chromatography with an electrolytic conductivity detector. I. Method development and assay of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in creams and lotions. **Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n. 6, p. 329-346, 1988.

DAVARANI, S. S.; MASOOMI, L.; BANITABA, M. H.; ZHAD, H. R.; SADEGHI, O.; SAMIEI, A. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by headspace solid phase microextraction using a novel aluminum hydroxide grafted

fused silica fiber followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 105, p. 347-353, 2013.

DONG, H.; GUO, X.; XIAN, Y.; LUO, H.; WANG, B.; WU, Y. A salting out-acetonitrile homogeneous extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of thirteen N-nitrosamines in skin care cosmetics. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 82-88, 2015.

EDWARDS, G. S.; PENG, M.; FINE, D. H.; SPIEGELHALDER, B.; KANN, J. Detection of Nnitrosodiethanolamine in human urine following application of a contaminated cosmetic. **Toxicology Letters**, v. 4, n. 3, p. 217-222, 1979.

FAN, T. Y.; GOFF, U.; SONG, L.; FINE, D. H.; ARSENAULT, G. P.; BIEMANN, K. N-Nitrosodiethanolamine in cosmetics, lotions and shampoos. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 423-430, 1977.

FLOWER, C.; CARTER, S.; EARLS, A.; FOWLER, R.; HEWLINS, S.; LALLJIE, S.; LEFEBVRE, M.; MAVRO, J.; SMALL, D.; VOLPE, N. A method for the determination of N-nitrosodiethanolamine in personal care products - Collaboratively evaluated by the CTPA Nitrosamines Working Group. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 1, p. 21-33, 2006.

FUJIAN, LIU.; YANPING, XIAN.; JIWEN, CHEN.; HAO, DONG.; HUIDI, LIU.; XINDONG, GUO.; HEN, LI.; MANYING, CHEN. Determination of eleven volatile N-nitrosamines in skin care cosmetics using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive clean-up sorbent and ultrahigh-performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 4245-4253, 2016.

FUKUDA, Y.; MORIKAWA, Y.; MATSUMOTO, I. Ion-exchange chromatographic separation of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 2000-2003, 1981.

GATES, P. J. **Electrospray Ionisation (ESI)**. University of Bristol. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>>. Acesso em 12 de agosto de 2018.

GENET, M. Radium: A Miracle Cure! **Radiation Protection Dosimetry**, v. 79, n. 1-4, p. 1-4, 1998.

GHASSEMPOUR, A.; ABBACI, M.; TALEBPOUR, Z.; SPENGLER, B.; RÖMPP, A. Monitoring of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by ion-pair complex liquid chromatography and identification with negative ion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 1, p. 43-48, 2008. GHAZALEH, A.; ZAHRA, T. Modified QuEChERS as a novel sample preparation method for analysis of N-nitrosodiethanolamine in shampoo by high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 9, n. 35, p. 5165–5173, 2017.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3929-37, 2010.

HEWAVITHARANA, A. K. Matrix matching in liquid chromatography–mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards—Is it necessary? **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 2, p. 359-361, 2011.

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, n. 6, p. 1344-54, 1980.

JÄRVHOLM, B.; LAVENIUS, B.; SÄLLSTEN, G. Cancer morbidity in workers exposed to cutting fluids containing nitrites and amines. **British journal of industrial medicine**, v. 43, n. 8, p. 563–565, 1986.

JONES, M., GLOVER, C., 2016. **A fast efficient method to determine the presence of nitrosamines in cosmetics, personal care, and consumer products.** Application Note. Waters Corporation. Northumbria University, Newcastle upon Tyne, UK.

JOO, K.M.; SHIN, M.S.; JUNG, J.; KIM, B.M.; LEE, J.W.; JEONG, H.J.; LIM, K.M. Determination of N-nitrosodiethanolamine, NDELA in cosmetic ingredients and products by mixed mode solid phase extraction and UPLC–tandem mass spectrometry with porous graphitic carbon column through systemic sample pre-cleanup procedure. **Talanta**, v. 137, p. 109–119, 2015.

KANE, I.; MIGLIORESE, K. G. Analysis of nitrosamines in cosmetics. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 41, p. 283–333, 1990.

KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T.J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 1216, n. 4, p. 685-699, 2009.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013.

LEE, J.H.; LEE, S.U.; OH, J.E.; Analysis of nine nitrosamines in water by combining automated solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, n. 12, p. 1261-1273, 2013.

LIM, D. S.; ROH, T. H.; KIM, M. K.; KWON, Y.C.; CHOI, S. M.; KWACK, S. J.; KIM, K. B.; YOON, S.; KIM, H.S.; LEE, B. M. Risk assessment of N-nitrosodiethylamine (NDEA) and N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 81, n. 12, p. 465-480, 2018.

LOEPPKY, R. N. The mechanism of bioactivation of N-nitrosodiethanolamine. **Drug Metabolism Reviews**, v. 31, n. 1, p. 175-93, 1999.

MA, Q.; XI, H. W.; WANG, C.; BAI, H.; XI, G. C.; SU, N.; XU, L. Y.; WANG, J. B. Determination of Ten Volatile Nitrosamines in Cosmetics by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1201-1207, 2011.

MAGEE, P. N. Toxicity of nitrosamines: their possible human health hazards. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 207-18, 1971.

MAGEE, P. N.; BARNES, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **British Journal of Cancer**, v. 10, n. 1, p. 114-22, 1956.

MAJORS, R. E. **Sample preparation fundamentals for chromatography**. Agilent technologies, 2013. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MALLET, C.R.; LU, Z.; MAZZEO, J.R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 01, p. 49-58, 2004.

MERCOSUL COMUM DO SUL. MERCOSUL/GMC/RES. Nº 110/94. **Definição de produto cosmético**. Disponível em: <
http://www.mercosur.int/msweb/portal%20intermediario/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/94110.pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2018.

MIRVISH, S.S. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 31, n. 03, p. 325-351, 1975.

MITSUMI, T. **New Cosmetic Science**. Elsevier Science, 1997.

MOULD, R. F. Marie and Pierre Curie and radium: history, mystery, and discovery. **Medical Physics**, v. 26, n. 9, p. 1766-72, 1999.

PAN, J.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; LI, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1-15, 2014.

PARK, R. M.; MIRER, F. E. A survey at two automotive engine manufacturing plants. **American Journal of industrial medicine**, v. 30, n. 6, p. 664-73, 1996.

PREUSSMANN, R. Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. **Naturwissenschaften**, v. 71, n. 1, p. 25-30, 1984.

PREUSSMANN, R.; HABS, M.; HABS, H.; SCHMÄHL, D. Carcinogenicity of N-Nitrosodiethanolamine in Rats at Five Different Dose Levels. **Cancer Research**, v. 42, n. 12, p. 5167-71, 1983.

RATH, S.; CANAES, L. S. Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por N-Nitrosaminas. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2159-2168, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIPOLLES, C.; PITARCH, E.; SANCHO, J.V.; LOPEZ, F.J.; HERNANDEZ, F. Determination of eight nitrosamines in water at the ng L(-1) levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 01, p. 62-71, 2011.

RODRIGUES, S. **Os artefactos de toilette nas colecções egípcias de Lisboa e do Porto**. Revista de história antiga: Centro de História da Universidade de Lisboa, v 23, p. 35-55, 2013.

ROLLMANN B.; LOMBART P.; RONDELET J.; MERCIER M. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 206, n. 1, p. 158-163, 1981.

ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. **Beginning cosmetic chemistry: practical knowledge for the cosmetic industry**. Carol Stream, Ill.: Allured, c2009.

ROSENBERG, I. E.; GROSS, J.; SPEARS, T.; CATERBONE, U. Methodology development for the determination of nitrite and nitrosamines in cosmetic raw materials and finished products. **Journal of the Society of Cosmetic Chemist**, v. 30, n. 3, p. 127-135, 1979.

ROSENBERG, I. E.; GROSS, J.; SPEARS, T.; RAHN, P. Analysis of nitrosamines in cosmetic raw materials and finished product by high pressure liquid chromatography. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 31, n. 5, p. 237-252, 1980.

SCHMELTZ, I.; WENGER, A. 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol as a nitrosating agent for diethanolamine: A model study. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 1979.

SCHOTHORST, R. C.; SOMERS, H. H. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 3, p. 681-685, 2005.

SCHOTHORST, R. C.; STEPHANY, R. W. Occurrence of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics from the Dutch market. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 23, n. 2, p. 109-114, 2001.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SOMMER, H.; EISENBRAND, G. A method for the determination of N-nitrosoalkanolamines in cosmetics. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 186, n. 3, p. 235-238, 1988.

SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R. Contamination of toiletries and cosmetic products with volatile and nonvolatile N-nitroso carcinogens. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 108, n. 1, p. 160-163, 1984.

SULLIVAN P. A.; EISEN E. A.; WOSKIE S. R.; KRIEBEL D.; WEGMAN D. H.; HALLOCK M. F.; HAMMOND S. K.; TOLBERT P. E.; SMITH T. J.; MONSON R. R. Mortality studies of metalworking fluid exposure in the automobile industry: VI. A case-control study of esophageal cancer. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 34, n. 1, p. 36-48, 1998.

TELLING, G. M. The determination of N-nitrosamines in foods and cosmetics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 1, n. 12, p. 277-280, 1982.

TELLING, G. M.; DUNNETT, P. C. The determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) at trace levels in shampoos and skin creams by a simple, rapid colorimetric method. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 3, n. 5, p. 241-248, 1981.

WANG, L. H.; HSIA, H. C.; WANG, C. C. Simultaneous Determination of Five Volatile and Non-Volatile N-Nitrosamines in Biological Fluids and Cosmetic Products by Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 12, p. 1737-1751, 2006.

WATERS. Oasis Sample Extraction Products, purity by SPE. Waters Corporation®, 2008. Disponível em:
<https://kinesis.co.uk/media/wysiwyg/knowledgebase/pdf/720001692en-New-Oasis-brochure.pdf>

WESTIN, J. B.; SPEIGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R.; SHANI, J. Assay of suntan lotions for the carcinogenic, non-volatile N-nitrosamine N-nitrosodiethanolamine. **Cancer Letters**, v. 50, n. 2, p. 157-160, 1990.

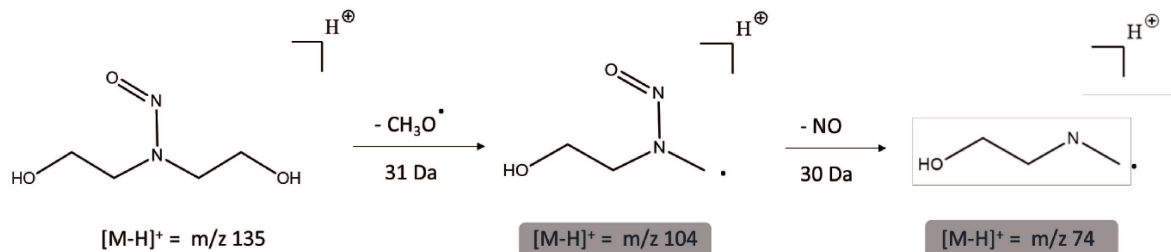
ZHAO, Y.Y.; LIU, X.; BOYD, J.M.; QIN, F., LI, J.; LI, X.F. Identification of N-Nitrosamines in Treated Drinking Water Using Nano-electrospray Ionization High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 01, p. 92-96, 2009.

ZHONG, Z.; LI, G. Current trends in sample preparation for cosmetic analysis. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 1, p. 152–169, 2016.

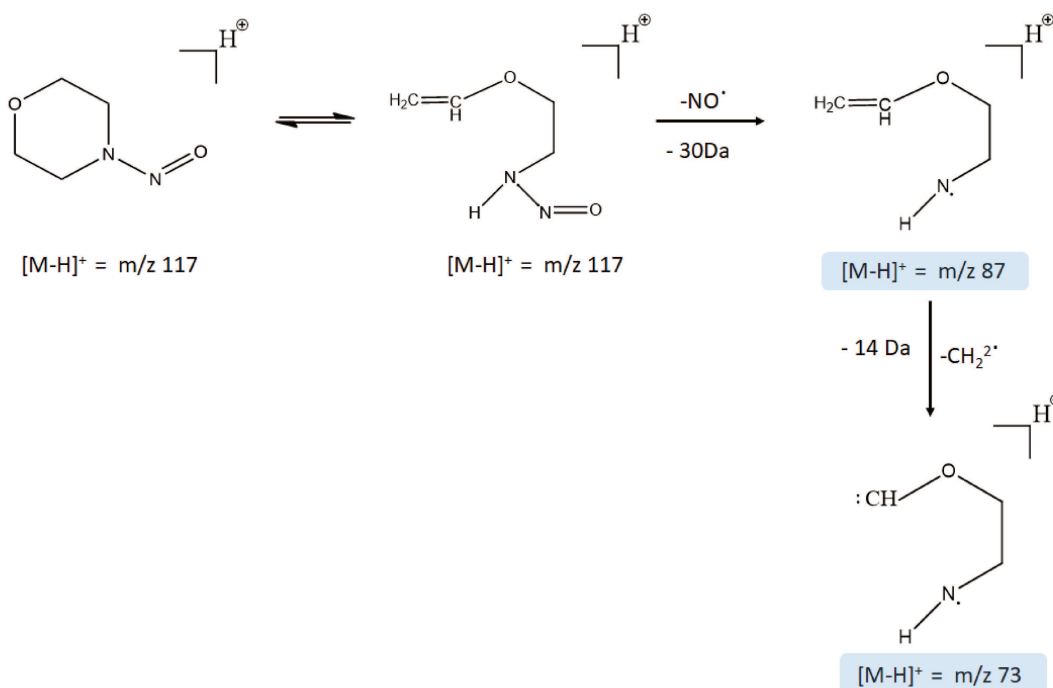
Anexos

Anexo I – Proposta para Fragmentação das N-nitrosaminas

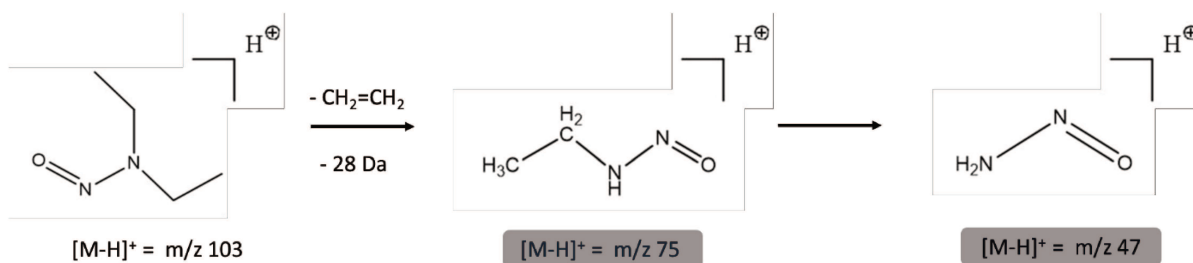
NDELA:

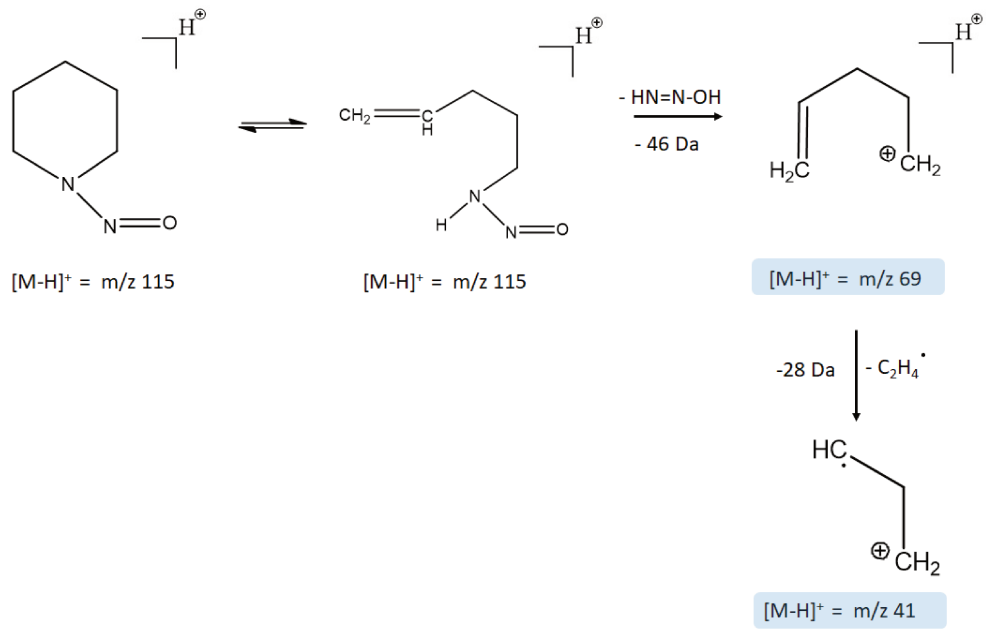
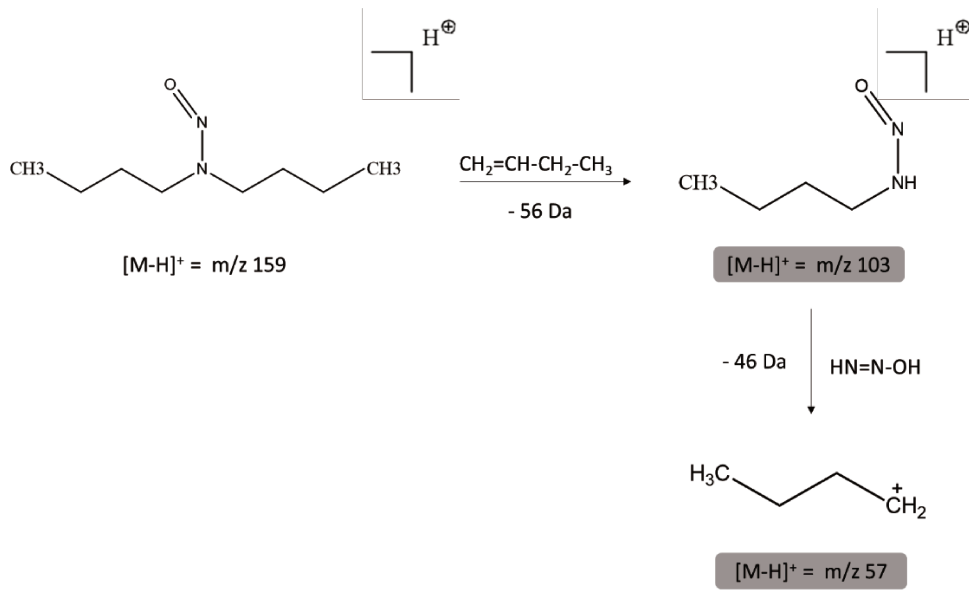


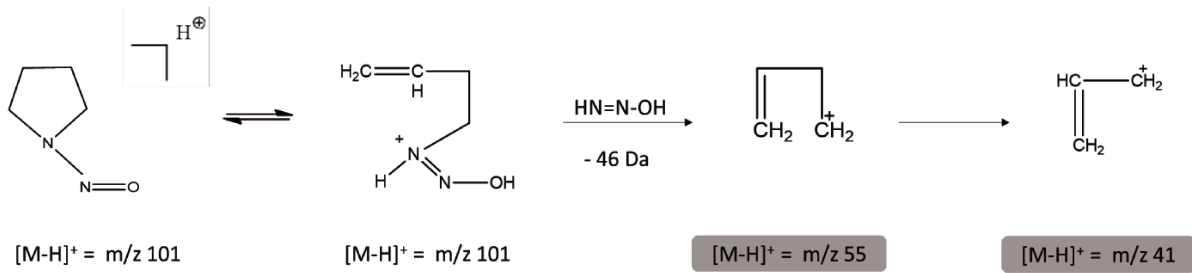
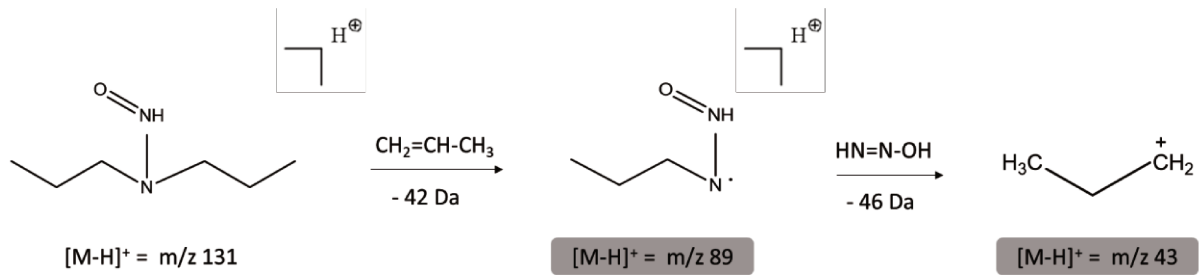
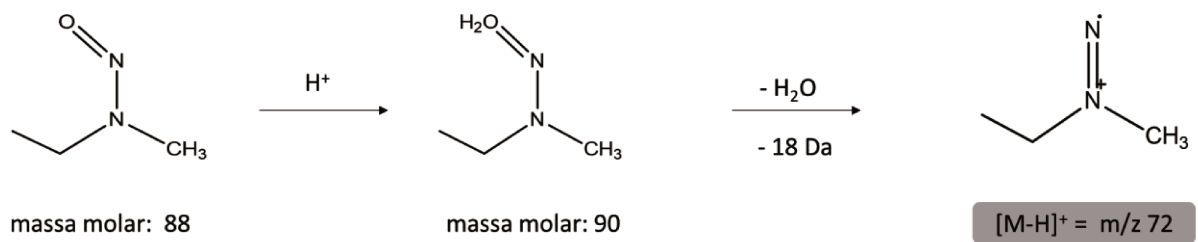
NMOR:



NDEA:



NPIP:**NDBA:**

NPYR:**NDPLA:****NMEA:**

Anexo II - Cromatogramas do estudo da fase móvel e aditivos

1) Cromatograma dos analitos usando formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ e metanol como fase orgânica.

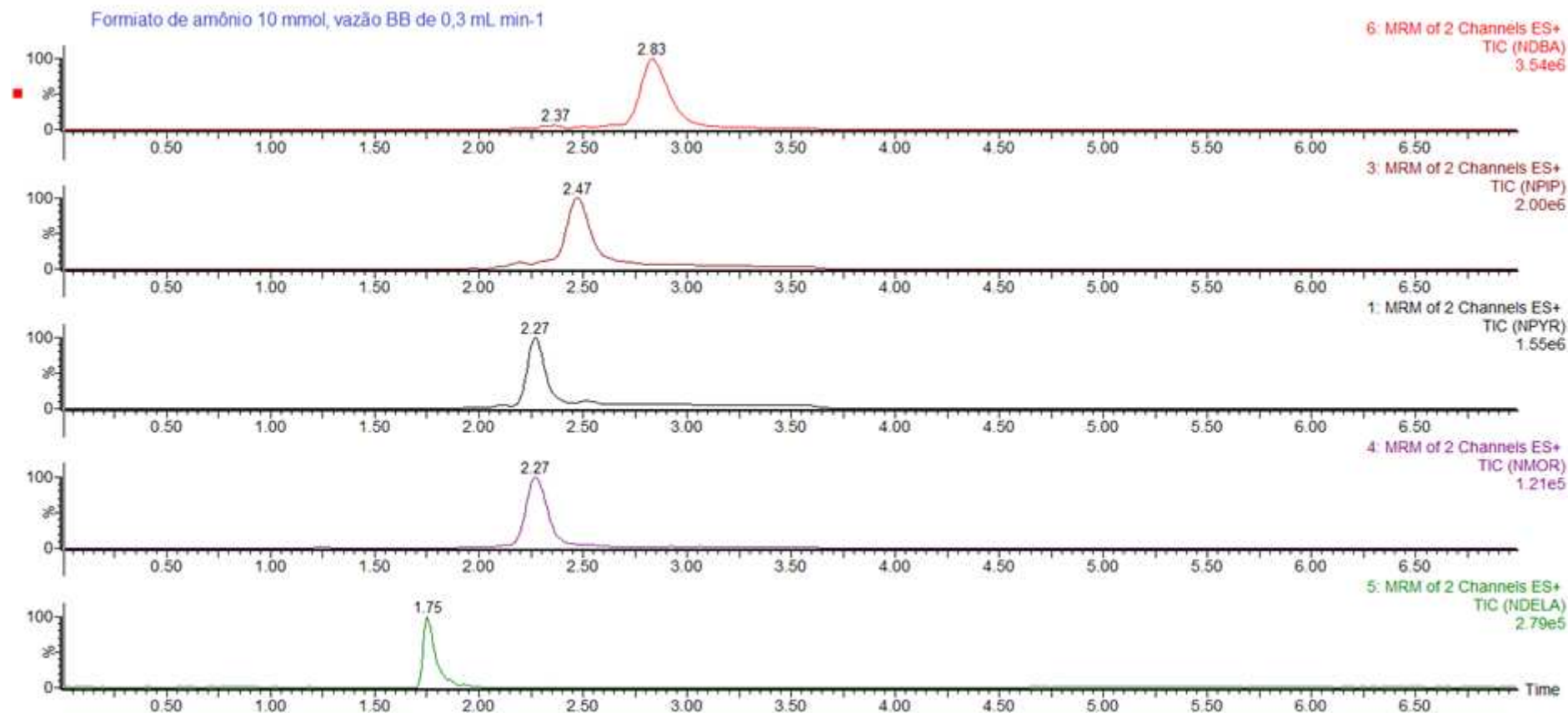


Figura 27: Cromatograma usando formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ e metanol como fase orgânica. Bomba quaternária: 100% de água, 1,0 mL min⁻¹ de vazão, 0,4 min de carregamento. Bomba quaternária: 0,3 mL min⁻¹, gradiente de eluição (água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (20:80), 2,60 min (20:80), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20).

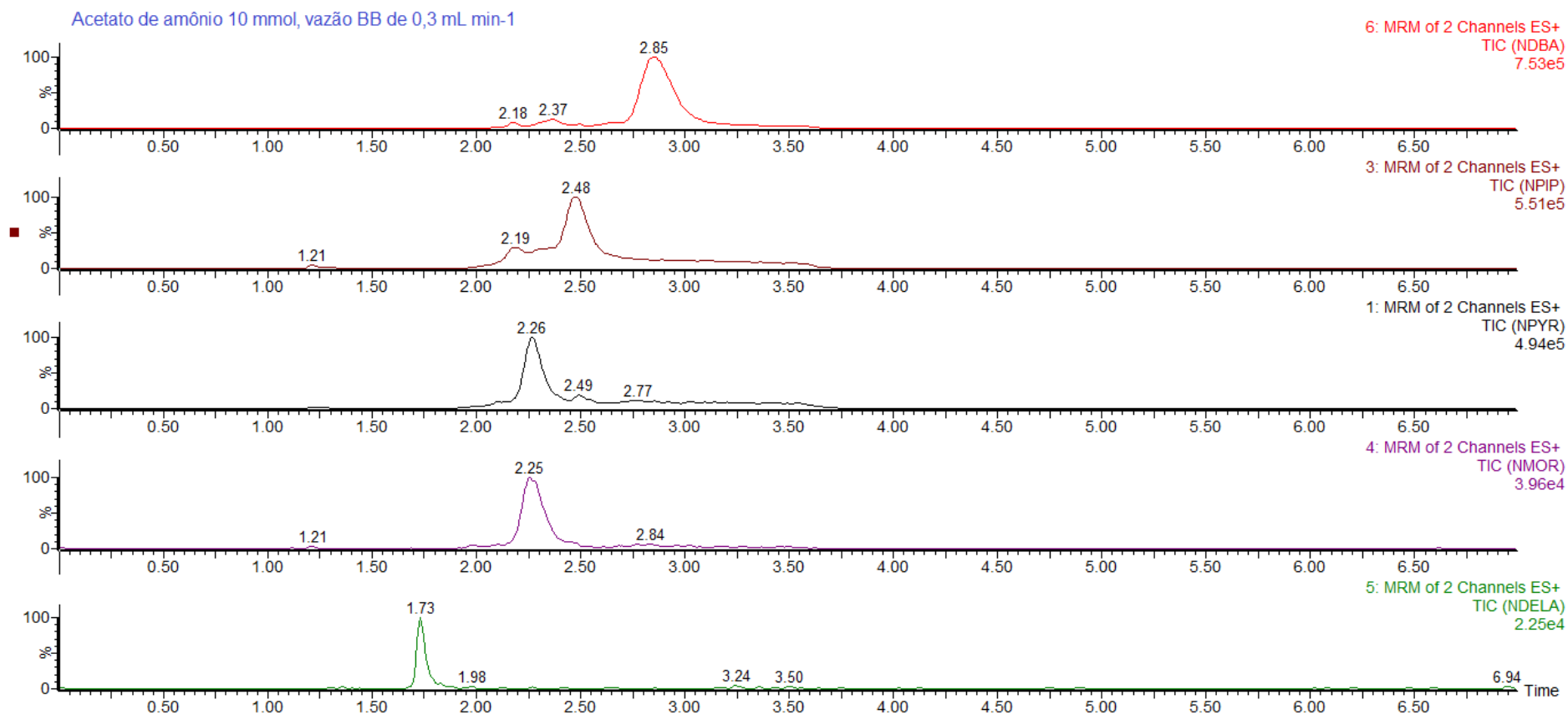
2) Cromatograma dos analitos usando acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e metanol como fase orgânica.

Figura 28: Cromatograma usando acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e metanol como fase orgânica. Bomba quaternária: 100% de água, 1,0 mL min⁻¹ de vazão, 0,4 min de carregamento. Bomba quaternária: 0,3 mL min⁻¹, gradiente de eluição (água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (20:80), 2,60 min (20:80), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20).

3) Cromatograma dos analitos usando 0,1% ácido fórmico como aditivo na fase aquosa e metanol:acetonitrila (80:20, v/v) na fase orgânica.

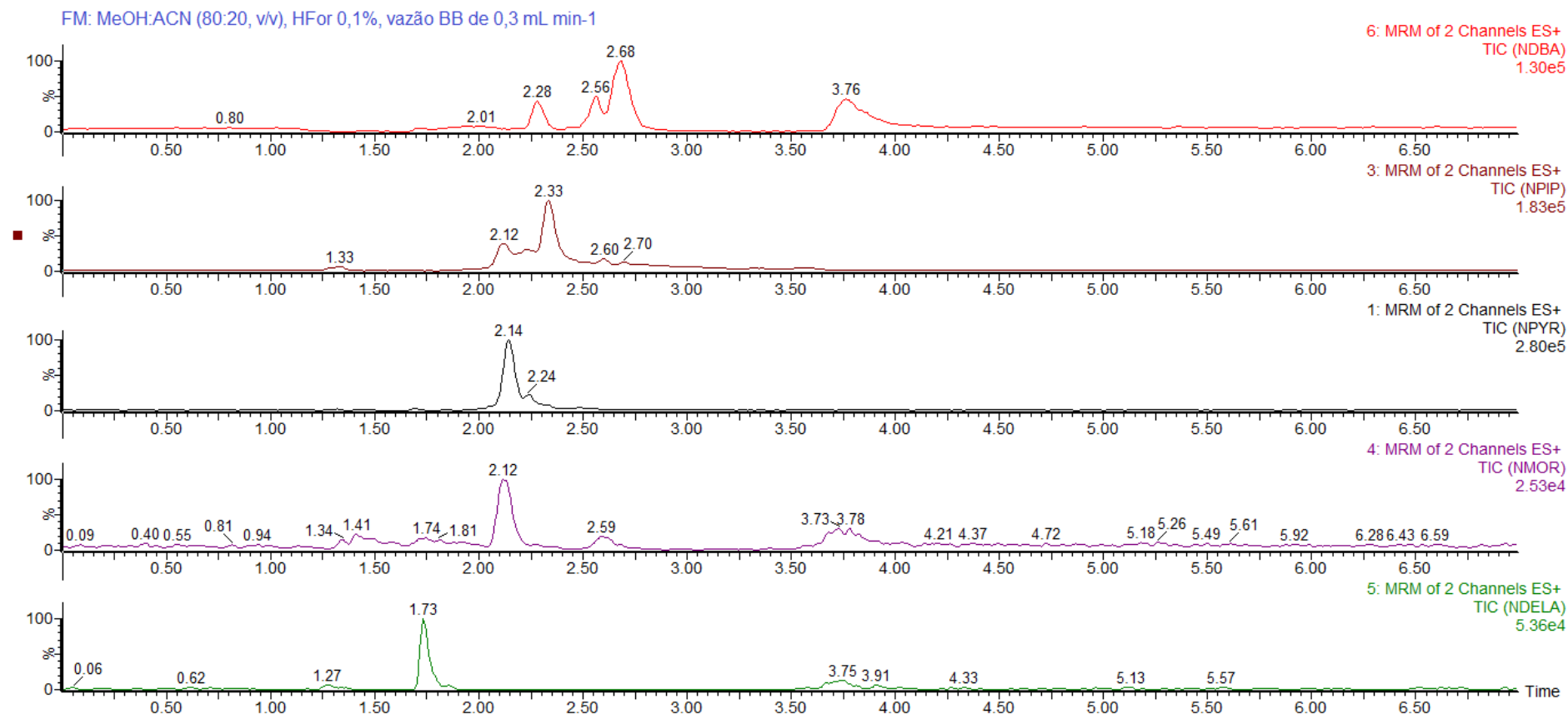


Figura 29: Cromatograma usando 0,1 % ácido fórmico como aditivo na fase aquosa e metanol:acetonitrila (80:20, v/v) na fase orgânica. Bomba quaternária: 100% de água, 1,0 mL min⁻¹ de vazão, 0,4 min de carregamento. Bomba quaternária: 0,3 mL min⁻¹, gradiente de eluição (água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,4 min (80:20), 1,0 min (20:80), 2,60 min (20:80), 2,70 min (80:20), 7,0 min (80:20).

Anexo III - Composição das amostras de shampoo para bebê analisados

Composição	Marca	Composição	Marca
Ácido benzóico	D		J
	F	Glicerina	D
	B		I
	A	Glutamato de cocoil dissódico	F
	H	Goma xantana	F
Ácido cítrico	C		G
	D		D
	E	Hexil cinamaldeído	B
	K		A
	I		H
Ácido esteárico	J		K
Ácido etidrônico	J		C
Ácido laurílico	J	Hidróxido de sódio	J
Ácido sórbico	D	Hidroxiopropil Guar	J
	D	Isetionato de sódio	J
	I	Isetionato lauroil de sódio	J
Álcool benzílico	J	Hidroxiopropil Guar cloreto de hidroxipropil triamônio	H
	C	Hidroxiopropil lauril diamônio hidrolizado (<i>wheat protein</i>)	C
Alfa isometil ionona	G		B
	D	Lauriléter 2	K
Amil cinamaldeído	A		H
Aminometil propanol	G	Lauril glicosídeo	H

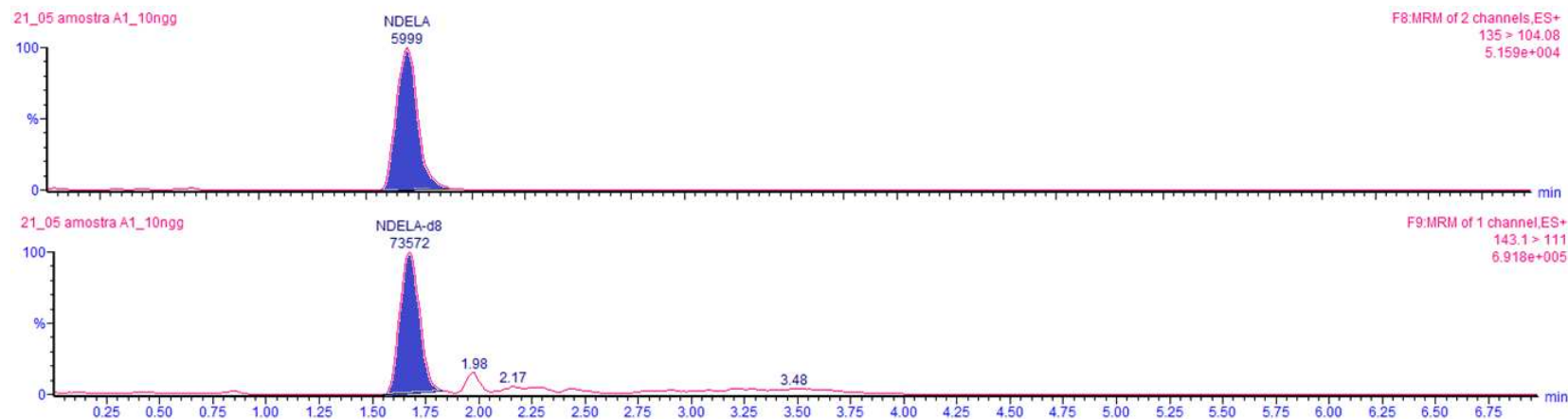
Benzoato de sódio	A	Lauriléter sulfato de sódio	C
	E		G
Benzofenona 4	C		F
Butilfenil metilpropional	H		K
Caprilil glicol	J		B
Cetil betaína	E		A
Citronelol	G		C
	A		I
	D		H
	K		J
	C	G	
Cloreto de hidroxipropil dimetil amônio	I	F	
Cloreto de hidroxipropil trimetil amônio	J	Lauriléter sulfosuccinato dissódico	K
Cloreto de sódio	G		B
	H		A
	A		C
	C	Lauriléter-13 carboxilato de sódio	D
	I	Lauril metil gluceth 10	I
Cocamida dietanolamina	J	Linalol	G
	G		D
	F		F
	B		B
	K		H
	C		A
H	C		

	J		I	
Cocamida metanolamina	A	Limoneno	D	
Coco glucosídeo	E		G	
Cocoamfoacetato de sódio	B		F	
	K		H	
Cocoamfodiacetato dissódico	D	Metilcloroisotiazolinona	B	
	G		K	
	J		A	
	D		I	
	F		J	
	A		G	
	C		F	
	I		H	
	J		K	
	E		I	
	H	B		
Cocoato de sódio	J	Metilisotiazolinona	J	
Cocoil glicinato de sódio	J		C	
Colágeno hidrolizado	G		J	
Copolímero de acrilato/estireno	J		G	
	F		J	
Cumarina	G		K	
	D		G	
	C		B	
Diacetato glutamato tetrasódio	E			H
Dimeticonol	J		PEG 12 - Dimeticona	C
		Palm kernelate de sódio	J	
		PEG 150 - Diestearato	G	
		PEG 7 - Cocoato de glicerila	B	
			H	
			C	

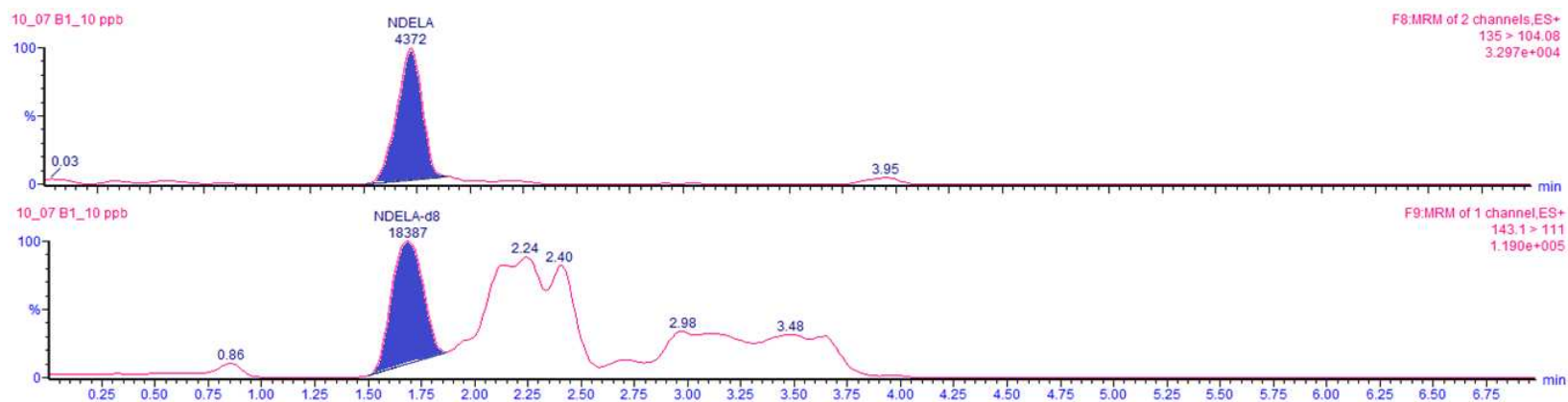
DMDM Hidantoína	C		B
	G	PEG -80 Laurato de sorbitan	K
	F		G
	E		D
EDTA dissódico	H		H
	B	PEG-120 Metil glucose trioleato	F
	K		A
	D		I
	I	PEG-90M	F
EDTA tetrasódico	J	Pirrolidona carboxilato de sódio	F
	A	Poliacrilato - 33	J
	C		E
Estearato de glicol	G	Poliquartênio-7	D
Estearato de sódio	J	Poloxamer 124	A
Éter metil glicose PPG-20	I		D
Fenoxietanol	J		F
		Propileno glicol	A
			I
		Sulfato de benzotriazol butilfenol de sódio	I
		Tridecil éter sulfato de sódio	D
			H
		Trietanolamina	A
		Metil 2 - sulfolaurato de sódio	E
		2-Sulfolaurato dissódico	E

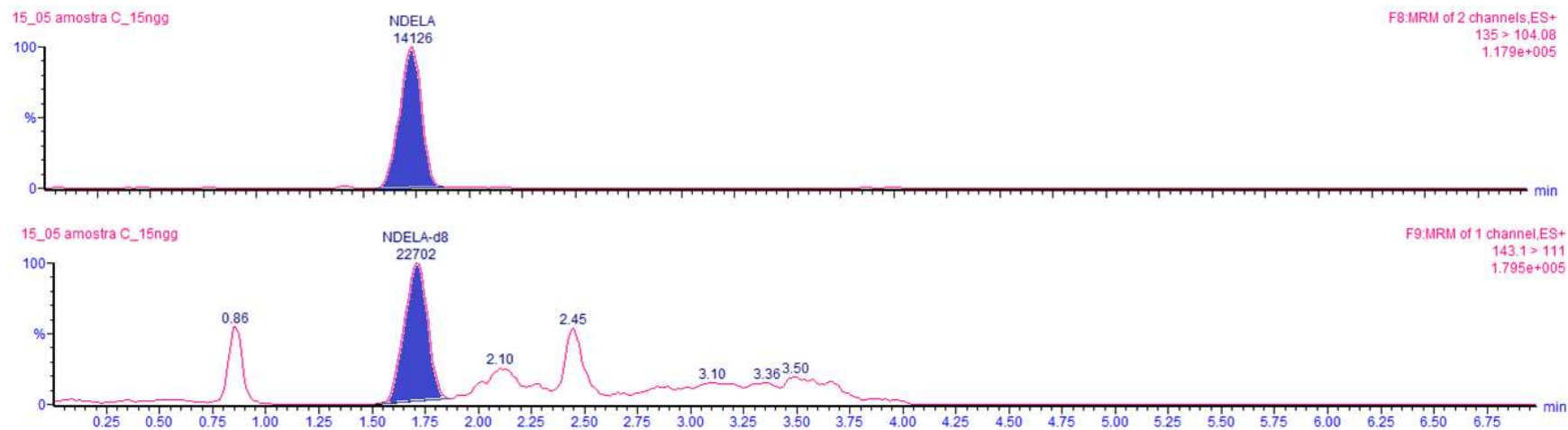
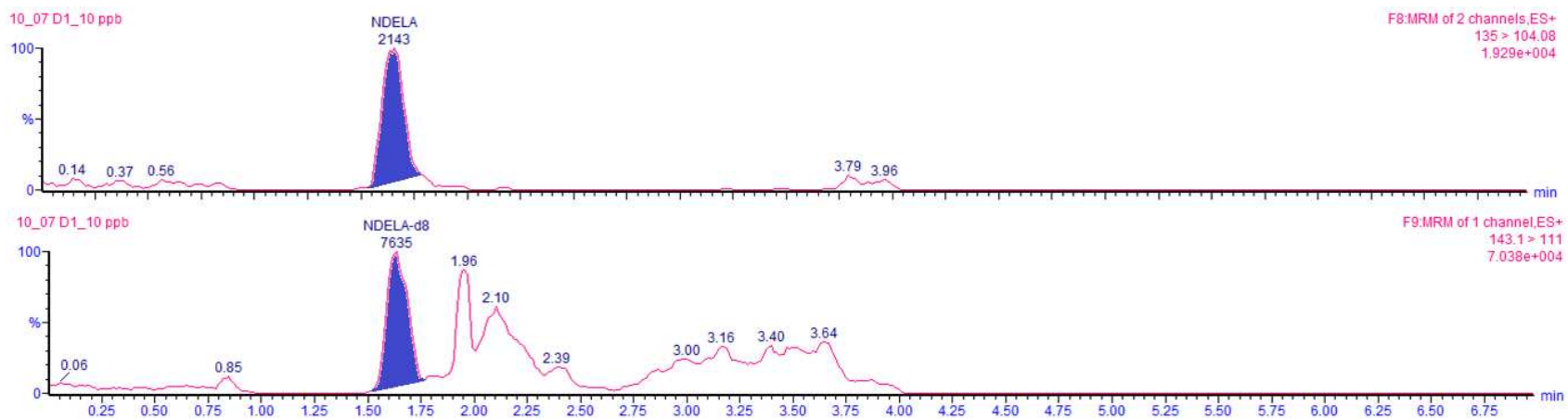
Anexo IV – Cromatogramas das amostras fortificadas

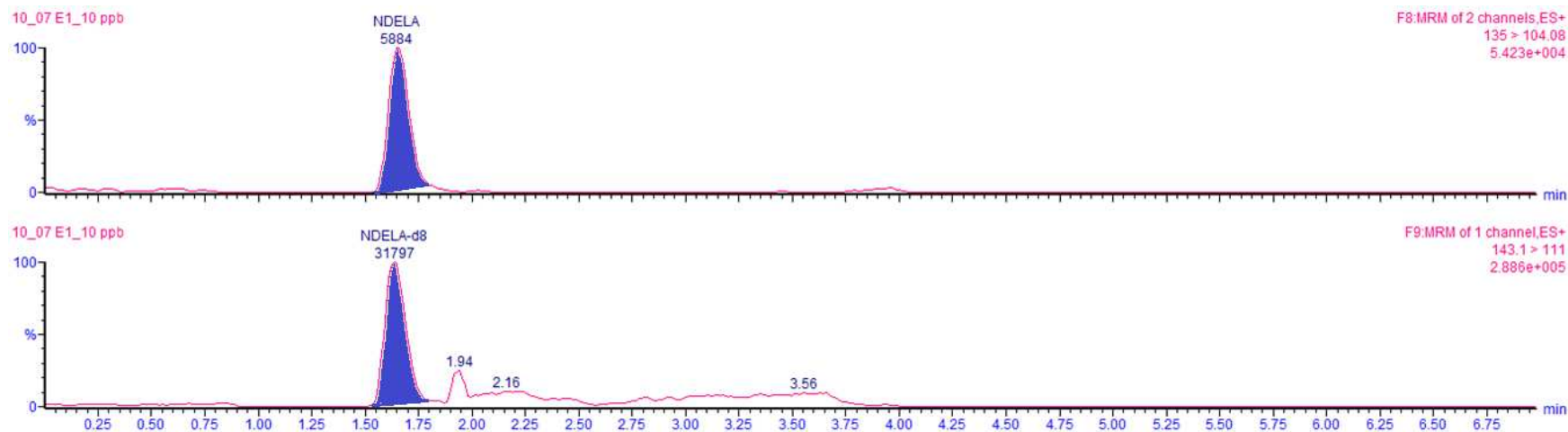
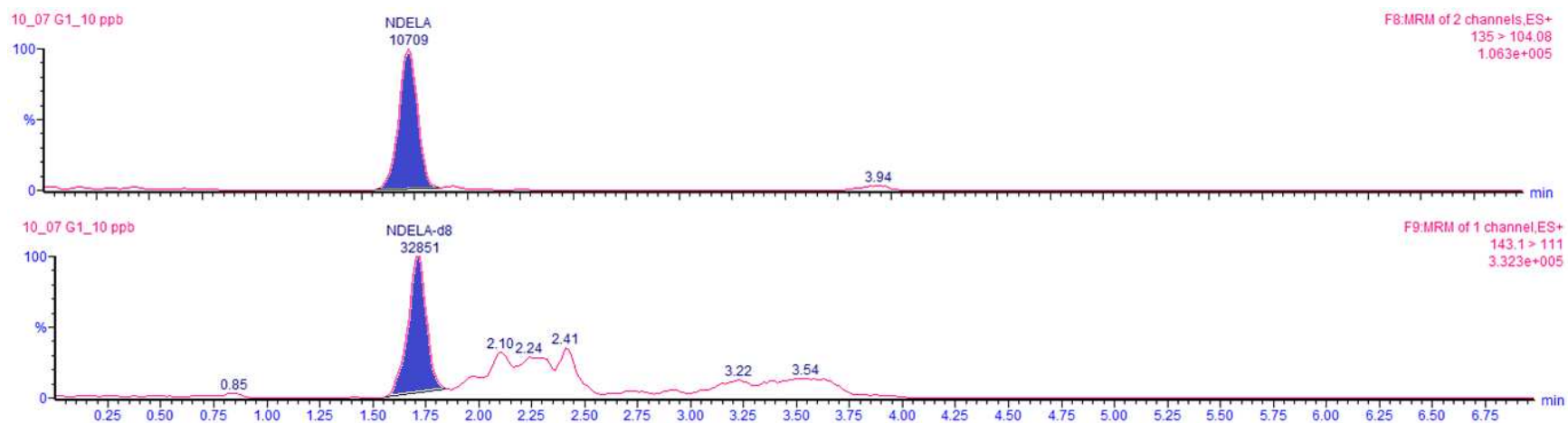
1) Cromatograma de uma das réplicas da amostra “A” fortificada com 10 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈



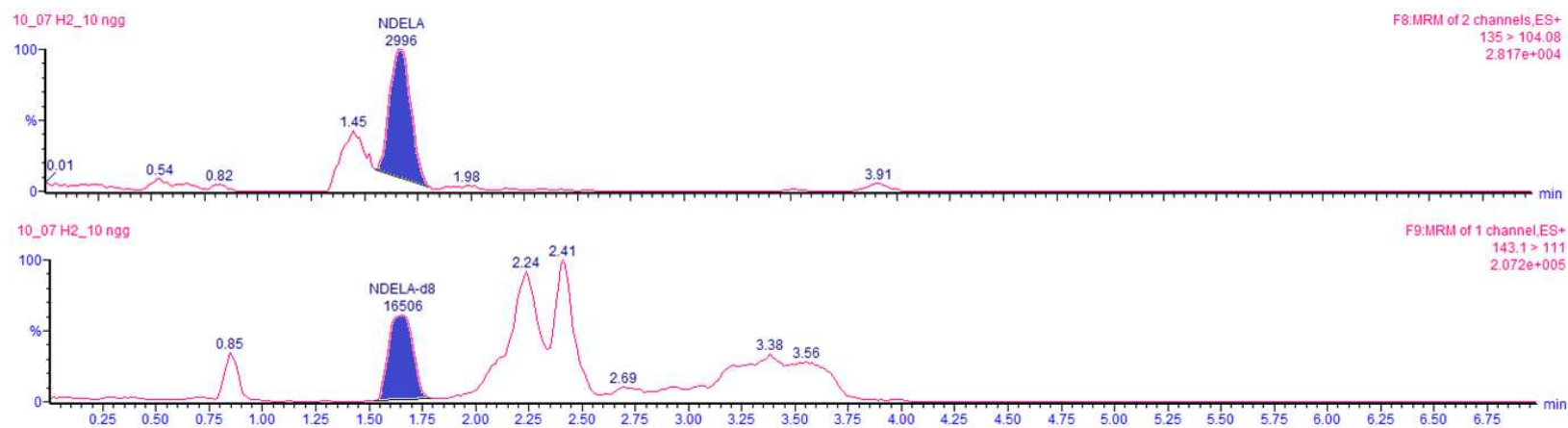
2) Cromatograma de uma das réplicas da amostra “B” fortificada com 10 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈



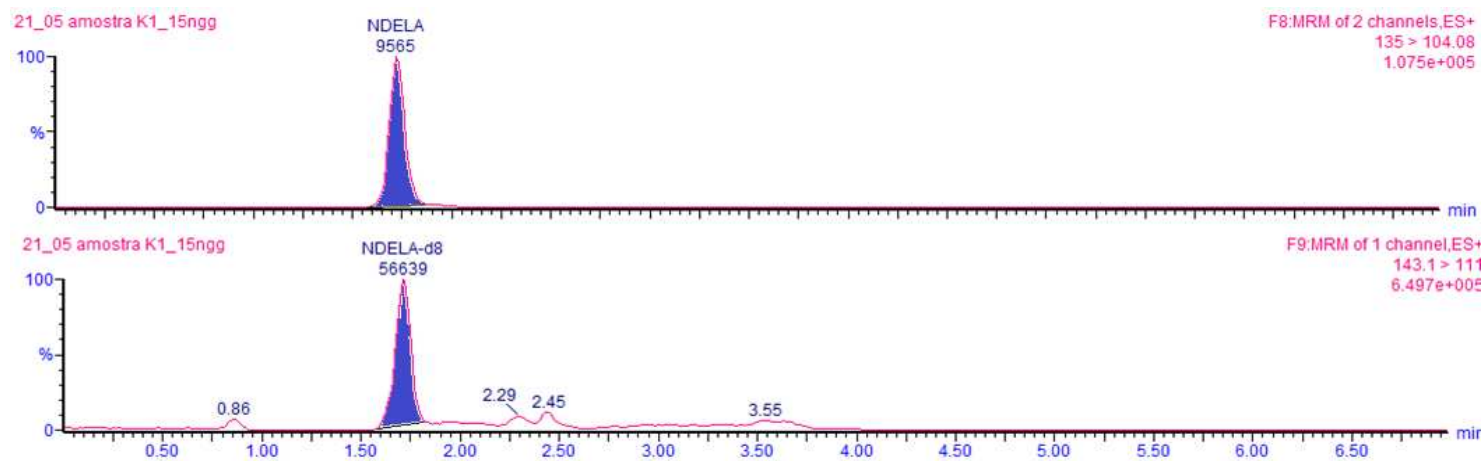
3) Cromatograma de uma das réplicas da amostra "C" fortificada com 15 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈4) Cromatograma de uma das réplicas da amostra "D" fortificada com 10 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈

5) Cromatograma de uma das réplicas da amostra "E" fortificada com 10 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈6) Cromatograma de uma das réplicas da amostra "G" fortificada com 10 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈

7) Cromatograma de uma das réplicas da amostra "H" fortificada com 10 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈

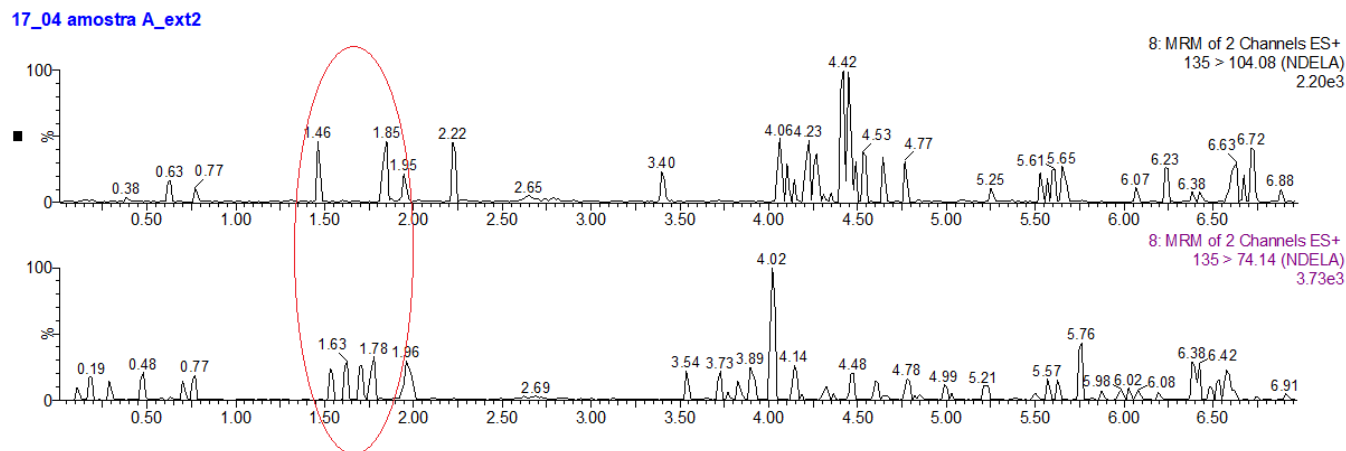


8) Cromatograma de uma das réplicas da amostra "K" fortificada com 10 ng g⁻¹ de NDELA e 100 ng g⁻¹ de NDELA-d₈

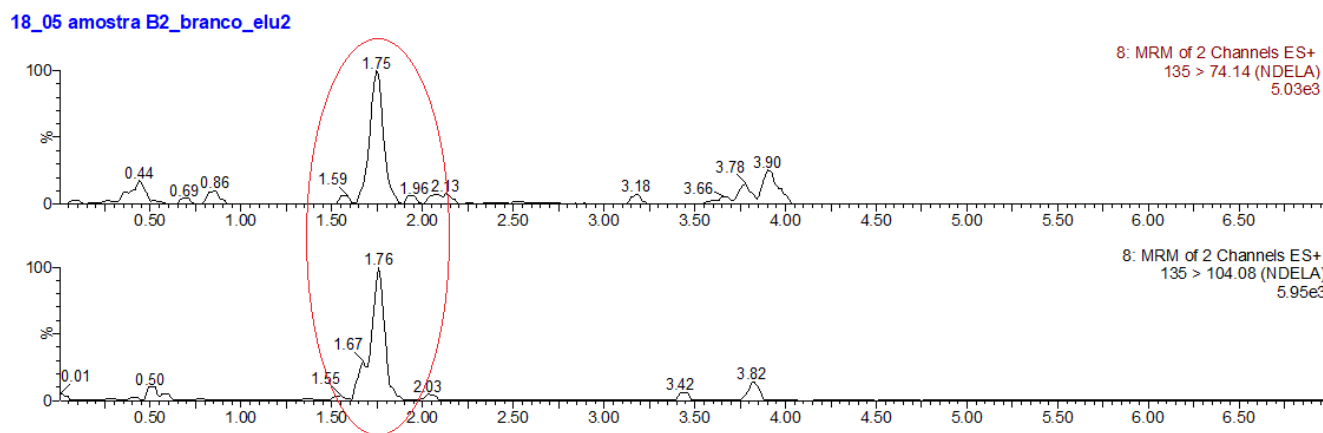


Anexo V - Cromatogramas da leitura das amostras

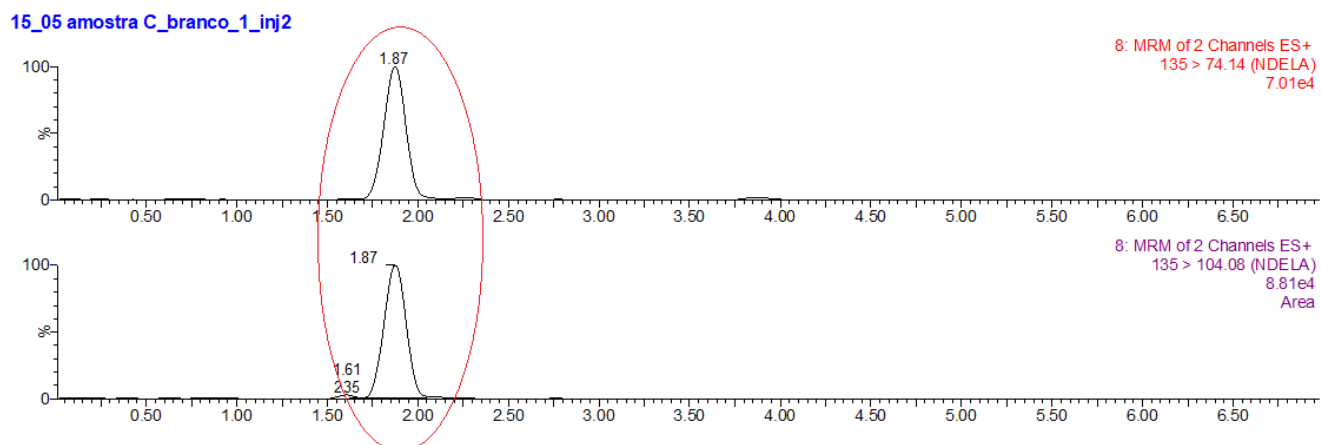
1) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra A



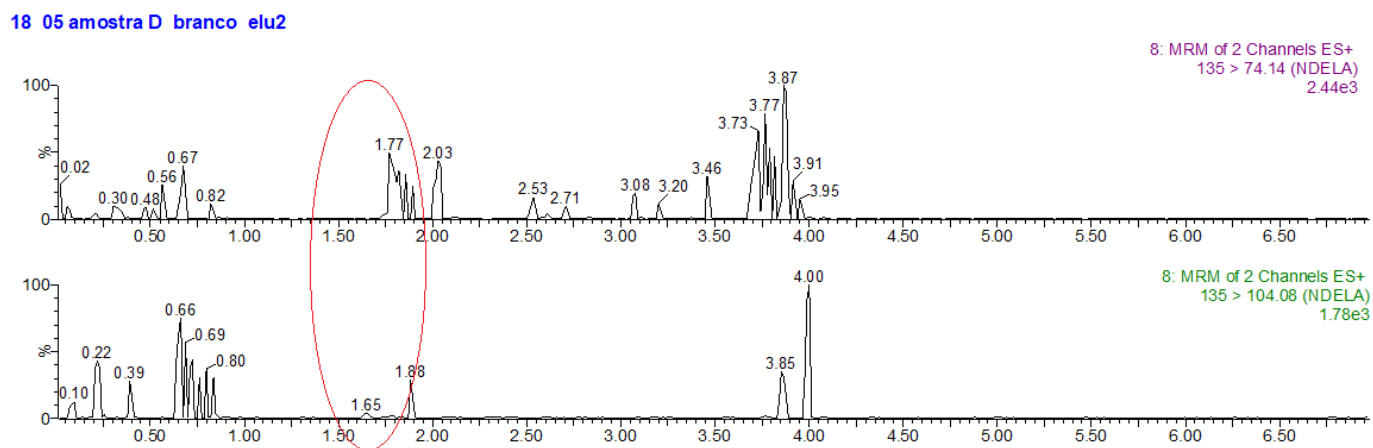
2) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra B



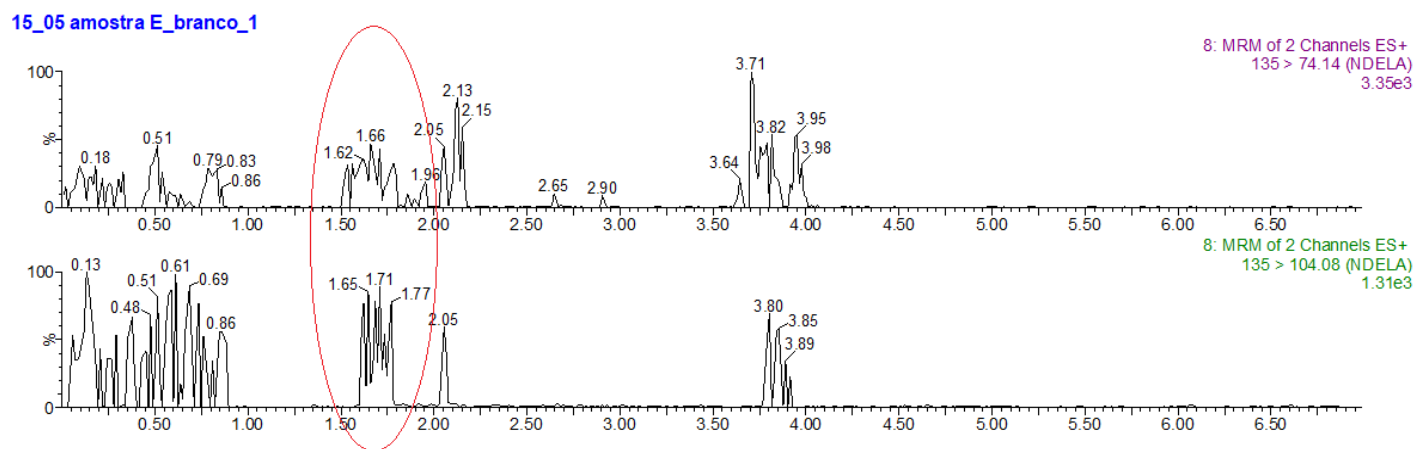
3) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra C



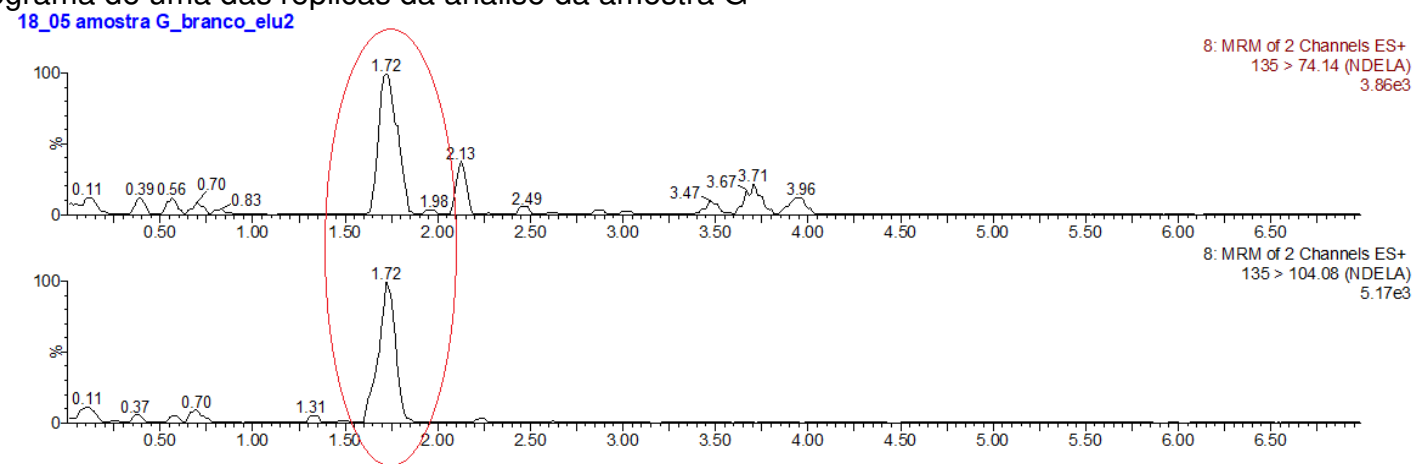
4) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra D



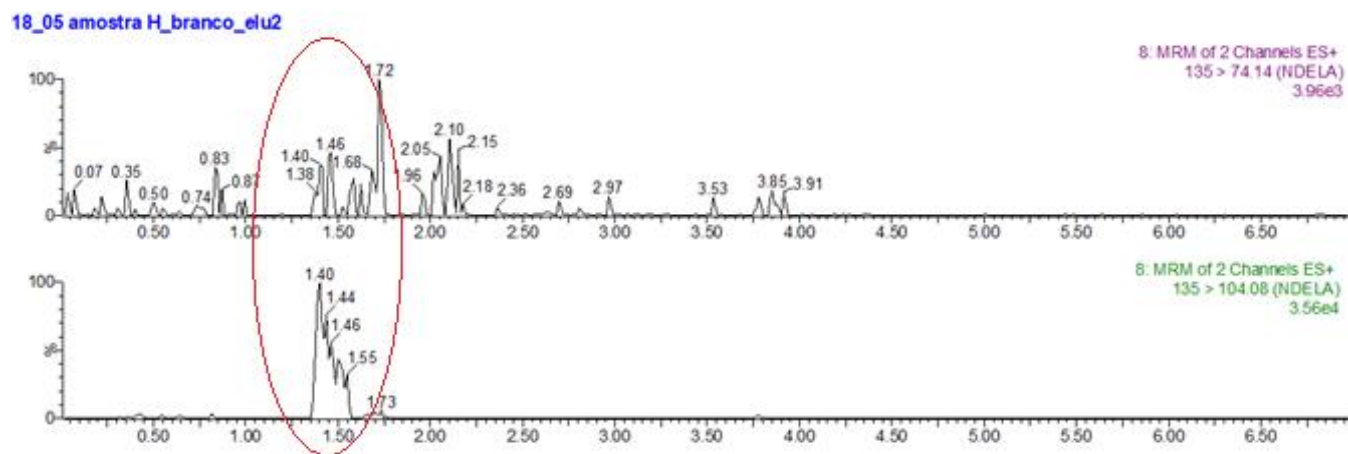
5) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra E



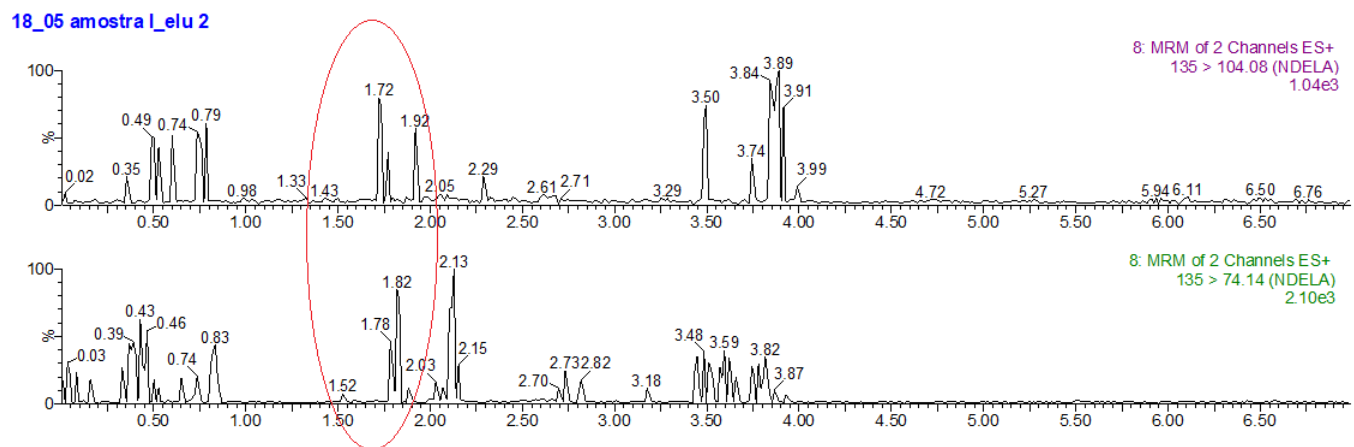
6) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra G



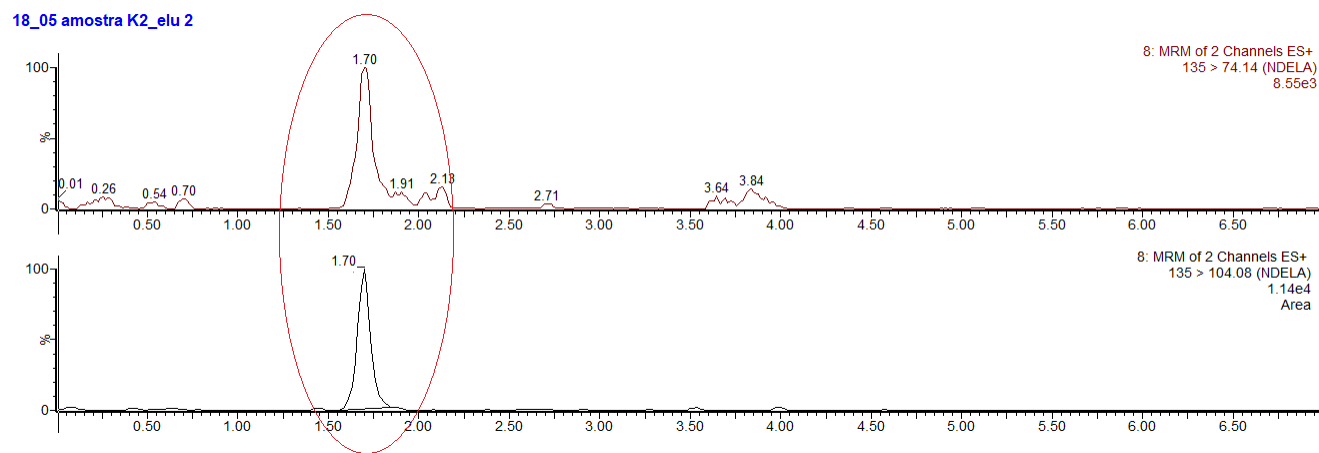
7) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra H



8) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra I



9) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra K



10) Cromatograma de uma das réplicas da análise da amostra L

