Universidade de São Paulo - USP
Instituto de Química de São Carlos - IQSC

Avaliação de diferentes técnicas de preparo de amostras e perspectiva de síntese de um polímero seletivo para a concentração de N-nitrosodietanolamina (NDELA) em matrizes cosméticas.

Amanda Quatrocchio Liporini

São Carlos, 2016

Amanda Quatrocchio Liporini

Avaliação de diferentes técnicas de preparo de amostras e perspectiva de síntese de um polímero seletivo para a concentração de N-nitrosodietanolamina (NDELA) em matrizes cosméticas.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof.^o Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos, 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Isabel e Amadeu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a espiritualidade amiga pela oportunidade de viver essa experiência terrestre tão carinhosamente amparada e protegida, tendo a chance de evoluir moralmente e intelectualmente através do estudo e pela profissão que optei por seguir;

A minha mãe, Maria Isabel. Minha inspiração, orgulho e maior amor.

Ao meu amado pai, Amadeu. Por não medir esforços para oferecer todas as condições necessárias para que eu consiga ser um ser humano melhor;

A minha irmã, Thalita. Por conviver comigo há décadas e compartilhar todos os meus bons e maus momentos. Pelas palavras de incentivo e pelos aconselhamentos, pela oportunidade de compartilhar uma trajetória de vida com você;

Ao meu orientador, Prof.º Fernando Lanças. Agradeço a oportunidade de integrar o Grupo de Cromatografia. Obrigada pela confiança, aprendizado e pela paciência com os prazos para a entrega desta dissertação;

Ao Prof.º Álvaro, sempre bastante atencioso e preocupado em sanar as dificuldades de todos os integrantes do grupo;

A Elaine e ao Guilherme, por desempenharem um ótimo trabalho e contribuírem para o bom funcionamento do laboratório;

A Letícia, ser humano incrível que tanto me orientou no andamento e conclusão deste trabalho. Lê, obrigada pela paciência, por todos os finais de semana que passamos trabalhando juntas, por todos os ensinamentos cromatográficos e pessoais que você me proporcionou, foi ótimo trabalhar com você;

Ao Felipe e a Lê, pelas correções e contribuições na redação da dissertação;

As amigas “crometes” Ana, Vivane, Mari, Lê, Scarlet, Maraíssa, Meire e Pati, pela amizade ao longo desses 2 anos de pós-graduação;

Aos funcionários do IQSC, os quais contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho;

Aos amigos do CROMA pela convivência e aprendizado;

A minha *best friend* Bia, irmã de alma que a vida me deu de presente. Amiga, obrigada por tudo;

As minhas queridas e amadas amigas que me acompanharam nessa fase e em tantas outras aventuras: Débora, Fer, Helo, Lê Carvalho, Lê Menegazzo, Fran, Lize, Dri, Vivis, Laís, Isa e Anna.

A minha psicóloga, Fabiana Esbaile. Admiro sua conduta profissional e agradeço todo o suporte emocional dispensado ao longo do ano de 2015;

Aos amigos de graduação da turma 08 do IQSC;

Ao Lucas, por despertar em mim o interesse pela cromatografia;

A família Allcrom, especialmente aos colegas do setor de vendas e aos meus coordenadores Aline e Sylvain. Foi muito bom iniciar a minha carreira profissional ao lado de vocês, agradeço a oportunidade e espero reencontrá-los em breve;

A Mérieux NutriSciences (Bioagri), aos meus atuais coordenadores Glaucia e Marcelo Toledo e a todos os integrantes do Laboratório de Espectrometria de Massas (LEM);

A CAPES pelo auxílio financeiro.

“... que não é preciso retribuir o mal com o mal; que o homem deve aceitar com humildade tudo o que tende a rebaixar-lhe o orgulho; que é mais glorioso para si ser ferido do que ferir, suportar pacientemente uma injustiça, do que ele próprio cometer uma; que vale mais ser enganado do que enganador, ser arruinado do que arruinar os outros. Só a fé na vida futura e na Justiça de Deus, que não deixa jamais o mal impune, pode dar a força de suportar pacientemente os golpes dirigidos contra os nossos interesses e o nosso amor-próprio; por isso, dizemos incessantemente: Dirigi vossos olhares para a frente; quanto mais vos eleveis pelo pensamento, acima da vida material, menos sereis magoados pelas coisas da Terra.”

RESUMO

A ocorrência de N-nitrosaminas em produtos cosméticos e de higiene pessoal está relacionada com os ingredientes utilizados na formulação de tais artefatos. A N-nitrosodietanolamina (NDELA) é formada na presença da dietanolamina associada a outros componentes, tais como íons nitrito empregados como conservantes em matrizes cosméticas. São cancerígenas e, portanto, as condições em que tais itens de consumo são fabricados é um fator que deve ser mensurado. Assim, é aconselhável a realização de estudos que mostrem a ocorrência de NDELA em cosméticos, seus principais métodos de determinação, bem como os aspectos legais que indicam os níveis de concentração deste contaminante presente em diversas formulações. Foi avaliado neste trabalho o potencial de algumas técnicas de preparo de amostras na concentração de NDELA, tais como microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (DLLME-RP), extração líquido-líquido com *salting out* e *clean up* no modo on-line. Os resultados obtidos foram confrontados com os dados presentes na literatura. Adicionalmente, utilizando os conceitos de polimerização via sol-gel e via precipitação para a síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP), propõem-se uma possível rota sintética para a confecção de materiais seletivos para a pré-concentração da nitrosamina.

ABSTRACT

The occurrence of N-nitrosamines in cosmetic and personal hygiene are related to the ingredients used in the formulation of such artefacts. N-nitrosodiethanolamine (NDELA) is formed in the presence of diethanolamine associated with other components such as nitrite ions employed as preservatives in cosmetic matrices. They are carcinogenic and, therefore, the conditions under which such consumer items are produced is a factor that must be measured. It is therefore advisable to carry out studies that show the occurrence of NDELA in cosmetics, their main methods of determination as well as the legal aspects that indicate the levels of concentration of this contaminant present in various formulations. It was evaluated in this study the potential for some sample preparation techniques in the concentration of NDELA such as liquid-liquid microextraction dispersive reverse phase (DLLME-RP) liquid-liquid extraction with salting out and clean up online. The results were compared with data in the literature. Additionally, using the concepts of polymerization via sol-gel and precipitation route for the synthesis of molecularly imprinted polymers (MIP) are proposed as a possible synthetic route for the preparation of materials for selective pre-concentration of nitrosamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral das N-nitrosaminas contendo o grupo funcional N-NO.....	17
Figura 2: Fórmula estrutural da molécula dietanolamina de ácidos graxos.....	17
Figura 3: Fórmula estrutural da molécula DEA e TEA, respectivamente.....	18
Figura 4: Estrutura representando a ressonância de elétrons do íon nitrito.....	18
Figura 5: Formação do ácido nitroso a partir do íon nitrito.....	18
Figura 6: Reação de formação de N-nitrosaminas.....	19
Figura 7: Fórmula estrutural da molécula NDELA.....	19
Figura 8: Etapas envolvidas na SPE utilizando cartuchos com a fase extratora. (A) Condicionamento do cartucho. (B) Aplicação da amostra. (C) Remoção de interferentes. (D) Eluição do analito.....	23
Figura 9: (A) Incorporação do template na rede polimérica; (B) Impressão molecular após remoção da molécula molde.....	24
Figura 10: Fórmula estrutural da molécula TEOS e APTMS, respectivamente.....	25
Figura 11: Ilustração da primeira etapa do processo sol-gel.....	25
Figura 12: Ilustração da segunda etapa do processo sol-gel.....	26
Figura 13: Fórmula estrutural ácido metacrílico (MAA), 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN) e trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM), respectivamente.....	27
Figura 14: Componentes de um HPLC.....	28
Figura 15: Gradiente de eluição utilizando no procedimento de clean up online de shampoo e creme hidratante.....	34
Figura 16: Ilustração do sistema de empacotamento utilizado para realizar os testes de carregamento com fases comerciais.....	35
Figura 17: Sistema utilizado na síntese do polímero.....	37
Figura 18: Fórmula estrutural do padrão interno N-Nitrosodiisopropanolamina (NDIPLA).	
Figura 19: Cromatograma de uma mistura contendo padrão analítico NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e padrão interno NDIPLA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna Zorbax XDB-C ₁₈ (150 x 0,3 mm; 3,5 μm). Vazão $5 \mu\text{L.min}^{-1}$. Volume de injeção 5 μL . Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm.....	39

Figura 20: Cromatograma de uma mistura contendo padrão analítico NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e padrão interno NDIPLA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna Acclaim PepMap RSLC ($150 \times 0,3 \text{ mm}$; $2 \mu\text{m}$). Vazão $5 \mu\text{L.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm39

Figura 21: Cromatograma de uma mistura contendo padrão analítico NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e padrão interno NDIPLA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna Zorbax XDB-C₁₈ ($150 \times 0,3 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$). Vazão $5 \mu\text{L.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm40

Figura 22: Fórmula estrutural do dodecil sulfato de sódio e da NDELA protonada em pH 3,15, respectivamente.....41

Figura 23: Cromatograma ilustrando uma extração líquido-líquido típica com *salting out* utilizando DCM como solvente extrator de NDELA. Concentração de Na_2SO_4 : 3M. Extração com 1 mL de DCM, $800 \mu\text{L}$ foram ressuspensos em $500 \mu\text{L}$ de água. Detecção por UV, comprimento de onda 234 nm43

Figura 24: Cromatogramas ilustrando uma extração líquido-líquido típica com *salting out* utilizando metilisobutilcetona (verde) e acetato de etila (roxo) como solventes extratores de NDELA. Concentração de Na_2SO_4 : 3M. Extração com 1 mL de ambos solventes orgânicos, $800 \mu\text{L}$ foram ressuspensos em $500 \mu\text{L}$ de água. Detecção por UV, comprimento de onda 234 nm44

Figura 25: Cromatograma ilustrando uma extração líquido-líquido típica com *salting out* utilizando metilisobutilcetona como solvente extrator de NDELA. Concentração de Na_2SO_4 : 3M. Extração com 1 mL de metilisobutilcetona, $800 \mu\text{L}$ foram ressuspensos em $500 \mu\text{L}$ de água. Detecção por UV, comprimento de onda 234 nm45

Figura 26: Cromatograma típico NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna ZORBAX Eclipse XDB-CN ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). Vazão $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm46

Figura 27: Sistema de válvulas empregadas no *clean up online* utilizado neste estudo com válvula de 10 pórticos na posição 10-1.....47

Figura 28: Sistema de válvulas empregadas no *clean up online* utilizado neste estudo com válvula de 10 pórticos na posição 1-2.....47

Figura 29: Cromatograma da amostra de *shampoo* fortificado com NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com injeção direta na coluna analítica. Coluna ZORBAX Eclipse XDB-CN; $4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$. Vazão $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm48

Figura 30: Cromatograma da amostra de *shampoo* fortificada com NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com coluna de *clean up* antecedendo a análise cromatográfica. Coluna ZORBAX Eclipse XDB-CN ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). Coluna Strata-X *home made* ($0,5 \times 50 \text{ mm}$, $30 \mu\text{m}$). Vazão $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm48

Figura 31: Sistema de carregamento de amostra empregado no estudo para avaliação da capacidade de retenção das fases disponíveis comercialmente.....	49
Figura 32: Injeção de amostra de água nas colunas de extração.....	50
Figura 33: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), 0% ACN.....	51
Figura 34: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), 0% ACN.....	51
Figura 35: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase a base de carbono, ($33 \mu\text{m}$), 0% ACN.....	52
Figura 36: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão fosfato pH 7.....	52
Figura 37: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), tampão fosfato pH 7.....	53
Figura 38: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.....	53
Figura 39: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.....	54
Figura 40: Injeção de amostra de <i>shampoo</i> nas colunas de extração.....	55
Figura 41: <i>Shampoo</i> fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), 0% ACN.....	55
Figura 42: <i>Shampoo</i> fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), 0% ACN	
Figura 43: <i>Shampoo</i> fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão fosfato pH 7.....	56
Figura 44: <i>Shampoo</i> fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.....	57
Figura 45: <i>Shampoo</i> fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.....	57
Figura 46: Sobreposição dos espectros de absorção na região de infravermelho para o MIP e NIP (processo sol gel).....	58
Figura 47: Imagens digitais obtidas durante a microscopia de varredura eletrônica do MIP-NDELA e do NIP, respectivamente. Polímeros sintetizados via processo sol-gel. Aumento de 20.000 vezes.....	59
Figura 48: Simulação do mecanismo de polimerização em meio básico.....	60
Figura 49: Simulação do mecanismo de polimerização em meio ácido.....	60
Figura 50: Polímero sintetizado via sol-gel.....	60
Figura 51: Polímero sintetizado utilizando matrizes orgânicas.....	60

Figura 52: Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho para NIP e MIP-NDELA (rota orgânica).....62

Figura 53: Imagens digitais obtidas durante a microscopia de varredura eletrônica do MIP-NDELA e do NIP, respectivamente. Polímeros sintetizados via reação de precipitação. Aumento de 20.000 vezes.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e restrições do <i>column switching</i>	24
Tabela 2: Técnicas analíticas e procedimentos de preparo de amostra empregados na análise de NDELA.....	31
Tabela 3: Volumes de DCM e concentração de sal utilizado no experimento.....	32
Tabela 4: Volumes de solventes e concentração de sal utilizado no experimento.....	33
Tabela 5: Volumes de metilisobutilcetona e concentração de sal utilizado no experimento....	33
Tabela 6: Condições cromatográficas empregadas no procedimento de <i>clean up online</i> de <i>shampoo</i> e creme hidratante.....	34
Tabela 7: Resultados obtidos empregando-se DCM como solvente extrator.....	42
Tabela 8: Resultados obtidos empregando-se diferentes solventes orgânicos no procedimento de extração.....	43
Tabela 9: Resultados obtidos empregando-se metilisobutilcetona como solvente extrator.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEA – Dietanolamina

TEA – Trietanolamina

NDELA – N-nitrosodietanolamina

NDIPLA – N-nitrosodiisopropanolamina

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

HILIC – Cromatografia líquida com interação hidrofílica

GC – Cromatografia gasosa

SPE – Extração em fase sólida

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva

DLLME-RP - Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa

MIP – Polímero molecularmente impresso

NIP – Polímero sem impressão molecular

TEOS – Tetraetilortosilicato

APTMS - 3-Aminopropiltriétoxissilano

MAA – Ácido metacrílico

AIBN - 2,2-Azobisisobutironitrila

TRIM - Trimetilolpropano trimetacrilato

DCM – Diclorometano

UV – Ultravioleta

ACN - Acetonitrila

IV – Infravermelho

MEV – Microscopia de varredura eletrônica

SUMÁRIO

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais, reacionais e legislativos

1.1.1 N-nitrosaminas.....	17
1.1.2 Formação de compostos nitrosos (N-nitrosaminas).....	18
1.1.3 NDELA e a legislação.....	20

1.2 Técnicas de preparo de amostras

1.2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	21
1.2.2 Extração em fase sólida (SPE).....	22
1.2.3 Polímeros molecularmente impressos (MIP).....	24

1.3 Cromatografia Líquida.....27

1.4 Técnicas empregas na análise de NDELA.....30

1.5 Objetivos.....31

2 Procedimento Experimental

2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME).....	32
2.2 Extração líquido-líquido com <i>salting out</i>	32
2.3 <i>Clean up online</i> e análise cromatográfica de <i>shampoo</i> e creme hidratante.....	33
2.4 Avaliação da capacidade de retenção de NDELA em fases disponíveis comercialmente.....	34
2.5 Síntese do MIP	
2.5.1 Via processo sol-gel (interações não-covalentes).....	36
2.5.2 Rota utilizando matrizes orgânicas (interações não-covalentes).....	37

3 Resultados e discussões

3.1 Avaliações preliminares.....	38
3.2 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME).....	41
3.3 Extração líquido-líquido com <i>salting out</i>	42
3.4 <i>Clean up online</i> e análise cromatográfica de <i>shampoo</i> e creme hidratante.....	46
3.5 Avaliação da capacidade de retenção de NDELA em fases disponíveis comercialmente.....	49
3.6 Síntese do MIP	
3.6.1 Via processo sol-gel (interações não-covalentes).....	58
3.6.2 Rota utilizando matrizes orgânicas (interações não-covalentes).....	61
3.7 Comparação entre as duas rotas sintéticas.....	64

4 Conclusões e perspectivas futuras.....65

5 Referências Bibliográficas.....66

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais, reacionais e legislativos

1.1.1 N-nitrosaminas

Numerosas matérias primas são utilizadas na fabricação de cosméticos e artigos de higiene pessoal. Tais ingredientes fornecem características específicas ao produto, conferindo propriedades farmacológicas de acordo com a função que irão desempenhar. A mistura de determinados ingredientes e o tempo prolongado de estocagem são fatores que podem ocasionar a formação de substâncias indesejadas, como é o caso da ocorrência de N-nitrosaminas.¹

As N-nitrosaminas são classificadas como compostos N-nitrosos que podem estar presentes em produtos como alimentos, bebidas, medicamentos, agrotóxicos, derivados de borracha, cosméticos e produtos de higiene pessoal. São consideradas cancerígenas e, por essa razão, foram amplamente estudadas nos últimos cinquenta anos. Compostos N-nitrosos possuem o grupo funcional N-NO em sua estrutura. A Figura 1 ilustra o grupo funcional presente na estrutura das N-nitrosaminas.²

Figura 1 - Estrutura geral das N-nitrosaminas contendo o grupo funcional N-NO.

A escolha das matérias primas utilizadas na formulação dos produtos cosméticos irá conduzir ou não ao aparecimento de N-nitrosaminas. Na formulação do *shampoo*, por exemplo, a matéria prima base empregada são substâncias orgânicas tensoativas, também chamados de surfactantes. Os surfactantes apresentam a propriedade de reduzir a tensão superficial da água e são classificados como compostos anfifílicos, uma vez que em sua estrutura há presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Os tensoativos mais utilizados são os não iônicos e representados pelas alcanolamidas de ácidos graxos.³

Figura 2: Fórmula estrutural da molécula dietanolamina de ácidos graxos.

Já na formulação de cremes hidratantes, a matéria prima base utilizada é o emulsificante, substância capaz de ajudar a formação de uma mistura estável de duas substâncias anteriormente imiscíveis. Variações das alcanolaminas de ácidos graxos, como a dietanolamina (DEA) e trietanolamina (TEA), também constituem o produto, uma vez que reforçam a formação de espuma e desempenham função emulsificante em ambas as formulações. Alcanolamidas de ácidos graxos e suas variantes não são consideradas cancerígenas, mas pode contribuir como precursoras na formação de N-nitrosaminas.³

Figura 3 - Fórmula estrutural da molécula DEA e TEA, respectivamente.

Também frequentes nas formulações de *shampoos* e cremes hidratantes, os agentes nitrosantes são compostos adicionados ao produto a fim de assegurar a sua conservação. Dentre os agentes nitrosantes, destacam-se o 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano (Bronidox[®]) e o 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol[®]). O ânion nitrito é um íon liberado pelos agentes nitrosantes e, em contato com aminas secundárias e/ou terciárias, pode acarretar a formação das N-nitrosaminas.⁴

Figura 4: Estrutura representando a ressonância de elétrons do íon nitrito.

1.1.2 Formação de compostos nitrosos (N-nitrosaminas)

O processo de reação entre aminas e o íon nitrito se dá, em um primeiro momento, pelo fato de o íon nitrito ser pouco estável e capaz de originar o ácido nitroso.

Figura 5: Formação do ácido nitroso a partir do íon nitrito.

O ácido nitroso, por sua vez, decompõe-se no cátion nitrosil ($\text{N}=\text{O}^+$) e no ânion hidroxil (OH^-). O cátion nitrosil, comportando-se como um eletrófilo, é atraído pela região de alta densidade eletrônica da amina, aceitando o par de elétrons e dando origem o composto N-nitroso correspondente.

Figura 6: Reação de formação de N-nitrosaminas.

A dietanolamina de ácidos graxos é a amina majoritária empregada na elaboração de matrizes cosméticas e produtos de higiene pessoal e principal precursora da N-nitrosodietanolamina (NDELA). A NDELA é classificada como um composto N-nitroso não volátil, de baixo peso molecular e de caráter polar. A sua presença em cosméticos foi relatada pela primeira vez em 1977 e, quando presente em artigos de higiene pessoal, é facilmente absorvida através da pele, acumulando-se em órgãos como fígado, rins e bexiga e induzindo efeitos toxicológicos crônicos. A estrutura da NDELA está representada na Figura 5.

Figura 7 - Fórmula estrutural da molécula NDELA.

1.1.3 NDELA e a legislação

A incidência de NDELA em matrizes cosméticas é controlada pela legislação, visando prevenir efeitos adversos sob a saúde dos consumidores. Não estão relatadas recomendações legais para um limite máximo de resíduo aceitável de N-nitrosaminas em produtos comercializados. As legislações mais relevantes são mencionadas a seguir:

- Resolução colegiada da ANVISA (RDC N° 48, de 16 de março de 2006)⁵

Lista substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal e cosméticos por serem consideradas cancerígenas ou tóxicas. Dentre elas, encontram-se as alcanolamidas de ácidos graxos e as N-nitrosaminas;

- Resolução colegiada da ANVISA (RDC N° 29, de 1° de junho de 2012)⁶

Enumera substâncias de ação conservantes permitidas em produtos cosméticos e de higiene pessoal, indicando a concentração máxima permitida dos agentes nitrosantes Bronopol[®] e Bronidox[®], compostos que podem favorecer a ocorrência de N-nitrosaminas;

- Regulamento (CE) N° 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de junho de 2009⁷

Estabelece o regime de controle das matérias primas relacionadas com a formação de substâncias perigosas em cosméticos, incluindo as N-nitrosaminas. Estabelece teores máximos de alcanolamidas de ácidos graxos no produto pronto para uso, que variam de 0,5% a 2,5% da composição final;

- Resolução colegiada da ANVISA (RDC N° 4, de 30 de junho de 2014)⁸

Dispõe dos requisitos técnicos como rotulagem e armazenamento para regularização de produtos de higiene pessoal e cosméticos;

- Comitê Científico de Segurança dos Consumidores (*Scientific Committee on Consumer Safety – SCCS*)²

Traz informações sobre os possíveis riscos de saúde que os consumidores podem ser expostos caso ocorra contato com produtos contaminados com N-nitrosaminas.

1.2 Técnicas de preparo de amostras

Independente da técnica analítica escolhida, etapas de preparo de amostra quase sempre são necessárias e antecedem as análises químicas. Processos como a dissolução, secagem e moagem são procedimentos simples, mas responsáveis por transformar a natureza física da amostra de acordo com o tipo de análise escolhida. O emprego de técnicas analíticas elaboradas define tratamentos preliminares da amostra, os quais serão selecionados a fim de eliminar interferentes da matriz complexa e, no caso de técnicas de separação, diminuir as chances de deterioração da coluna cromatográfica. A associação de técnicas de preparo de amostra com a análise por cromatografia líquida e/ou gasosa tornou-se uma ferramenta comum e versátil em ambientes corporativos e de pesquisa acadêmica.

1.2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction* - LLE) foi, por muitos anos, uma técnica recorrente no preparo de amostras líquidas e baseia-se na solubilidade do analito de interesse na presença de dois solventes imiscíveis. O emprego de grandes quantidades de solventes tóxicos aliado aos riscos e preocupações ambientais contribuiu para o desenvolvimento de técnicas que visaram sanar tais dificuldades.⁹

A microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* - DLLME) é uma técnica de extração e pré-concentração da amostra e que atende os requisitos de análises modernas: utiliza pouca quantidade de solvente (μL), é de baixo custo e permite análises rápidas e eficientes.¹⁰

A técnica consiste na adição de um solvente dispersor e extrator na amostra, a qual é preferencialmente aquosa neste tipo de extração. O solvente dispersor deve ser miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa) e é ele o responsável pela dispersão do solvente extrator na fase aquosa, favorecendo a transferência do analito de baixa polaridade da água para a fase orgânica. Já a escolha do solvente extrator restringe-se a sua imiscibilidade na água.

Alguns fatores como quantidade e tipo de solvente dispersor e extrator influenciam a eficiência da DLLME. Tais parâmetros devem ser testados e ajustados durante o procedimento de preparo de amostra. O volume de solvente extrator utilizado irá determinar o fator de pré-concentração da DLLME, assim como o volume de solvente dispersor irá auxiliar o processo de dispersão dos componentes do sistema.

Solventes extratores orgânicos irão conter os analitos pré-concentrados pela técnica, porém não são compatíveis com análises por cromatografia líquida em fase reversa, uma vez que o solvente do extrato de injeção deve ser miscível na fase móvel da corrida cromatográfica. Dessa forma, muitas vezes é necessário a reconstituição do extrato com um solvente apropriado, passo adicional que pode ser evitado com uma nova proposta para a DLLME. A DLLME em fase reversa (*Reversed Phase DLLME* – RP-DLLME) substitui os solventes orgânicos extratores por água. Logo, o extrato estará concentrado na fase aquosa e poderá ser encaminhado diretamente ao cromatógrafo líquido.¹¹

1.2.2 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE) tornou-se conhecida no final dos anos 70 e é baseada nos princípios de separação da cromatografia líquida clássica: sorção seletiva do analito em material sólido e posterior remoção com solventes.¹² Mostrou-se uma técnica promissora, pois apresentou importantes características não contempladas na técnica anterior:

- Menor consumo de solvente

Se comparada com a LLE, a SPE produz menores quantidades de resíduos já que a passagem de poucos microlitros (μL) de solvente pela fase extratora já é capaz de provocar a dessorção do analito de interesse;

- Diversidade de formatos

O dispositivo mais conhecido da SPE consiste em cartuchos (seringas) de polipropileno, os quais armazenam a fase extratora. Os estágios compreendidos no processo de extração empregando SPE em cartucho estão ilustrados na Figura 8.

Inicialmente, o condicionamento do cartucho é necessário para assegurar que os sítios de interação da fase estacionária estejam disponíveis para o processo de extração. A aplicação da amostra na fase extratora é o próximo passo. O composto que apresentar afinidade com o sólido de extração ficará retido, ao passo que o interferente será removido pela passagem de um solvente de lavagem. Finalmente, a escolha de um solvente de força eluotrópica adequada desloca o analito que estava adsorvido na fase extratora para a fase móvel.¹³

Figura 8: Etapas envolvidas na SPE utilizando cartuchos com a fase extratora. (A) Condicionamento do cartucho. (B) Aplicação da amostra. (C) Remoção de interferentes. (D) Eluição do analito.

- Acoplamento com a cromatografia líquida

O desenvolvimento da técnica possibilitou que novos modos de operação fossem idealizados a fim de diminuir o tempo e o contato do analista na etapa do preparo da amostra. O modo de operação conhecido como *column switching* permitiu que processos de extração realizados em múltiplos passos fossem transformados em uma única etapa e acoplado em linha ao sistema cromatográfico. Um arranjo típico *column switching* é de fácil execução em qualquer laboratório usando válvulas de comutação simples e colunas de extração comerciais^[9].

O uso da técnica *column switching* tornou-se bem aceita e bastante utilizada, pois apresenta características que simplificam os passos laboriosos de uma SPE em seu formato convencional. Porém, ainda possui algumas limitações, principalmente instrumentais. A Tabela 1 apresenta as principais vantagens e restrições da técnica *column switching*.¹⁴

Tabela 1: Vantagens e restrições do *column switching*

<i>Column Switching</i>	
Vantagens	Restrições
✓ Menor manipulação da amostra	✗ Requer válvulas de comutação
✓ Possibilidade de total automação	✗ Manutenção periódica das colunas de extração
✓ Redução do tempo do preparo de amostra	✗ Sistema de bombeamento adicional pode ser necessário
✓ Análises reprodutíveis	
✓ Menor consumo de solventes	

1.2.3 Polímeros molecularmente impressos (MIP)

A síntese de materiais sorventes com características individuais para inúmeras classe de compostos é uma tentativa promissora e colabora com etapas de preparo de amostras mais rápidas e eficientes. O reconhecimento molecular é uma das vantagens que os polímeros molecularmente impressos (MIP) oferecem na etapa de preparação das matrizes complexas, procedimento necessário em muitos casos e que antecede análises cromatográficas. Sendo assim, é possível definir os MIPs como materiais que possuem cavidades tridimensionais em sua rede polimérica, as quais são compatíveis com o tipo de molécula molde (*template*) escolhida para o processo de síntese (Figura 9). A formação de tais sítios de reconhecimento confere ao MIP alta seletividade e capacidade de identificar a presença do analito, aprisionando-os em tais cavidades e, conseqüentemente, potencializando a remoção dos interferentes da matriz complexa.¹⁵

Figura 9: (A) Incorporação do *template* na rede polimérica; (B) Impressão molecular após remoção da molécula molde.

A forma de ligação mais comum entre o complexo polímero-*template* é por interações não-covalentes, como as iônicas e ligações de hidrogênio. Tais modos de interações são os mais adotados pois não envolvem a formação e quebra de ligações químicas. Sendo assim, as rotas sintéticas disponíveis para confecção do polímero são classificadas em dois grandes grupos: rotas empregando matrizes híbridas (inorgânica-orgânica) e rotas utilizando matrizes orgânicas.¹⁶

O processo sol-gel é um método de síntese que utiliza reagentes primários oriundos dos alcóxidos de silício como, por exemplo, o tetraetilortosilicato (TEOS) e 3-aminopropiltrietoxissilano (APTMS), representados esquematicamente pela Figura 10.

Figura 10 - Fórmula estrutural da molécula TEOS e APTMS, respectivamente.

O início do método consiste na etapa de hidrólise (Figura 11), processo em que ocorre a subtração de moléculas de água da estrutura do alcóxido de silício, dando origem a intermediários que apresentam os grupos silanóis em sua composição.

Figura 11: Ilustração da primeira etapa do processo sol-gel.

Etapa de hidrólise

Em seguida, a formação de ligações siloxano entre os grupos silanóis formados na primeira fase acontece com a adição do segundo alcóxido de silício, neste caso, o 3-aminopropiltrietoxissilano (APTMS), estágio de reação conhecida como condensação (Figura 12). Nesta fase, que acontece simultaneamente com a hidrólise, é recorrente o emprego de catálise ácida ou básica para acelerar a formação da rede polimérica.

Figura 12: Ilustração da segunda etapa do processo sol-gel.

Etapas de condensação

Outra alternativa de síntese disponível para confecção do MIP é a síntese por precipitação, a qual emprega monômeros orgânicos ácidos ou básicos de acordo com a natureza do *template*. Se a molécula molde apresenta eixos doadores de elétrons (caráter básico), é recomendável o uso de monômeros ácidos (ácido metacrílico). Do mesmo modo, caso a molécula molde apresente grupos aceptores de elétrons (caráter ácido), recomenda-se o emprego de monômeros básicos (vinilpiridina). A interação analito-monômero deve ser estável o suficiente para formar os sítios de reconhecimento e fraca o suficiente para permitir a retirada do molde de forma que as cavidades não sejam destruídas. Tal interação é governada por um processo em equilíbrio e, por essa razão, recomenda-se a utilização de quantidades molares superiores de monômeros em relação à molécula molde (4 monômero: 1 molécula molde) para que prevaleça o complexo analito-monômero durante o processo dinâmico de deslocamento do equilíbrio.¹⁵

A função principal do solvente é garantir a porosidade do polímero e solubilizar totalmente os reagentes envolvidos na técnica de síntese. O uso do agente de ligação cruzada (TRIM) confere rigidez e propriedades tridimensionais ao material sintetizado, assim como o emprego do iniciador radicalar (AIBN) produz radicais livres na superfície do monômero, colaborando para iniciar a reação de polimerização. A Figura 13 ilustra os reagentes empregados na síntese por precipitação.¹⁷

Figura 13 - Fórmula estrutural do ácido metacrílico (MAA), 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN) e trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM), respectivamente.

As metodologias existentes para a confecção de MIP são extensas e apresentam vantagens e desvantagens, as quais serão discutidas na seção de resultados e discussões deste trabalho. Entretanto, a síntese utilizando a NDELA como molécula molde não foi publicada até o momento na literatura, ocasionando dúvidas acerca do melhor caminho para alcançar o sucesso da impressão molecular para tal molécula.

1.3 Cromatografia Líquida

A história da cromatografia líquida (LC) começou em 1906 com estudos desenvolvidos por Mikhail Semenovitch Tswet que observou ser possível separar os componentes coloridos dos extratos de plantas utilizando colunas preenchidas com carbonato de cálcio, seguido da passagem de éter de petróleo. Desde então, a cromatografia é conhecida como uma técnica de separação que envolve o equilíbrio dos componentes entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária.

Até meados dos anos 60, a passagem do solvente (fase móvel) pelo leito cromatográfico (fase estacionária) era feita a pressão ambiente e, por esse motivo, as análises poderiam demorar horas até serem finalizadas. As melhorias posteriores objetivaram reduzir os tempos de análise e foi neste contexto que, em 1970, os sistemas de LC passaram a ser comercializados com bombas de alta pressão, proporcionando um fluxo rápido da fase móvel, sendo hoje denominada como cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - *HPLC*). Foi também nesse período em que a cromatografia líquida

foi acoplada a detectores que identificavam a natureza do composto e, através de um sistema de aquisição de dados, geravam cromatogramas.¹⁸ O diagrama de blocos da Figura 14 ilustra os componentes de um HPLC e a sequência em que a análise cromatográfica acontece.

Figura 14: Componentes de um HPLC.

O solvente, que está armazenado no reservatório de fase móvel, é impulsionado pelo sistema de bombeamento até o sistema de injeção. Esse sistema é composto por uma válvula de seis pórticos e pela alça de amostragem (*loop*). Quando a válvula está na posição de carga (*load*), o *loop* é preenchido com a amostra que será encaminhada até a coluna cromatográfica, alocada no compartimento que contém o forno. A coluna analítica realiza a separação cromatográfica dos componentes da amostra e o detector é responsável por elucidar a natureza de tais componentes a partir de um sistema de aquisição de dados.

Para promover o desenvolvimento da técnica cromatográfica, muitos avanços foram alcançados na tentativa de reduzir tempos de análise e conseguir cromatogramas com resoluções melhores. Entre 1970 e 1990, houve uma intensa preocupação pela diminuição do tamanho das partículas usadas para o empacotamento das colunas analíticas. Partículas peliculares rígidas com diâmetro interno de 40µm foram substituídas por partículas porosas de 3,5µm, mudança que foi responsável por aumentar bastante a eficiência cromatográfica, possibilitando melhores transferências de massa e fluxos mais rápidos de fase móvel.¹⁹

Os esforços voltados para a redução das partículas cromatográficas foram reprimidos após a introdução das partículas sub-2µm, em 2004. Tais partículas provocam um aumento considerável na pressão do sistema e não poderiam ser empregadas em HPLC convencionais, pois tais equipamentos não haviam sido projetados para suportar pressões tão elevadas. Dessa forma, o uso de partículas sub-2µm só foi possível com o desenvolvimento de novos cromatógrafos que tolerassem pressões maiores, na faixa de 600 a 1000 bars. Essa nova

apresentação da técnica foi chamada de cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography - UHPLC*).²⁰

As grandes inovações na cromatografia líquida quase sempre convergiam para o mesmo caminho: diminuição do diâmetro interno das partículas e encurtamento do comprimento da coluna. Por esse motivo, a miniaturização da cromatografia líquida ficou estagnada por muitos anos e só ganhou destaque recentemente.

A tentativa de miniaturizar a técnica iniciou-se em 1957 com a redução do diâmetro interno das colunas empregadas em cromatografia gasosa. Nesse mesmo período, o emprego de tais colunas em cromatografia líquida ainda se apresentou muito restrito, pois havia dificuldade na elaboração de estratégias para empacotar colunas de baixo diâmetro interno, além de requerer uma instrumentação apropriada e delicada para suportar os efeitos de tal diminuição. Por consequência, as análises por cromatografia líquida executadas em tais colunas exibiam um perfil cromatográfico abaixo do esperado, com alargamento de bandas devido a tecnologia limitada de empacotamento e pela utilização de detectores com celas de detecção incompatíveis com a escala capilar.²¹

A partir do aprimoramento tecnológico ao longo de algumas décadas, foi possível usufruir dos benefícios que a cromatografia capilar oferece em relação ao formato convencional. Dentre eles, a diminuição drástica do consumo de fase móvel é uma vantagem que se destaca principalmente pela questão ambiental, uma vez que o solvente mais empregado em fase reversa é a acetonitrila. Além da incineração, ainda não se encontram disponíveis procedimentos de recuperação e descarte adequado para este solvente.

Outro avanço é o menor consumo de fase estacionária e, portanto, um melhor aproveitamento de adsorventes sintetizados em laboratório e que estão aptos a serem aplicados como excelentes fases de adsorção em cromatografia líquida. Além disso, a quantidade de amostra necessária para análises na escala capilar também é reduzida, pois o volume de amostra é proporcional ao quadrado do diâmetro interno da coluna.

O emprego de menores quantidades de fase móvel proporciona amostras menos diluídas no leito cromatográfico, potencializando a sensibilidade do método analítico. O uso de detectores sensíveis a concentração favorece o ganho em sensibilidade na detecção das bandas cromatográficas eluídas.

A programação de temperatura é uma ferramenta versátil em cromatografia gasosa, porém pouco explorada em cromatografia líquida na escala convencional. A principal barreira deve-se ao fato de que colunas com maiores diâmetros exibem alta capacidade térmica, favorecendo a criação de um gradiente radial de temperatura dentro da tubulação. Com o

advento da escala capilar, foi possível incorporar a programação de temperatura no desenvolvimento de métodos analíticos e verificar alterações em alguns parâmetros do sistema, como pressão de vapor, viscosidade e difusão molecular do analito no solvente.

Por fim, o acoplamento da cromatografia com diversos sistemas de detecção foi intensificado com a prosperidade da escala capilar. O espectrômetro de massas, por exemplo, é facilmente acoplado a sistemas miniaturizados. Verifica-se que uma das maiores vantagens é que a quantidade de fase móvel encaminhada ao detector é compatível com a baixa quantidade requerida pelas interfaces de ionização empregadas em espectrometria de massas (Mass Spectrometry – MS). Desse modo, essa conexão instrumental torna-se viável e apresenta-se como uma importante ferramenta analítica na elucidação estrutural de compostos desconhecidos.¹⁸

1.4 Técnicas empregadas na análise de NDELA

A tabela 2 organiza a técnica analítica relacionada com o preparo de amostra empregado na análise de NDELA de alguns trabalhos coletados durante levantamento bibliográfico. A SPE é uma técnica clássica de preparo de amostra e bastante útil quando o analista deseja purificar amostras complexas ou pré-concentrar os analitos selecionados. No caso da NDELA, os trabalhos publicados aplicam os cartuchos de extração para limpeza da matriz cosmética. O emprego ideal da técnica seria aliar fases estacionárias capazes de adsorver a nitrosamina com volumes de solventes de força eluotrópica adequada para posteriormente retirá-la do cartucho. Desse modo, a possibilidade de percolar os tubos de SPE com maiores volumes de amostra e obter extratos enriquecidos com o analito que antes encontrava-se diluído é uma estratégia desafiadora na análise de N-nitrosodietanolamina, principalmente porque as fases disponíveis comercialmente possuem pouca capacidade de retenção do composto em questão.

À vista disso, o presente trabalho objetiva avaliar o quão eficiente é o emprego da técnica de SPE com relação a remoção dos interferentes. A intenção também é verificar a possibilidade de automação do procedimento de *clean up*. Desse modo, os testes foram realizados em cromatógrafos equipados com válvulas de comutação, item indispensável para acoplar o procedimento de preparo de amostra com a separação cromatográfica. Outras duas alternativas de preparo de amostras foram avaliadas para a concentração da molécula: DLLME-RP e extração líquido-líquido com *salting out*. A perspectiva de síntese de um polímero que apresente afinidade pela NDELA também foi explorada.

Tabela 2: Técnicas analíticas e procedimentos de preparo de amostra empregados na análise de NDELA encontrados na literatura

Método Analítico	Preparo de amostra	Matriz escolhida	Concentração NDELA
HPLC – MS ²²	<i>Clean up</i> (SPE – C18); formação de complexo com 1-octanosulfonato de sódio; extração líquido-líquido.	Produtos cosméticos	0,04 – 16,42 $\mu\text{g.g}^{-1}$
HPLC – DAD ²³	Extração líquido-líquido	Produtos cosméticos; Fluídos biológicos	0,65 – 1,89 ng.mL^{-1}
HPLC-UV/GC-MS ²⁴	<i>Clean up</i> (HPLC); derivatização (GC)	Produtos cosméticos	50 ng.mL^{-1}
GC – TEA ²⁵	<i>Clean up</i>	Produtos cosméticos	5.3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$
HPLC – TEA ²⁶	-----	Produtos cosméticos	43 ng.mL^{-1}
HPLC – TEA ²⁷	<i>Clean up</i>	Produtos cosméticos	5- 47000 ng.g^{-1}
GC – MS ²⁸	SPME <i>headspace</i> (fibra de sílica fundida de hidróxido de alumínio)	Produtos cosméticos	20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$
GC – ECD ²⁹	<i>Clean up</i> e derivatização	Produtos cosméticos	0 – 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$
GC – TEA ³⁰	<i>Clean up</i>	Fluídos biológicos (Urina)	67 ng.mL^{-1}
GC – MS ³¹	<i>Clean up</i> (SPE – Oasis HLB)	Produtos Cosméticos	2,5 – 12,5 mg.kg^{-1}
UHPLC – MS/MS ³²	<i>Clean up</i> ; extração líquido-líquido	Produtos cosméticos	20 – 74,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$

1.5 Objetivos

- Avaliação do poder de concentração de NDELA pelas seguintes técnicas de preparo de amostra: DLLME, LLE com *salting out* e SPE no modo on-line;
- Síntese de um polímero para NDELA através de rotas inorgânicas (processo sol-gel) e orgânicas (método de precipitação).

2. Procedimento Experimental

2.1 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME)

A princípio, verificou-se a solubilidade do *shampoo* e do creme hidratante na presença de três solventes orgânicos: hexano, acetato de etila e metilisobutilcetona. Pesou-se 1 g de *shampoo*/creme hidratante em um tubo falcon, adicionou-se 15 mL de hexano e agitou-se em *vortex* por 30 minutos a 2000 rpm. Empregou-se o mesmo procedimento experimental em acetato de etila e metilisobutilcetona. A próxima etapa seria verificar o comportamento da amostra diluída em solvente orgânico adicionando metanol como solvente difusor e água como solvente extrator. Os volumes de ambos seriam ajustados de acordo com a resposta dos testes.

2.2 Extração líquido-líquido com *salting out*

Pesou-se sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) em um tubo falcon, solubilizou-se o sal em 6 mL de água mili-Q e fortificou-se a solução com 250 μL de uma solução 100 $\mu\text{g/mL}$ de NDELA. Adicionou-se diclorometano (DCM) nos volumes apresentados na Tabela 3. Em seguida, agitou-se a mistura por 2 minutos, a qual foi encaminhada para centrífuga por 4 minutos a uma velocidade de 5000 rpm. Finalmente, encaminhou-se uma alíquota da fase aquosa para análise cromatográfica e secou-se as alíquotas orgânicas sob fluxo de nitrogênio, recompondo-as em 500 μL água para injeção no HPLC.

Tabela 3: Volumes de DCM e concentração de sal utilizado no experimento

Concentração Na_2SO_4 (mol.L^{-1})	Volume DCM (mL)
3 M (2,72g)	6
3 M	1
3 M	2
3 M	3
3 M	4
2 M (1,7g)	6
2 M	2
2 M	3
2 M	4

Após os testes com DCM, analisou-se outros solventes para a extração, seguindo os mesmos passos do procedimento anterior. A Tabela 4 indica a escolha dos solventes e a proporção de sal utilizada.

Tabela 4: Volumes de solventes e concentração de sal utilizado no experimento

Solvente	Concentração Na ₂ SO ₄ (mol.L ⁻¹)	Volume (mL)
Acetonitrila	2 M	1
DCM/Acetona (40:60)	2 M	1
Metilisobutilcetona	2 M	1
Acetato de etila	3 M	1

Após avaliar os potenciais de extração dos solventes anteriores, realizou-se testes adicionais com o solvente metilisobutilcetona seguindo os mesmos passos relatados no procedimento anterior.

Tabela 5: Volumes de metilisobutilcetona e concentração de sal utilizado no experimento

Concentração Na ₂ SO ₄ (mol.L ⁻¹)	Volume metilisobutilcetona (mL)
2 M	2
3 M	2
3 M	1
2 M	0,5
3 M	0,5

2.3 *Clean up online* e análise cromatográfica de *shampoo* e creme hidratante na escala convencional

Pesou-se 1 g de *shampoo*/creme hidratante em um tubo falcon, adicionou-se 15 mL de água Milli-Q e agitou-se em *vortex* por 30 minutos a 2000 rpm. Em seguida, encaminhou-se a mistura para centrifugação por 4 minutos a 5000 rpm e retirou-se o sobrenadante, fortificando-o com uma solução de 5 µg.mL⁻¹ de NDELA. Uma alíquota foi retirada para injeção no sistema cromatográfico HPLC Shimadzu 20A Prominence (Kioto, Japão) com detecção por UV.

A Tabela 6 e a Figura 15 ilustram as condições cromatográficas e o gradiente de eluição utilizados neste estudo.

Tabela 6: Condições cromatográficas empregadas no procedimento de *clean up online* de *shampoo* e creme hidratante

Condições Cromatográficas	
Coluna analítica	ZORBAX Eclipse XDB-CN (4.6 x 250 mm, 5 μ m)
Coluna de clean up	Strata-X <i>home made</i> (0.5 x 50 mm, 30 μ m)
Volume de injeção	5 μ L
Temperatura do forno	30°C
Fluxo da fase móvel	0,5 mL.min ⁻¹

Figura 15 : Gradiente de eluição utilizando no procedimento de clean up online de shampoo e creme hidratante.

2.4 Avaliação da capacidade de retenção de NDELA em fases disponíveis comercialmente em escala miniaturizada

As opções de fases sorventes disponíveis comercialmente são amplas e, por esse motivo, torna-se interessante testá-las para verificar qual apresenta poder de retenção para a NDELA.

Para realizar o teste, foram preparadas colunas de extração em aço inoxidável (50 mm x 508 μ m). Tais colunas foram empacotadas através de uma bomba LC-20AT (Shimadzu, Kioto, Japão) que impulsionava o solvente para uma pré-coluna, a qual continha a fase estacionária em suspensão e que seria utilizada para preencher a tubulação. Conectou-se a coluna de extração diretamente na pré-coluna por tubulações em aço e, à medida que o solvente encaminhava a fase estacionária da pré-coluna para a coluna de extração, o fluxo de

empacotamento seguia constante até o completo preenchimento da tubulação (Figura 16). O procedimento descrito foi realizado para as seguintes fases: C₁₈, Strata-X, fase a base de carbono e MIP.

Figura 16: Ilustração do sistema de empacotamento utilizado para realizar os testes de carregamento com fases comerciais.

O equipamento utilizado para o procedimento de avaliação das colunas de extração foi *UltiMate*TM 3000 RSLCnano (Thermo Scientific Dionex) com detecção UV. As fases móveis empregadas na análise foram ACN/Água, ACN/Tampão Fosfato pH 7* e ACN/Tampão Formiato pH 3,75**. Uma solução de 1 µg.mL⁻¹ de NDELA foi encaminhada para injeção, bem como o shampoo diluído (1:10) e o shampoo diluído (1:10) fortificado com o analito. O volume de injeção empregado foi de 500 µL, vazão de fase móvel de 250 µL.min⁻¹ e temperatura do forno 31,5°C.

*Pesou-se 1,38g de fosfato de sódio monohidratado, transferiu-se para um balão volumétrico de 1L e completou-se até o menisco com água ultrapura. Em um béquer e sob agitação, corrigiu-se o pH até 7 com uma solução de NaOH 1 mol.L⁻¹.

**Adicionou-se 369 µL de ácido fórmico em um balão volumétrico de 1L e completou-se até o menisco com água ultrapura. Em um béquer e sob agitação, corrigiu-se o pH até 3,75 com NH₄OH 1 mol.L⁻¹.

2.5 Síntese do MIP

2.5.1 Via processo sol-gel (interações não-covalentes)

Reagentes

Tetraetilortosilicato (TEOS) da Aldrich

3-Aminopropiltrietoxissilano (APTMS) da Aldrich

Hidróxido de amônio (NH₄OH)

N-nitrosodietanolamina (NDELA) da Sigma Aldrich

Água ultrapura

Procedimento Experimental

Misturou-se 97,37 µL de APTMS e 528,54 µL de TEOS com 1 mL de uma solução saturada aquosa de NDELA (contendo 140 mg do *template*). Imediatamente depois, adicionou-se 200 µL de NH₄OH como catalisador e manteve-se a mistura sob agitação magnética a 40°C por 24 horas. Secou-se o produto de reação em estufa por 24 horas e peneirou-se o polímero a fim de obter partículas com tamanhos uniformes. Para a remoção do *template*, transferiu-se o material sintetizado para uma coluna vazia de HPLC, a qual foi conectada a uma bomba recíprocante modelo LC-20AD (Shimadzu, Kioto, Japão) com passagem contínua de acetonitrila/metanol/ácido acético (40:40:10) até completa remoção do *template*. Realizou-se a caracterização do material por espectrometria vibracional na região do infravermelho (IV) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sintetizou-se o polímero controle (NIP) conforme procedimento anterior, porém sem a adição de NDELA.

2.5.2 Rota utilizando matrizes orgânicas (interações não-covalentes)

Reagentes

Acetonitrila

2,2-Azobisisobutironitrila (AIBN) da Sigma Aldrich (França)

Ácido metacrílico (MAA) da Sigma Aldrich (Netherlands)

Trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM) da Sigma Aldrich (USA)

N-nitrosodietanolamina (NDELA) da Sigma Aldrich

Procedimento experimental

Foi utilizado o sistema ilustrado na Figura 17 para a síntese do polímero. O sistema é composto por agitador magnético, banho termostático, termômetro, banho de óleo, condensador e balão de reação. O banho termostático foi responsável por manter a temperatura do banho de óleo constante durante toda a reação, a qual foi processada sob atmosfera inerte de nitrogênio.

Pesou-se 68 mg de NDELA, adicionou-se 90 mL de acetonitrila para completa dissolução do analito e transferiu-se tais componentes para o balão. Em seguida, pesou-se 25 mg de AIBN que também foi incorporado aos componentes dentro do balão. Finalmente, adicionou-se 168 μ L de MAA e 3192 μ L de TRIM e a mistura foi conduzida ao ultrassom por 5 minutos. Logo depois, colocou-se a mistura sob atmosfera inerte de nitrogênio e, após 5 minutos, introduziu-se o balão no banho de óleo sob agitação magnética. Manteve-se a reação por 24 horas, com temperatura controlada de 60°C. Após a reação finalizada, levou-se o polímero para estufa por 72 horas e peneirou-se as partículas a fim de uniformizar e selecionar os tamanhos de interesse. Para a remoção do *template*, transferiu-se o material sintetizado para uma coluna vazia de HPLC, a qual foi conectada a uma bomba recíprocante modelo LC-20AD (Shimadzu, Kioto, Japão) com passagem contínua de acetonitrila/metanol/ácido acético (40:40:10) até completa remoção do *template*. Realizou-se a caracterização do material por espectrometria vibracional na região do infravermelho (IV) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sintetizou-se o polímero controle (NIP) conforme procedimento anterior, porém sem a adição de NDELA.

Figura 17: Sistema utilizado na síntese do polímero.

3. Resultados e discussões

3.1 Avaliações preliminares

As características estruturais e químicas da NDELA explicam o comportamento adverso da molécula durante a investigação de alguns parâmetros cromatográficos para a sua análise neste trabalho. A NDELA apresenta-se como uma molécula de alta polaridade, de baixa massa molecular e geometricamente simétrica. Tais atributos dificultam a análise por cromatografia líquida em fase reversa. Outra versão da cromatografia também foi avaliada para verificar se a NDELA apresentaria melhores adsorções na fase estacionária. A cromatografia líquida com interação hidrofílica (*Hydrophilic-Interaction Chromatography* - HILIC) utiliza uma grande proporção de solvente orgânico contendo água em uma coluna recheada com fases estacionárias polares. Logo, nesse modo de operação, o solvente forte é a proporção aquosa da fase móvel, responsável por eluir compostos mais hidrofílicos da amostra.

Desse modo, a coluna Hypersil Gold aQ (100 x 0,32 mm; 1,9 μ m, Thermo Scientific/USA) foi avaliada operando em fase reversa, ao passo que a coluna Betasil Diol (150 x 1 mm; 5 μ m, Thermo Scientific/USA) foi avaliada operando no modo HILIC, alterando a proporção de fase móvel de 95:5 até 60:40 de acetonitrila/água.

Em ambos os casos, a molécula foi eluída próximo ao tempo morto. Ainda que fosse alterado a proporção de solvente orgânico, não havia modificação no tempo de retenção do analito, demonstrando que a molécula não estava sofrendo sorção na fase estacionária. Tal problemática é recorrente para moléculas que exibem o padrão químico mencionado anteriormente.

A condição mais adequada foi alcançada empregando-se as colunas Zorbax XDB-C₁₈ (150 x 0,3 mm; 3,5 μ m, Agilent Technologies/USA) e Acclaim PepMap RSLC (150 x 0,3 mm; 2 μ m, Thermo Scientific/Dionex/USA) em modo gradiente de eluição. Nesta configuração, foi possível verificar separação cromatográfica entre a NDELA e o padrão interno selecionado (representado esquematicamente na Figura 18), além de reprodutibilidade nas injeções em diferentes concentrações das moléculas (Figura 19). As figuras 19, 20 e 21 ilustram os cromatogramas provenientes das colunas mencionadas anteriormente.

Figura 18: Fórmula estrutural do padrão interno N-Nitrosodiisopropanolamina (NDIPLA).

Figura 19: Cromatograma de uma mistura contendo padrão analítico NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e padrão interno NDIPLA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna Zorbax XDB- C_{18} ($150 \times 0,3 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$). Vazão $5 \mu\text{L.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm .

Figura 20: Cromatograma de uma mistura contendo padrão analítico NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e padrão interno NDIPLA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna Acclaim PepMap RSLC ($150 \times 0,3 \text{ mm}$; $2 \mu\text{m}$). Vazão $5 \mu\text{L.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm .

Figura 21: Cromatograma de uma mistura contendo padrão analítico NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e padrão interno NDIPLA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna Zorbax XDB- C_{18} ($150 \times 0,3 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$). Vazão $5 \mu\text{L.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm .

1 e 2 : NDELA e NDIPLA $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$

1' e 2' : NDELA e NDIPLA 5 mg.mL^{-1}

A injeção de um padrão de uracila indicou o tempo necessário para que um composto que não apresente afinidade com a fase estacionária percorra as tubulações e a coluna cromatográfica até chegar ao detector, usualmente denominado “tempo morto”. Ao realizar a injeção de uracila, foi possível aferir que a NDELA tem uma retenção muito próxima deste padrão e, portanto, pouca afinidade com o material sorvente. Desse modo, na tentativa de melhorar a interação do analito na fase selecionada e promover maiores tempos de retenção, a estratégia de inserir um par iônico na fase móvel foi adotada.

Ao adicionar um reagente de pareamento iônico, assume-se que existe a possibilidade de ocorrer dois principais mecanismos de interação. O primeiro, par iônico-analito protonado, consiste na formação de uma interação em solução entre íons de cargas opostas, a qual irá aumentar a cadeia hidrofóbica do analito, propiciando melhor retenção na fase estacionária apolar do recheio da coluna cromatográfica. O segundo, par iônico-fase estacionária, baseia-se na interação da porção apolar do reagente de pareamento com a porção também apolar dos recheios das colunas de fase reversa para, posteriormente, interagir com os componentes da fase móvel através de forças iônicas. Dessa forma, adicionou-se um surfactante aniônico (dodecil sulfato de sódio) à fase móvel tamponada pH 3,15. Na faixa de pH selecionada, a NDELA encontra-se parcialmente ionizada e apresenta-se de acordo com a ilustração da Figura 22.

Figura 22: Fórmula estrutural do dodecil sulfato de sódio e da NDELA protonada em pH 3,15, respectivamente.

Os cromatogramas não resultaram em mudanças significativas no perfil de retenção. Sabe-se que o emprego do pareamento iônico não é recomendável quando o modo de eluição é realizado por gradiente, devido ao lento equilíbrio estabelecido entre a fase estacionária e o surfactante. Além disso, essa versão da cromatografia é mais complexa que a cromatografia em fase reversa, uma vez que variações de pH e concentrações de surfactante alteram as respostas de análise.³³

3.2 Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa (RP-DLLME)

O *shampoo* e o creme hidratante são matrizes solúveis em água. Desse modo, sua solubilidade em solventes orgânicos é baixa. Além disso, a NDELA apresenta caráter polar considerável e, por isso, apresenta afinidade suficiente para permanecer na matriz cosmética. Por tais razões, a DLLME e a RP-DLLME não se mostraram técnicas de extração eficientes para a NDELA neste tipo de amostra.

De acordo com os princípios da DLLME, é necessário que a matriz esteja diluída em água e, adicionando o solvente orgânico extrator, o analito de interesse migre da fase aquosa para a fase orgânica. No caso do *shampoo* e creme hidratante, ambos são solúveis em água, porém a NDELA não tem compatibilidade suficiente com o solvente para deslocar-se para a fase orgânica. Do mesmo modo, de acordo com os princípios da RP-DLLME, a amostra deve ser solúvel em solventes orgânicos para que o analito consiga migrar para a fase aquosa e ser concentrado. Novamente, o *shampoo* e creme hidratante não apresentaram solubilidade alguma em contato com o hexano, acetato de etila e metilisobutilcetona. Diante de tal cenário, a próxima proposta foi saturar a solução diluída de *shampoo* com sal de forma que, adicionando solvente orgânico, o analito seria expulso da fase aquosa e migraria para a fase apolar.

3.3 Extração líquido-líquido com *salting out*

Compostos polares, como é o caso da NDELA, tendem a ser solúveis em água. Como consequência, o coeficiente de distribuição K torna-se pequeno, dificultando a extração com solvente orgânico. Uma alternativa seria a adição de um sal (Na_2SO_4) que interagiria com a água, deixando o composto mais disponível para ser extraído pelo solvente orgânico (efeito *salting out*).

Para observar o efeito *salting out* para a NDELA, os testes foram iniciados com 1 mL de DCM como solvente extrator e 3M do sal (Tabela 7). Em tais condições, a eficiência de extração foi baixa, sendo que 90% do analito ainda se encontrava na fase aquosa. Desse modo, o volume de solvente extrator e a concentração do sal foram modificados a fim de alcançar condições melhores para a extração. Aumentando o volume de DCM e mantendo a proporção de sal, esperava-se que uma quantidade maior de solvente fosse capaz de extrair uma quantidade maior de analito da fase aquosa. Porém, houve precipitação do sal em todos os volumes de DCM maiores que 1 mL. Modificando a concentração do sal para 2M, foi possível variar o volume de DCM sem a precipitação salina.

Tabela 7: Resultados obtidos empregando-se DCM como solvente extrator

Concentração Na_2SO_4 (mol.L ⁻¹)	Volume DCM (mL)	Aparência
3 M (2,72g)	6	Houve precipitação do sal após centrifugar.
3 M	1	Não houve precipitação do sal e houve separação de fases.
3 M	2	Houve precipitação do sal após centrifugar.
3 M	3	
3 M	4	
2 M (1,7g)	6	Não houve precipitação do sal e houve separação de fases.
2 M	2	
2 M	3	
2 M	4	

Figura 23: Cromatograma ilustrando uma extração líquido-líquido típica com *salting out* utilizando DCM como solvente extrator de NDELA. Concentração de Na_2SO_4 : 3M. Extração com 1 mL de DCM, 800 μl foram ressuspensos em 500 μl de água. Detecção por UV, comprimento de onda 234 nm.

Após realizar os testes com DCM, foram empregados outros solventes orgânicos com o objetivo de compará-los com o primeiro. A Tabela 8 indica os solventes utilizados, bem como seus volumes, concentração de sal e aparência final dos componentes após processo de extração.

Tabela 8: Resultados obtidos empregando-se diferentes solventes orgânicos no procedimento de extração

Solvente	Concentração Na_2SO_4	Volume (mL)	Aparência
Acetonitrila	2 M	1	Precipitação do sal após centrifugar.
DCM/acetona (40:60)	2 M	1	Não houve separação de fases e não houve precipitação do sal.
Metilisobutilcetona	3 M	1	Houve separação de fases e não houve precipitação do sal.
Acetato de etila	3 M	1	Houve separação de fases e não houve precipitação do sal.

O solvente acetonitrila mostrou-se ineficiente neste processo de extração já que ocorreu precipitação do sal antes mesmo do extrato ser encaminhado para análise cromatográfica. Igualmente, a mistura DCM/acetona não ofereceu imiscibilidade entre as fases orgânicas e aquosa, requisito fundamental para que o ocorra a extração líquido-líquido. Dentre todos os solventes avaliados, incluindo o DCM, os melhores resultados foram obtidos utilizando metilisobutilcetona. Apesar de ser um solvente de baixa polaridade, acredita-se que o grupamento cetona ($\text{C}=\text{O}$) presente em sua estrutura confere certa polaridade, facilitando a migração de analitos polares para a fase orgânica. Nota-se, avaliando os cromatogramas da Figura 24, que a extração com metilisobutilcetona foi muito mais significativa se comparada a extração com acetato de etila. Por tais motivos, novas condições experimentais foram propostas com o solvente metilisobutilcetona, apresentadas na tabela 9.

Figura 24: Cromatogramas ilustrando uma extração líquido-líquido típica com *salting out* utilizando metilisobutilcetona (verde) e acetato de etila (roxo) como solventes extratores de NDELA. Concentração de Na_2SO_4 : 3M. Extração com 1 mL de ambos solventes orgânicos, 800 μL foram ressuspensos em 500 μL de água. Detecção por UV, comprimento de onda 234 nm.

Tabela 9: Resultados obtidos empregando-se metilisobutilcetona como solvente extrator

Concentração Na_2SO_4 (mol.L^{-1})	Volume metilisobutilcetona (mL)	Aparência
2 M	2	Houve separação de fases e não houve precipitação do sal.
3 M	2	
2 M	1	
2 M	0,5	
3 M	0,5	

Dentre todos os testes, o resultado mais promissor foi alcançado utilizando 3M de sal e 1 mL de metilisobutilcetona como solvente extrator e, ainda assim, 80% do analito permanece na fase aquosa, tornando a eficiência de extração baixa. Ainda que o processo apresentasse baixa recuperação, esperava-se reprodutibilidade de extração, ou seja, cada vez que se empregasse as condições padrões citadas anteriormente, obter-se-ia a mesma quantidade do composto extraído. O cromatograma da Figura 25 revela que tais expectativas não foram alcançadas e o método não se mostrou reprodutível.

Figura 25: Cromatograma ilustrando uma extração líquido-líquido típica com *salting out* utilizando metilisobutilcetona como solvente extrator de NDELA. Concentração de Na_2SO_4 : 3M. Extração com 1 mL de metilisobutilcetona, 800 μl foram ressuspensos em 500 μl de água. Detecção por UV, comprimento de onda 234 nm.

A extração líquido-líquido é de fácil execução no ambiente de ensino e pesquisa, pois baseia-se em conceitos de imiscibilidade e polaridade dos compostos envolvidos, além de utilizar materiais de fácil acesso ao analista. Porém, por ser uma técnica de difícil automação, torna-se passível de erros aleatórios e que comprometem a reprodutibilidade dos ensaios. Dessa forma, é provável que a ausência de repetição nos valores de extração esteja associada a tal problemática. Além disso, levando em consideração os resultados obtidos em experimentos anteriores e em dados literários, os métodos adotados para concentração de NDELA forneceram baixas recuperações do analito.

3.4 *Clean up online e análise cromatográfica de shampoo e creme hidratante*

A análise cromatográfica de NDELA em água com concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ produz o cromatograma ilustrado na Figura 26 e, para as condições cromatográficas e de gradiente de eluição especificados, o tempo de retenção da nitrosamina é de 6,8 minutos.

Figura 26: Cromatograma típico de NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Coluna ZORBAX Eclipse XDB-CN (4.6 x 250 mm, 5 μm). Vazão $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume de injeção 5 μL . Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm.

As Figuras 27 e 28 ilustram o funcionamento do sistema montado para limpeza da matriz cosmética. A válvula de 10 pórticos é responsável pela comutação entre a técnica de preparo de amostra e a técnica analítica de separação, encontrando-se posicionada no forno do cromatógrafo líquido (HPLC Shimadzu 20A Prominence, Kioto, Japão). A bomba analítica envia a fase móvel para o *loop* preenchido com a amostra, a qual será encaminhada diretamente ao cartucho de *clean up* que fará a limpeza da matriz e conduzirá o efluente livre de interferentes para a coluna analítica (posição 10-1). Neste sistema, o giro de válvulas (posição 1-2) acontece após três minutos do início da análise com a intenção de lavar o cartucho para a próxima injeção.

Figura 27: Sistema de válvulas empregadas no *clean up online* utilizado neste estudo com válvula de 10 pórticos na posição 10-1.

Figura 28: Sistema de válvulas empregadas no *clean up online* utilizado neste estudo com válvula de 10 pórticos na posição 1-2.

Os cromatogramas ilustrados nas Figuras 29 e 30 e provenientes da injeção de *shampoo* sem e com a coluna de *clean up* antecedendo a separação cromatográfica indicam que a fase Strata-X não foi um sorvente eficiente para a etapa de limpeza da amostra, uma vez que o cromatograma ilustrado pela Figura 29 não apresentou mudanças consideráveis quando comparado ao cromatograma ilustrado pela Figura 30. Igualmente, o cromatograma oriundo da injeção do creme hidratante também não apresentou alteração significativa em seu perfil cromatográfico com a adição da coluna de *clean up* antes da análise por cromatografia líquida.

Figura 29: Cromatograma da amostra de *shampoo* fortificado com NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com injeção direta na coluna analítica. Coluna ZORBAX Eclipse XDB-CN; $4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$. Vazão $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm .

Figura 30: Cromatograma da amostra de *shampoo* fortificada com NDELA ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com coluna de *clean up* antecedendo a análise cromatográfica. Coluna ZORBAX Eclipse XDB-CN ($4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). Coluna Strata-X *home made* ($0.5 \times 50 \text{ mm}$, $30 \mu\text{m}$). Vazão $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Água e acetonitrila como fase móvel, no modo gradiente. Detector UV, comprimento de onda 234 nm .

De acordo com as observações relatadas anteriormente, os resultados obtidos a partir de procedimentos de *clean up off-line* discutidos na literatura com a fase Strata-X podem não agregar vantagem nenhuma em relação a limpeza da amostra.³⁴ Tal processo de preparação da matriz é o mais empregado na análise de NDELA em matrizes cosméticas, pois assume-se que os materiais sorventes aprisionam componentes do shampoo, disponibilizando o analito livre de interferentes. Portanto, a técnica de *clean up online* não se mostrou adequada para a

remoção de impurezas, além de requerer o uso de válvulas de comutação (6 ou 10 pórticos), item adicional que encarece a análise.

3.5 Avaliação da capacidade de retenção de NDELA em fases disponíveis comercialmente

As colunas de extração foram posicionadas no sistema de carregamento da amostra proposto conforme Figura 31.

Figura 31: Sistema de carregamento da amostra empregado no estudo para avaliação da capacidade de retenção das fases disponíveis comercialmente.

Inicialmente, o *autosampler* encontra-se na posição *load* e o *loop* é preenchido totalmente com a amostra (modo *full loop*). Ao mesmo tempo, a bomba é responsável por condicionar a coluna de extração. No momento em que a válvula do *autosampler* muda para a posição *inject*, o caminho do solvente proveniente da bomba analítica é desviado para o *loop*, ocasionando o carregamento da SPE com a amostra. A fim de monitorar os fluídos provenientes da SPE e verificar o perfil de adsorção da NDELA, o detector foi incluído na linha de automação.

Não foi viável o empacotamento da coluna contendo o MIP (síntese via precipitação) pois a bomba apresentou limitações instrumentais. Durante o processo da passagem do polímero para a coluna de extração, o MIP acomodou-se de maneira extremamente compacta dentro da coluna. Os efeitos da elevada densidade de compactação do polímero foram sentidos pelo instrumento com o aumento da pressão. A bomba disponível no laboratório suportou até um limite de empacotamento, não sendo possível o término do preenchimento em tais condições. Desse modo, as colunas avaliadas foram C₁₈, Strata-X e fase a base de carbono.

A princípio, os testes de carregamento foram executados para verificar a possibilidade de adsorção da molécula nas fases empregadas e, posteriormente, elaborar uma possível tentativa de automação da técnica de SPE. Como é possível verificar, os cromatogramas obtidos não demonstram que a NDELA permanece sorvida nas diferentes fases estacionárias empregadas (Figura 32 a 39), bem como a alteração da fase móvel também não provocou mudanças significativas em seu comportamento retentivo.

Figura 32: Injeção de amostra de água nas colunas de extração.

Figura 33: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), 0% ACN.

Figura 34: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), 0% ACN.

Figura 35: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase a base de carbono ($10 \mu\text{m}$), 0% ACN.

Figura 36: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão fosfato pH 7.

Figura 37: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), tampão fosfato pH 7.

Figura 38: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.

Figura 39: NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.

A última tentativa foi observar o comportamento da nitrosamina incorporada na matriz cosmética em contato com o sorvente. Observou-se que os componentes do *shampoo* começam a deixar a coluna de extração praticamente no começo do carregamento (Figura 40 a 45). Tal resultado já comprometeria uma possível chance do emprego do *column switching*, pois não acontece o fracionamento da amostra em contato com os adsorventes. Analisando os cromatogramas, os interferentes do *shampoo* e a NDELA deixam a coluna de carregamento praticamente ao mesmo tempo. Para aplicar a técnica de SPE *online*, a NDELA deveria apresentar um tempo mínimo de retenção (a partir de 4 minutos) para que os interferentes deixassem a coluna de extração e fossem encaminhados para o descarte. A partir de um giro de válvulas, a fração aprisionada na coluna de SPE contendo a nitrosamina seria encaminhada para a coluna analítica, item responsável pela separação cromatográfica.

Figura 40: Injeção de amostra de *shampoo* nas colunas de extração.

Figura 41: *Shampoo* fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), 0% ACN.

Figura 42: *Shampoo* fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), 0% ACN.

Figura 43: *Shampoo* fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão fosfato pH 7.

Figura 44: *Shampoo* fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase C_{18} ($10 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.

Figura 45: *Shampoo* fortificado com NDELA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fase Strata-X ($33 \mu\text{m}$), tampão formiato pH 3,75.

3.6 Síntese e caracterização do MIP

3.6.1 Via processo sol-gel (interações não-covalentes)

Foram realizadas três tentativas de síntese, das quais apenas na última houve semelhança espectral entre o MIP e o polímero controle (NIP). Com os espectros de infravermelho e MEV, foi possível avaliar o perfil do material sintetizado. A Figura 46 mostra a sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho para o polímero impresso e não-impresso. A banda em 3420 cm^{-1} (1) corresponde ao estiramento axial de grupos -OH resultantes de grupos silanóis não condensados e de água residual; em 1500 cm^{-1} (2) corresponde ao estiramento da ligação N-H ; em 1070 cm^{-1} (3) corresponde ao estiramento da ligação Si-O ; em 790 cm^{-1} (4) corresponde ao estiramento da ligação C-H . Não há diferenças expressivas entre os espectros e a similaridade dos traços espectrais sugerem que a presença de molécula molde durante as etapas de hidrólise e condensação não alteram a composição química do polímero, compatível com a natureza do processo não-covalente sol-gel.³⁵

Figura 46: Sobreposição dos espectros de absorção na região de infravermelho para o MIP e NIP (processo sol gel).

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica eficaz para análise das características superficiais de materiais sólidos. O MEV para o polímero impresso e não-impresso é apresentado na Figura 47 e ambos apresentam estrutura irregular e agregados de partículas. Aparentemente, as partículas do NIP são menores que as do MIP, uma vez que durante a síntese do MIP há a incorporação do *template* na rede polimérica, influenciando as etapas de condensação da reação.³⁶

Figura 47: Imagens digitais obtidas durante a microscopia de varredura eletrônica do MIP-NDELA e do NIP, respectivamente. Polímeros sintetizados via processo sol-gel. Aumento de 20.000 vezes.

Observando as imagens fornecidas pela técnica MEV, o MIP sintetizado está em concordância com os resultados esperados ao promover catálises em meio básico, as quais ocasionam a formação de polímeros com partículas esféricas. Diferentemente, ao adicionar catalisadores ácidos na síntese, é esperado a formação de materiais de estruturas compactas e com baixo volume de poro (estrutura lamelar). As divergências estruturais acontecem devido a posição em que ocorre o ataque nucleofílico. Para polímeros sintetizados a partir de catalisadores básicos, a base HO^- inicia a polimerização atacando o silício mais ácido disponível no meio reacional (Figura 48). Para polímeros sintetizados a partir de catalisadores ácidos, o íon H^+ faz o ataque ao oxigênio básico do silício (Figura 49).³⁶

Figura 48: Simulação do mecanismo de polimerização em meio básico.

Figura 49: Simulação do mecanismo de polimerização em meio ácido.

A síntese do polímero via processo sol-gel apresentou limitações, as quais impediram o emprego do polímero no processo de extração. A pequena quantidade de polímero formada durante a síntese (Figura 50) não permitiu que tais partículas fossem peneiradas e homogeneizadas, uma vez que a perda de material seria considerável. Adicionalmente, não foi possível retirar o *template* da cavidade polimérica. Mesmo após horas de limpeza com passagem contínua de acetonitrila/metanol/ácido acético (45:45:10) e água pura, o polímero ainda apresentava grande quantidade de NDELA em sua estrutura. Dessa forma, não foi viável realizar os testes de seletividade com o polímero, os quais assegurariam a afinidade do material com a nitrosamina.

Figura 50: Polímero sintetizado via sol-gel.

3.6.2 Rota utilizando matrizes orgânicas (interações não-covalentes)

A Figura 51 mostra o polímero sintetizado utilizando matrizes orgânicas. O desempenho da reação empregando tais rotas parece ser superior, uma vez que a quantidade de produto obtido foi maior em relação ao processo sol gel.

Figura 51: Polímero sintetizado utilizando matrizes orgânicas.

Adicionalmente, os espectros vibracionais na região do infravermelho de NIP e MIP-NDELA (Figura 52) apresentaram maior similaridade quando comparados aos mesmos espectros empregando a síntese via sol gel. A banda em 3560 cm^{-1} (1) corresponde ao estiramento de grupos -OH , provavelmente oriundos do monômero MAA. Bandas de absorção em 2990 cm^{-1} (2) referem-se ao estiramento da ligação C-H de agrupamentos metil; em 1750 cm^{-1} (3) refere-se ao estiramento da ligação C=O de grupos carbonilas; em 1460 cm^{-1} e em 1380 cm^{-1} (4) referem-se à rotação da ligação C-H de agrupamentos metil. A semelhança espectral é esperada, uma vez que a presença da molécula molde não altera a estrutura do polímero formado.

Figura 52: Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho para NIP e MIP-NDELA (rota orgânica).

Para dessorção da molécula molde, o polímero foi transferido para uma coluna de HPLC vazia, a qual foi conectada a uma bomba analítica responsável por bombear durante 48 horas um fluxo de $0,1\text{ mL.minuto}^{-1}$ de acetonitrila/metanol/ácido acético (45:45:10). Uma alíquota do solvente de lavagem foi encaminhada para análise por cromatografia líquida a fim de acompanhar o processo de lavagem do material.

A imagem da microscopia (Figura 53) do material formado através da reação de precipitação indica partículas aglomeradas e de forma arredondadas e uniformes. As características estruturais e morfológicas do MIP e NIP não são diferenciáveis por técnicas de superfície.

Figura 53: Imagens digitais obtidas durante a microscopia de varredura eletrônica do MIP-NDELA e do NIP, respectivamente. Polímeros sintetizados via reação de precipitação. Aumento de 20.000 vezes.

Os testes de seletividade foram realizados mantendo 5 mg do polímero em contato com solventes fortificados com NDELA 200 ng.mL^{-1} . Os solventes utilizados foram acetonitrila, água, metanol, tampão fosfato pH 7, tampão formiato pH 3,5 e tampão sulfato pH 2. Em todos os testes, o material adsorvente foi agitado por 60 minutos com os diferentes solventes, centrifugado e o sobrenadante encaminhado para análise cromatográfica. Analisando os cromatogramas obtidos, pode-se dizer que o polímero não apresentou afinidade com o analito em nenhuma das condições a qual foi exposto. A concentração final de NDELA presente no sobrenadante foi a mesma que a concentração inicial adicionada, ou seja, o material sintetizado não foi capaz de reter o composto em suas cavidades. A inexistência de seletividade do polímero pode ser atribuída ao fato de que esses materiais apresentam baixa acessibilidade ao local em que a cavidade se encontra disponível para molécula molde. Tais

cavidades encontram-se incorporadas na rede polimérica, dificultando o acesso da molécula molde ao poro e resultando em baixa transferência de massa entre polímero e analito, tornando o processo de sorção/dessorção desfavorável^[17].

3.7 Comparação entre as duas rotas sintéticas

As condições experimentais em que a polimerização ocorreu pode ter sido um fator determinante para o insucesso da síntese utilizando o processo sol-gel. O emprego de sistemas termicamente estáveis durante a reação é altamente recomendável. No caso da reação por precipitação, foi possível utilizar um banho termostático e, desse modo, controlar com mais precisão a variação de temperatura. Por outro lado, a reação via sol-gel foi processada em banho de óleo, condição em que a temperatura pode não ser aferida com tanta segurança, comprometendo a qualidade final do material formado.

Outro aspecto que influencia a morfologia do material sintetizado é a natureza física da molécula molde. O padrão analítico da NDELA apresenta-se com consistência viscosa, recordando a aparência de um óleo. Os artigos utilizados como suporte para essa via de síntese utilizam moléculas moldes em pó. Desse modo, essa divergência nos estados físicos dos analitos pode atrapalhar a completa solubilização do material no solvente escolhido, bem como as interações analito-monômero durante as etapas de polimerização que antecedem a formação da cadeia polimérica.

Do ponto de vista morfológico, a formação das cavidades seletivas é influenciada diretamente pelo tipo de solvente adicionado ao meio reacional. Estudos relatados na literatura descrevem que realizar a síntese do MIP em meio aquoso ocasiona a formação de interações fracas entre a molécula molde e o monômero. Apesar dessa premissa, não foi possível retirar o *template* do polímero sintetizado pela rota sol-gel, provavelmente pelas resistentes ligações irreversíveis estabelecidas durante o desenvolvimento reacional. A polaridade do solvente de lavagem foi modificada algumas vezes, porém as alíquotas encaminhadas para análise ainda apresentavam grande quantidade de NDELA em sua composição. Em oposição, a remoção do *template* do material sintetizado pelo método de precipitação foi eficiente. Contudo, ao entrar em contato novamente com o analito, o polímero não demonstrou propriedade de reconhecimento molecular. Em muitos casos, a ausência de afinidade molecular pode ser atribuída à interferência do solvente porogênico (acetonitrila) na constituição do complexo monômero-template, dando origem a poros de ligação pouco

seletivos e em baixa quantidade. Esse cenário dificulta a difusão dos analitos pela estrutura do polímero.

4 Conclusões e perspectivas futuras

As técnicas de preparo de amostra avaliadas neste trabalho apresentaram limitações para a concentração de NDELA, principalmente pelo perfil químico da molécula. Considerando a literatura que está à disposição, não há relatos de métodos que utilizam a extração em fase sólida para concentração do analito, o que demonstra a dificuldade em obter-se melhoras neste aspecto. Isto é especialmente importante considerando-se a relevância do analito em estudo e o grande número de publicações a respeito de melhoras na análise do mesmo

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, envolvendo a síntese de novos materiais seletivos para o preparo de amostras; o uso de técnicas de “column switching” com o objetivo de concentrar o analito e melhorar a sensibilidade do método; avaliação de PR-DLLME e LLE com “salting out”; a miniaturização do sistema de preparo da amostra on-line e outros, concluiu-se que existe ainda a necessidade de um refinamento dos fragmentos de resultados atingidos no presente estudo. Assim, a melhor alternativa para a pré-concentração da nitrosamina seria o desenvolvimento de polímeros adsorventes seletivos e passíveis de serem empregados em estratégias para preparação da amostra. A partir dos estudos preliminares aqui discutidos, é possível afirmar que há formação da rede polimérica nas rotas sintéticas avaliadas, porém os caminhos de impressão da cavidade seletiva no polímero necessitam ser lapidados. Ambas as rotas para síntese do MIP ainda apresentam caráter exploratório e algumas variáveis experimentais devem ser modificadas com o objetivo de encontrar as melhores condições para a confecção do polímero.

Uma possibilidade proposta para otimizar a seletividade do material produzido seria promover reações e alterar uma condição específica de cada vez, a fim de verificar qual delas poderia fornecer melhorias no reconhecimento molecular. Alternativamente, o emprego de técnicas quimiométricas de otimização poderiam ter papel complementar nesta etapa. Para a rota sol-gel, o emprego de um sistema que mantenha e controle a estabilidade térmica da reação pode ser adotado para averiguar em qual temperatura o rendimento de síntese é maior. A acidez ou basicidade da catálise empregada também deve ser um parâmetro de estudo, uma vez que a adição de ácidos ao meio reacional dá origem a redes poliméricas mais compactas e de baixo volume de poro. Para a rota via precipitação, a mudança na natureza e na proporção do iniciador radicalar e do agente de ligação cruzada é uma alternativa que certamente

produzirá polímeros morfologicamente distintos dos que foram confeccionados na presença de AIBN e TRIM. Além do uso de MIPs para a sorção seletiva da NDELA com eliminação dos contaminantes da matriz, uma alternativa seria a avaliação de outros sorventes como alguns desenvolvidos com sucesso recentemente em nosso laboratório envolvendo líquidos iônicos e materiais derivados do grafeno, especialmente o óxido de grafeno. Este enfoque deverá ter prosseguimento no grupo de pesquisa, no qual outros alunos desenvolvem atualmente projetos para concentração “on-line” via “column-switching” utilizando esses materiais.

Portanto, os vários aspectos desenvolvidos e avaliados nesta dissertação servirão de base para o aprofundamento da investigação a respeito de melhores técnicas analíticas para a determinação de NDELA em matrizes cosméticas, um desafio analítico em aberto e que requer estudos adicionais.

5 Referências Bibliográficas

1 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.

2 EUROPEAN COMMISSION. Scientific Committee Consumer Safety. **Scientific Committee of 12 october 2011 on Consumer Safety on Fragrance allergens in cosmetic products**. European Commission, 2011. 136 p.

3 ARORA, P.; NANDA, A.; KARAN, M. Shampoos based on synthetic ingredients vis-a-vis shampoos based on herbal ingredients: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 7, n. 1, p. 41–46, 2011.

4 IKEDA, K.; MIGLIORESE, K. G. Analysis of nitrosamines in cosmetics. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 41, n. 1, p. 283–333, 1990.

5 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 48 de 25 de outubro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de outubro de 2013. Seção 1, p. 63.

6 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 29 de 25 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1º de junho de 2012. Seção 1, p. 71

7 EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) n.37/2010 of 22 december 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**. 2010. Disponível em:

<http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>. Acesso em: 23 out. 2015.

- 8 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 4 de 09 de dezembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de janeiro de 2014. Seção 1, p. 25.
- 9 QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.
- 10 MARTINS, M.; PRIMEL, E.; CALDAS, S. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012.
- 11 HASHEMI, P.; RAEISI, F.; GHIASVAND, A.R.; RAHIMI, A. Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1926–31, 15 mar. 2010.
- 12 HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3–54, 1999.
- 13 LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Editora RIMA, 2004. 96 p.
- 14 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.
- 15 NAZARIO, C. E. D. **Desenvolvimento e caracterização de materiais baseados em sílica com aplicabilidade em extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra alta eficiência**. 225 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 16 AIROLDI, C.; DE FARIAS, R. F. Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 84–88, 2004.
- 17 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.
- 18 LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna**. São Carlos: Editora Átomo, 2009. 384 p.
- 19 GUILLARME, D. Review fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, p. 1836–1848, 2006.
- 20 LANÇAS, F. M. Estratégias para diminuição do tempo de análise em cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4 p. 39–47, 2009.
- 21 LANÇAS, F. M. Vantagens e limitações da miniaturização em cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v.1, n. 3 p. 51–60, 2009 .
- 22 GHASSEMPOUR, A; ABBACI, M.; TALEBPOUR, Z.; SPENGLER, B.; ROMPP, 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, p. 43–48, 2008.

- 23 WANG, L.; HSIA, H.; WANG, 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.
- 24 MA, Q.; WANG, C.; BAI, H. Determination of ten volatile nitrosamines in cosmetics by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Chinese Journal Analytic Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1201–1207, 2011.
- 25 SCHOTHORST, R.; STEPHANY, R. Occurrence of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics from the Dutch market. **International Journal of Cosmetic**, v. 23, p. 109-114, 2001.
- 26 ERICKSON, M.; LAKINGS, D. Quantitative analysis of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) by high performance liquid chromatography-thermal energy analyzer detection. **Journal of Society of Cosmetic**, v. 222, p. 213–222, 1985.
- 27 FAN, T.; GOFF, U.; SONG, L.; FINE, D.H.; ARSENAULT, G.P.; BIEMANN, K. N-Nitrosodiethanolamine in cosmetics, lotions and shampoos. **Food and cosmetics**, v. 15, p. 423–430, 1977.
- 28 DAVARANI, S. S. H., MASSOMI L.; BANITABA M.; ZHAD H.; SADEGHI, O.; SAMIGI, 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. 347–53, 2013.
- 29 ROLLMANN, B. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 206, p. 158–163, 1981.
- 30 DUCOS, P.; GAUDIN, R.; FRANCIN, J. Determination of N-nitrosodiethanolamine in urine by gas chromatography thermal energy analysis: application in workers exposed to aqueous metalworking fluids. **International archives of occupational and environmental health**, v. 72, p. 215–222, 1999.
- 31 JOO, K. 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.
- 32 CASS, Q. **Cromatografia líquida: Novas tendências e aplicações**. Amsterdam: Elsevier, 2015. 392 p.
- 33 SCHOTHORST, R. C.; SOMERS, H. H. J. Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 3, p. 681–5, 2005.
- 34 DA COSTA SILVA, R. G.; AUGUSTO, F. Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 216–223, 2006.

- 35 FREITAS, M. B.; COSTA, P.R.; BRITO, J.O.; VIEIRA, E.; MAIA, P.P.; SIQUEIRA, M. Amitriptilina e nortriptilina em plasma: Extração em fase sólida por polímeros de impressão molecular e sílica octadecila para análise cromatográfica em fase líquida de alta resolução. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 70–79, 2009.
- 36 BRAGA, A. N. S.; DUARTE, J. F.; MENEZES, R.R.; LIRA, H. L.; NEVES, G. A. Síntese de mulita pelo processo sol-gel: Uma revisão da literatura. **Revista Eletrônica de Materiais Processos (REMAP)**, v. 2, p. 60–73, 2014.