

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL AUGUSTO GONÇALVES

DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM PRODUTOS COSMÉTICOS POR
HPLC-DAD E MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS ASSOCIADOS À
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

CURITIBA

2018

RAFAEL AUGUSTO GONÇALVES

DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM PRODUTOS COSMÉTICOS POR
HPLC-DAD E MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS ASSOCIADOS À
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

Coorientador: Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

- G635d Gonçalves, Rafael Augusto
Determinação de conservantes em produtos cosméticos por HPLC-DAD e métodos espectroscópicos associados à calibração multivariada [recurso eletrônico] / Rafael Augusto Gonçalves – Curitiba, 2018.
- Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.
Orientadora: Noemi Nagata
Coorientador: Patricio G. Peralta-Zamora
1. Cosméticos. 2. Parabenos (conservantes). 3. Fenoxietanol. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nagata, Noemi. III. Peralta-Zamora, Patricio G. IV. Título.

CDD: 688.55

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

TERMO DE APROVAÇÃO


**DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM PRODUTOS COSMÉTICOS
POR HPLC-DAD E MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS ASSOCIADOS
À CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

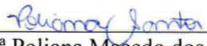
por


RAFAEL AUGUSTO GONÇALVES

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:


Prof.^a Dr.^a Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR


Prof.^a Dr.^a Poliana Macedo dos Santos
Dep. Acadêmico de Química e Biologia – UTFPR


Prof.^a Dr.^a Lara Messerschmidt
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 29 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Noemi Nagata, por ter aceitado me orientar, pela confiança depositada em mim, pela dedicação, apoio e paciência, e por ser um exemplo de caráter e competência. Serei eternamente grato.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora, também por me acolher, por toda ajuda, pelas conversas e momentos de descontração, pelos cafés, e por ser também um exemplo como pessoa e profissional.

À Profa. Dra. Iara Messerschmidt, pelas valiosas contribuições desde meu projeto, na correção do relatório anual, pelas considerações no exame de qualificação, e por ter aceitado participar da banca de defesa.

À Profa. Dra. Poliana Macedo dos Santos, por prontamente aceitar participar da banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva, pelas valiosas considerações no exame de qualificação.

As colegas do GAQQ, pelo ótimo ambiente de trabalho durante esses dois anos. Em especial à Bianca, pela paciência, pelos ensinamentos e por sempre resolver os problemas do Agilent.

As colegas do TECNOTRATER, pelo convívio, pelos cafés, pelo apoio e cooperação ao longo desses dois anos. Em especial à Dani, por sua amizade, pelas conversas e pelo incentivo nos momentos difíceis.

A todos os colegas do LabQAM, pelo convívio e companheirismo ao longo desses dois últimos anos.

À técnica Rubia do Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da UTFPR, pela ajuda nas análises de FTIR.

À minha família, especialmente meus pais, por me apoiarem e me darem forças para sempre continuar tentando. Tudo o que eu faço nunca vai ser suficiente para retribuir o que vocês fazem por mim.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFPR.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os conservantes são substâncias adicionadas aos produtos cosméticos com a função de impedir o desenvolvimento de microrganismos que possam causar doenças ou prejudicar a vida útil do produto. Os ésteres do ácido 4-hidroxibenzoico, conhecidos como parabenos, são amplamente utilizados como conservantes desde o início do século passado. Entretanto, nas últimas décadas começaram a surgir polêmicas em torno desses compostos, onde estudos apontavam a relação dos parabenos com aparecimento de câncer, além também dos casos de alergias causadas por essa classe de compostos. Assim, abriu-se espaço para o crescimento no uso de outros conservantes, como o 2-fenoxietanol, que além de sua boa ação antimicrobiana, possui baixo potencial alergênico, além de outras propriedades de interesse para a indústria cosmética. Neste trabalho, foi desenvolvido um método para a determinação de metilparabeno (MP), propilparabeno (PP) e 2-fenoxietanol (FE) em produtos cosméticos por HPLC-DAD utilizando QuEChERS no preparo de amostra. O método foi validado de acordo com a ANVISA, obtendo uma boa linearidade para os analitos (0,1 a 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e MP, e 1,5 a 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FE). A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária com coeficientes de variação (CV%) inferiores a 10% em todas as concentrações e a exatidão também foi avaliada, com valores na faixa de 93,77% a 108,13%. O método QuEChERS-HPLC-DAD foi testado em amostras reais, onde os valores de concentrações encontrados estão abaixo do limite máximo estabelecido pela ANVISA. O presente trabalho também investigou a viabilidade da utilização de PLSR associada com métodos espectroscópicos na determinação das espécies. O primeiro método propôs a utilização da espectrofotometria UV associada à PLSR para determinação simultânea de MP e PP. O método foi testado em amostras cosméticas por QuEChERS-UV-PLS, gerando erros relativos médios de previsão de 38,7% para MP e 7,97% para PP, sendo que o elevado erro obtido pode estar relacionado com a grande semelhança espectral das espécies. Um segundo método foi desenvolvido visando à determinação de parabenos como a soma dos valores de concentração de MP e PP, na presença de FE, esse método foi testado em amostras cosméticas gerando erros relativos médios de previsão de 7,75%. Também foi avaliada a determinação das espécies por espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) associada à PLSR (PLS-1). O modelo para a determinação de FE em amostras cosméticas gerou erro relativo médio de previsão igual a 8,0%, o que é satisfatório considerando que não foi utilizado etapa de *clean up* das amostras, o modelo construído para a determinação de parabenos totais (soma dos valores de concentração de MP e PP) apresentou erro relativo médio de previsão igual a 25,0%, com algumas evidências da presença de um erro sistemático nesta determinação.

Palavras-chave: Parabenos; Fenoxietanol; Cosméticos; QuEChERS; HPLC-DAD.

ABSTRACT

Preservatives are substances added to cosmetic products for preventing the development of microorganisms that may cause disease or impact in the lifetime of the product. Esters of 4-hydroxybenzoic acid, known as parabens have been widely used as preservatives since the beginning of the last century. However, in recent past, controversies began to emerge around these compounds, where studies established relations between parabens and cancer, as well cases of allergies caused by this class of compounds. Thus, has been increased demand for other preservatives such as 2-phenoxyethanol, which in addition to his good antimicrobial activity, has low allergenic potential as well others properties of interest to the cosmetic industry. In this work was developed a method for determination of methylparaben (MP), propylparaben (PP) and 2-phenoxyethanol (FE) in cosmetic products by HPLC-DAD using QuEChERS in the sample preparation. The method was validated according to ANVISA (linear range: 0.1 to 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MP and MP, and 1.5 to 6.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for FE). Precision was evaluated by repeatability and intermediate precision with coefficients of variation (CV %) lower than 10% in all concentrations analised, and accuracy was also evaluated, with values ranging from 93.77% to 108.13%. The QuEChERS-HPLC-DAD method was tested in the real samples, where the concentration values were found below the maximum limit established by ANVISA. The present work also investigated the feasibility of the use of PLSR associated with spectroscopic methods for quantification of these compounds. The first method proposed the use of UV spectrophotometry associated with PLSR for the simultaneous determination of MP and PP, the method was tested in cosmetic samples by QuEChERS-UV-PLS with mean relative prediction errors of 38.7% for MP and 7,97% for PP, the high error value obtained may be related to the spectral overlap of the compounds, in this scenario a second method was evaluated aiming at the determination of parabens as the sum of the MP and PP concentrations in the presence of FE, this method was tested in cosmetic samples with mean relative errors of 7.75%. The determination of the compounds by infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) associated to PLSR (PLS-1) was also evaluated, the method for the determination of FE in cosmetic samples generated mean relative error of prediction equal to 8.0%, which is satisfactory considering that is not used clean up procedure for the samples, the model constructed for the determination of total parabens (sum of MP and PP) showed a mean relative error of 25.0%, with evidences of the presence of a systematic error in this determination.

Keywords: Parabens; Phenoxyethanol; Cosmetics; QuEChERS; HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA REPRESENTATIVO DO MÉTODO QuEChERS ORIGINAL. -----	27
FIGURA 2 – AS REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO.-----	30
FIGURA 3 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO FUNCIONAMENTO DE UM ACESSÓRIO DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR). ----	33
FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA. -----	35
FIGURA 5 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO UTILIZADO NO PREPARO DAS AMOSTRAS.-----	42
FIGURA 6 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE POR ATR-FTIR.-----	52
FIGURA 7 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SOLUÇÕES CONTENDO A MISTURA DOS PADRÕES NA CONCENTRAÇÃO DE 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PARA MP E PP, E 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PARA FE, COM DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA POR DAD EM 270 NM PARA FE E 254 NM PARA MP E PP. -----	56
FIGURA 8 - CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (N=3) DOS ANALITOS FENOXIETANOL (FE), METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP), OBTIDA PELA INJEÇÃO DIRETA DOS PADRÕES DOS ANALITOS. -----	57
FIGURA 9 – CURVAS ANALÍTICAS MÉDIAS (N = 3) PARA OS ANALITOS MP (254 NM), PP (254 NM) E FE (270 NM) APÓS EXTRAÇÃO. -----	58
FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRA BRANCO E AMOSTRA BRANCO FORTIFICADA COM 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PARA FE, E 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PARA MP E PP EM COMPARAÇÃO COM A SOLUÇÃO PADRÃO DOS ANALITOS.-----	60
FIGURA 11 – GRÁFICOS DE PARETO COM VALORES ABSOLUTOS DE EFEITO OBTIDOS A PARTIR DO TESTE DE YAUDEN. -----	63
FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS EM 270 NM OBTIDOS POR QUECHERS-HPLC-DAD PARA 9 COSMÉTICOS (CM) COMERCIAIS. -----	65

FIGURA 13 - COMPORTAMENTO ESPECTRAL NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO DOS PADRÕES DE METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP) EM CONCENTRAÇÃO DE 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EM ÁGUA.-----	66
FIGURA 14 – COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 25 MISTURAS SINTÉTICAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA UV, PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.-----	67
FIGURA 15 – VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP. -----	68
FIGURA 16 - GRÁFICO DO VETOR DE REGRESSÃO PARA MP E PP DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO.-----	69
FIGURA 17 - PRIMEIRA DERIVADA DOS DADOS ESPECTRAIS DE MP E PP NA CONCENTRAÇÃO DE 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EM ÁGUA.-----	70
FIGURA 18 – LOADINGS DAS 04 PRIMEIRAS VARIÁVEIS LATENTES DO MODELO CONSTRUÍDO. -----	71
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO. -----	71
FIGURA 20 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS DE MP E PP. -----	73
FIGURA 21 - ESPECTRO DO CREME HIDRATANTE ISENTO DOS ANALITOS DE INTERESSE ANTES E DEPOIS DA ETAPA DE CLEAN UP DO QuEChERS.-----	75
FIGURA 22 - COMPORTAMENTO ESPECTRAL NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO DOS PADRÕES EM METANOL DE METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP) E FENOXIETANOL (FE) NAS CONCENTRAÇÕES DE 3,0, 3,0 E 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RESPECTIVAMENTE. -----	77
FIGURA 23 - COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 31 MISTURAS SINTÉTICAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA UV, PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS (PB). -----	78

FIGURA 24 – VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRUÍDO. -----	79
FIGURA 25 - GRÁFICO DO VETOR DE REGRESSÃO DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO. -----	80
FIGURA 26 - ESPECTROS DERIVADOS DOS PARABENOS TOTAIS (PB) OBTIDO PELA MISTURA DE UMA SOLUÇÃO PADRÃO NA CONCENTRAÇÃO 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE MP E 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE PP, E ESPECTRO DERIVADO DE FE NA CONCENTRAÇÃO DE 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.-----	81
FIGURA 27 – LOADINGS DAS 02 PRIMEIRAS VARIÁVEIS LATENTES DO MODELO CONSTRUÍDO.-----	81
FIGURA 28 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO. -----	82
FIGURA 29 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS DOS PARABENOS TOTAIS (PB).-----	83
FIGURA 30 – COMPORTAMENTO ESPECTRAL DO GEL LIMPADOR ISENTO DOS ANALITOS DE INTERESSE SUBMETIDO AO QuEChERS. 85	
FIGURA 31 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO POR ATR-FTIR PARA A SOLUÇÃO PADRÃO DE FENOXIETANOL EM ACETONA. -----	87
FIGURA 32 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS POR ATR-FTIR PARA AS SOLUÇÕES PADRÕES DE PARABENOS EM ACETONA. -----	87
FIGURA 33 – ESPECTROS NO IV OBTIDOS DAS SOLUÇÕES PADRÕES DA MISTURA DE MP E PP (MIX), FE E DA ACETONA. -----	89
FIGURA 34 – COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 35 AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.-----	90
FIGURA 35 – VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE FE. -----	91

FIGURA 36 - GRÁFICO DO VETOR DE REGRESSÃO DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE FE. -----	92
FIGURA 37 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE FE. -----	93
FIGURA 38 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE FE. -----	94
FIGURA 39 – VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE PB. -----	95
FIGURA 40 - GRÁFICO DO VETOR DE REGRESSÃO DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE PB. -----	96
FIGURA 41 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE PB. -----	97
FIGURA 42 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE PB. -----	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP).-----	21
TABELA 2 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FENOXIETANOL. -----	24
TABELA 3 – FATORES AVALIADOS NO TESTE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO. -----	45
TABELA 4 – MATRIZ DOS FATORES AVALIADOS NO TESTE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.-----	45
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NO UV PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP. -----	48
TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NO UV PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS (PB) NA PRESENÇA DE FENOXIETANOL (FE).-----	49
TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO. -----	51
TABELA 8 – VALORES DE RECUPERAÇÃO (%) E CV (%) PARA OS SOLVENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE EXTRAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS. -----	54
TABELA 9 – VALORES DE RECUPERAÇÃO (%) E CV (%) PARA OS SOLVENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE CLEAN UP DO MÉTODO QuEChERS. -----	54
TABELA 10 - PARÂMETROS DA REGRESSÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR QuEChERS-HPLC-DAD. -----	59
TABELA 11 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO E DA EXATIDÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO. -----	61
TABELA 12 – VALORES OBTIDOS PELO TESTE F PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO. -----	62

TABELA 13 – VALORES DE CONCENTRAÇÕES DE AMOSTRAS REAIS ANALISADAS PELO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.-----	64
TABELA 14 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS.--	73
TABELA 15 – RESPOSTA PREVISTA E ERROS OBTIDOS PELO MODELO PLSR NA REGIÃO DO UV PARA A PREVISÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.-----	74
TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MODELO CONSTRUÍDO UTILIZANDO MATRIZ BRANCO FORTIFICADA ASSOCIADA AO MÉTODO QUECHERS, PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP. -----	76
TABELA 17 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS.--	83
TABELA 18 – RESPOSTA PREVISTA E ERROS OBTIDOS PELO MODELO PLSR NA REGIÃO DO UV PARA A PREVISÃO DE MP E PP.----	84
TABELA 19 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MODELO CONSTRUÍDO UTILIZANDO MATRIZ BRANCO FORTIFICADA ASSOCIADA AO MÉTODO QuEChERS, PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS. -----	85
TABELA 20 - RELAÇÃO DAS BANDAS IDENTIFICADAS NOS ESPECTROS DE IV. -----	88
TABELA 21 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE FE.-----	94
TABELA 22 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE PB.-----	98
TABELA 23 – RESPOSTA PREVISTA E ERROS OBTIDOS PELO MODELO PARA DETERMINAÇÃO DE FE (PLS-1) E PELO MODELO PARA DETERMINAÇÃO DE PB (PLS-1). -----	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	-	Acetonitrila
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	-	Reflectância Total Atenuada
C18	-	Octadecilsilano
CE	-	Comunidade Europeia
CV	-	Coefficiente de Variação
DAD	-	Detector de Arranjo de Diodos
D-SPE	-	Extração em Fase Sólida Dispersiva
FE	-	Fenoxietanol
FLD	-	Detector de Fluorescência
FTIR	-	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HPLC	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
K_{ow}	-	Coefficiente de Partição Octanol - Água
MeOH	-	Metanol
MP	-	Metilparabeno
MS	-	Espectrometria de Massas
LD	-	Limite de Detecção
LQ	-	Limite de Quantificação
PCA	-	Análise de Componentes Principais
PCR	-	Regressão pelo Método das Componentes Principais
PLSR	-	Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais
PP	-	Propilparabeno
PSA	-	Amina Primária-secundária
r	-	Coefficiente de Correlação
R^2	-	Coefficiente de Determinação
RMSEC	-	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Calibração
RMSECV	-	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação
UPLC	-	Cromatografia Líquida de Ultra <i>Performance</i>
UV	-	Região do Ultravioleta do Espectro Eletromagnético
UV-Vis	-	Região do Ultravioleta e Visível do Espectro Eletromagnético
VL	-	Variável Latente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	CONSERVANTES EM PRODUTOS COSMÉTICOS.....	19
2.2	PARABENOS.....	20
2.3	FENOXIETANOL.....	23
2.4	DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM COSMÉTICOS.....	24
2.5	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	28
2.6	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	29
2.6.1	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-VIS.....	30
2.6.2	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	31
2.7	QUIMIOMETRIA.....	33
2.7.1	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	34
2.7.2	REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS.....	35
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	REAGENTES E INSUMOS.....	39
4.2	EQUIPAMENTOS.....	39
4.3	PROGRAMAS COMPUTACIONAIS.....	40
4.4	METODOLOGIA.....	40
4.4.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE.....	40
4.4.2	PREPARO DE AMOSTRA.....	40
4.4.3	MÉTODO HPLC-DAD.....	42
4.4.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	42

4.4.4.1	SELETIVIDADE	43
4.4.4.2	CURVA ANALÍTICA	43
4.4.4.3	EXATIDÃO	43
4.4.4.4	PRECISÃO	44
4.4.4.5	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	44
4.4.4.6	TESTE DE ROBUSTEZ.....	45
4.4.5	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP. .	46
4.4.6	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS (PB)	48
4.4.7	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA BASEADO EM QuEChERS.....	53
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS-HPLC-DAD	55
5.2.1	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS, LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	55
5.2.2	SELETIVIDADE.....	60
5.2.3	RECISÃO E EXATIDÃO	60
5.2.4	ROBUSTEZ.....	61
5.2.5	ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS PELO MÉTODO QuEChERS-HPLC- DAD.	64
5.3	ANÁLISE MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP ..	65
5.3.1	ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS PRELIMINARES NA REGIÃO DO UV	65
5.3.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO MULTIVARIADO	66

5.4	ANÁLISE MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS NA PRESENÇA DE FENOXIETANOL	76
5.4.1	ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS PRELIMINARES.....	76
5.4.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO MULTIVARIADO	78
5.5	ANÁLISE MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA DETERMINAÇÃO DE FENOXIETANOL E PARABENOS TOTAIS (PB).....	86
5.5.1	ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	86
5.5.2	DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO.....	90
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

A função dos conservantes em produtos para fins cosméticos é proteger simultaneamente os mesmos da deterioração, e o consumidor de microrganismos potencialmente patogênicos. Entretanto, a presença dos conservantes pode produzir efeitos indesejáveis, que vão desde irritações cutâneas, até a ocorrência de atividade estrogênica. Assim, órgãos governamentais do mundo inteiro começaram a estabelecer limites para o uso desses conservantes, tornando o controle analítico dos produtos cosméticos ainda mais relevante. Como não há regulamentação específica para a análise desses aditivos e a diversidade de composição e a apresentação dos cosméticos (estados físicos) são variadas, abre-se um espaço para o estudo de métodos eficientes para a identificação e determinação dessa classe de compostos, incluindo uma grande gama de abordagens analíticas que podem ser utilizadas.

Os parabenos são conservantes usados em uma grande variedade de produtos cosméticos. São ésteres do ácido 4-hidroxibenzoico, sendo os mais utilizados: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. Entretanto, nos últimos anos houve diversos estudos associando os parabenos ao aparecimento de câncer de mama. A preocupação com os parabenos incentivou então o crescimento no uso de outros conservantes dentro da indústria cosmética, entre eles, o fenoxietanol, que é um éter glicólico muito utilizado como conservante, pois além da capacidade antimicrobiana, também possui um baixo potencial alergênico, além de outras propriedades que interessam para a indústria cosmética.

Atualmente, a técnica de HPLC-DAD é uma das mais utilizadas na análise de conservantes em cosméticos. Visando melhorar a sensibilidade e a seletividade da técnica aplicada, a tendência é o desenvolvimento de procedimentos de extração das amostras que envolvam etapas de *clean up*. Porém, a adição de mais etapas no pré-tratamento da amostra, tende a tornar a análise mais longa, além de exigir um consumo maior de reagentes e equipamentos específicos. Em contrapartida aos métodos cromatográficos, temos as técnicas espectroscópicas como alternativas em potencial na análise de conservantes. Elas geralmente permitem que as análises sejam feitas de maneira não-invasiva e não-destrutiva, além de não exigir a preparação das amostras quando a sensibilidade da técnica é compatível com o teor do analito na amostra. Além disso, o uso de ferramentas quimiométricas multivariadas aliadas às técnicas espectroscópicas, facilita e potencializa o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação simultânea de vários compostos mesmo quando a seletividade está comprometida, diminuindo o tempo de análise e tornando a técnica competitiva em relação aos métodos cromatográficos, amplamente estudados.

Em função destes aspectos, este trabalho tem por objetivo desenvolver um método cromatográfico, e avaliar métodos espectroscópicos associados a modelos multivariados para a determinação de metilparabeno, propilparabeno e/ou fenoxietanol em matrizes cosméticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSERVANTES EM PRODUTOS COSMÉTICOS

Os conservantes são compostos naturais ou sintéticos que são adicionados a diversos tipos de produtos como os alimentos, fármacos e cosméticos com o intuito de prevenir o ataque de microrganismos e/ou impedir mudanças químicas indesejáveis na composição do produto (GRUVBERGER E BRUZE, 1997).

A ANVISA, pela RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001, define os conservantes em cosméticos como: “Conservantes: são substâncias adicionadas aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes como a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações causadas por microrganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto”.

Estima-se que o uso diário de cosméticos chega há 6 produtos para os homens e 12 para as mulheres, sendo que cada produto pode chegar a conter mais de 100 compostos em sua formulação. Supondo que esses produtos são usados diariamente e por um longo período, a segurança destes cosméticos se faz necessária, devido ao longo período de exposição do usuário (HOPPE; PAIS, 2017).

Os cosméticos são suscetíveis ao ataque de microrganismos, devido sua composição aquosa, além de conter ácidos graxos e carboidratos, que favorecem o crescimento desses microrganismos. Assim, o papel dos conservantes é proteger simultaneamente os produtos da deterioração e os consumidores de microrganismos potencialmente patogênicos, sem haver o risco de efeitos adversos (LUNDOV et al., 2009). Assim, para garantir a segurança do consumidor, um conservante ideal deveria apresentar as seguintes características: ser eficaz em baixos níveis de concentração, apresentar boa solubilidade em água e compatibilidade com outros excipientes, não possuir gosto e odor, ser incolor e eficaz contra bactérias (tanto Gram-positivos quanto Gram-negativos) e fungos (bolores e leveduras), ser estável na faixa de pH de 2,5 a 10,5, além de ser aceito pelas agências reguladoras e possuir baixo custo (POLATI et al., 2007; FERNANDES et al., 2013).

Mesmo seguindo todas essas recomendações, o uso de conservantes pode produzir efeitos indesejáveis, que podem ocorrer logo após a primeira aplicação do produto ou mesmo depois de anos de uso contínuo do cosmético. Esses efeitos vão desde suaves irritações cutâneas até possíveis efeitos provenientes de desregulação endócrina (devido a possível atividade estrogênica de alguns conservantes) (RICHTER E BARTH, 1992; HARVEY, 2003; JENSEN et al., 2005), e mais recentemente, tem se

discutido a possibilidade desses conservantes estarem relacionados com o aparecimento de câncer de mama (DARBRE et al., 2004).

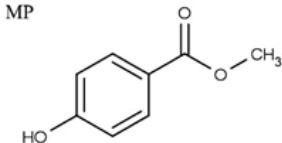
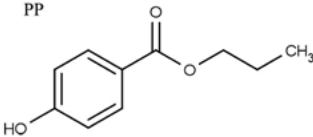
2.2 PARABENOS

São ésteres do ácido 4-hidroxibenzoico, mas tornaram-se popularmente conhecidos como parabenos. Essa família de compostos tem sido utilizada em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos desde a década de 1930. Produtos que contém esses conservantes incluem sabonetes, loções corporais, *shampoos*, condicionadores, loções faciais, limpadores faciais, cremes dentais, protetores solares, entre outros. Um estudo identificou 6 diferentes parabenos, sendo que cerca de 44% dos cosméticos analisados continham um ou mais em sua formulação (YAZAR et al., 2011). Mas a quantidade de produtos que contém essa classe de conservante pode variar de região para região, devido à legislação de cada país.

A atividade antimicrobiana dos parabenos aumenta com o aumento do número de carbonos em sua estrutura, porém, sua solubilidade em água diminui paralelamente (POLATI et al., 2014). O crescimento de microrganismos ocorre apenas em fase aquosa, assim, a solubilidade em água do conservante e sua distribuição em emulsão água/óleo refletem diretamente na sua atividade antimicrobiana (GARNER, SIOL E ELKIS, 2014), ou seja, parabenos com grupo alquila de menor tamanho funcionam melhor como conservantes, pois possuem maior solubilidade em água. A ação desses ésteres é geralmente seletiva, assim, usualmente emprega-se a mistura desses compostos para oferecer uma poderosa ação antimicrobiana contra um grande número de microrganismos. Assim, os parabenos se tornaram uma das classes de conservantes mais utilizadas na indústria cosmética (CABALEIRO et al., 2014), sendo também o principal foco de estudo deste trabalho. Os parabenos mais usualmente utilizados são o metilparabeno (MP) e o propilparabeno (PP), cuja mistura é conhecida por produzir um efeito sinérgico na capacidade conservante (BRAUSCH; RAND, 2011), e serão o foco deste trabalho, sendo algumas de suas características físico-químicas descritas na TABELA 1.

O mecanismo de ação antimicrobiano dos parabenos é variado e não específico (GARNER; SIOL; ELKIS, 2014), acredita-se que eles apresentam ação sobre a síntese de DNA e RNA, sobre enzimas como ATPases e fosfotransferases, e estejam envolvidos em mecanismos de transporte pelas membranas (FERNANDES et al., 2013).

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP).

Composto	 Metilparabeno	 Propilparabeno
CAS^a	99-76-3	94-13-3
Massa molar (g mol⁻¹)^a	152,149	180,203
Fórmula Molecular^a	C ₈ H ₈ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
pKa^a	8,5	8,5
Log K_{ow}^a	1,96	3,04

^a: dados obtidos em pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

No contato dérmico, os parabenos de cadeia longa (como o butilparabeno) são metabolizados por esterases e são menos reativos. Os parabenos de cadeia curta (como metil e propilparabeno) são metabolizados por esterases nos queratinócitos (células diferenciadas do tecido epitelial, responsáveis pela síntese da queratina) e são mais reativos (CASHMAN; WARSHAW, 2005). Por isso há uma preocupação maior com os parabenos de cadeia longa, devido sua menor reatividade, acredita-se que isso favorece uma possível bioacumulação. Após a absorção, dentro do organismo, os metabólitos (majoritariamente ácido 4-hidroxibenzoico) são conjugados e eliminados pela urina (HOPPE; PAIS, 2017).

Os efeitos dos parabenos no corpo humano são controversos. É comprovado seu potencial alergênico, não obstante, o grau de incidência de alergias varia de estudo para estudo - onde o potencial alergênico dos parabenos pode variar de zero a 4,2 % (GARNER; SIOL; ELKIS, 2014). Em 2012, foi publicado um estudo, onde é evidenciado que os parabenos são praticamente não irritantes e não sensibilizantes na população humana com pele normal. A sensibilização (quando ocorre efetivamente a reação alérgica) pelos parabenos ocorre principalmente quando a pele já está danificada. A prevalência de sensibilização por parabenos varia de 0,3 % a 10,9 %, e essas avaliações mostraram poucas mudanças nos últimos trinta anos. A conclusão do estudo é que os parabenos possuem propriedades sensibilizantes fracas, porém existentes (CASTELIAN; CASTELIAN, 2012).

Outra grande preocupação vem dos possíveis efeitos de desregulação endócrina que os parabenos podem apresentar (BYFORD et al., 2002) e de um estudo publicado em 2004 que detectou parabenos em câncer de mama de pacientes (DARBRE et al., 2004), isso provocou um alarde na mídia quanto a segurança dos parabenos. Em 2015, Sasseville et al. publicaram um estudo onde reuniram diversas informações sobre os parabenos quanto as suas propriedades antagônicas nos seres humanos. A conclusão apresentada foi que o potencial efeito estrogênico dos parabenos é insignificante quando comparado aos estrogênios naturais, não obstante, não há dados clínicos suficientes, e nem evidência científica para se estabelecer causalidade entre os parabenos e câncer de mama. O estudo ainda aponta que não está elucidado como os parabenos se distribuem pelos tecidos vivos e seus efeitos por exposição em longo prazo, e sugere que os parabenos não são tão seguros quanto se costumava pensar, mas estudos tanto epidemiológicos quanto toxicológicos são necessários para se chegar a uma conclusão (SASSEVILLE et al., 2015).

Ainda no estudo de 2015, Sasseville et al. questionam a polêmica de algumas publicações científicas, as quais tiveram influência na mídia, alimentando o que eles chamam de “delírios quimiofóbicos” que está relacionado com o ato de ser contra produtos que não venham de origem natural. Isso impacta diretamente na indústria cosmética, que deve atender a demanda consumidora, com isso surgiram diversas linhas de produtos ditos “livres de parabenos”. Ironicamente, as Isotiazolinonas, que são uma classe particular de conservantes que vem substituindo os parabenos e estão sendo cada vez mais utilizadas, possui grande potencial alergênico e há estudos indicando a proximidade de uma epidemia global de dermatite por contato causada por esses conservantes (MAIO et al., 2011; GONÇALO E GOOSSENS, 2013).

Em 2014, Bledzka et al., publicaram um trabalho de revisão apontando a ocorrência de parabenos no meio ambiente, possíveis formas de remoção e degradação, e a sua influência sobre os organismos vivos (estudos *in vitro* e *in vivo*). Nesse estudo, verificou-se que o uso global dos parabenos resultou em uma ocorrência onipresente no ambiente, sendo as principais fontes de poluição as plantas de tratamento de águas residuais. Parabenos foram detectados em recursos hídricos, solos, sedimentos, ar e também na biota, entretanto, os valores de concentrações observados nesses ambientes naturais são considerados muito baixos para produzir efeitos adversos.

Em função de todo este panorama, os órgãos governamentais começaram a introduzir regulamentações para o uso de parabenos em produtos de consumo. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) com a Resolução - RDC Nº 162, DE 11 DE SETEMBRO DE 2001, estabelece os limites de concentração entre 0,4% (m/m) para a utilização de um único parabeno e 0,8% (m/m) para a mistura de parabenos em

produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Esses valores estão em conformidade com os adotados pela Comunidade Europeia (*Directive 96/45/EC* de 2 julho de 1996).

Em âmbito global, a situação das legislações que controlam os parabenos tem mudado. Em 2011, a Dinamarca proibiu o uso de propilparabeno e butilparabeno em produtos cosméticos direcionados a crianças menores de três anos (BEK nº 166 de 24 de fevereiro de 2011). Em 2014, a Comunidade Europeia, através da normativa CE 358/2014 proibiu o uso de isopropil e isobutilparabeno, fenilparabeno, benzilparabeno e pentilparabeno.

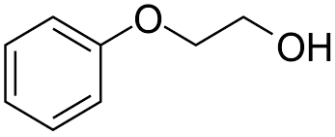
Em países como Brasil, Estados Unidos e Canadá ainda falta regulamentação específica para a análise dos parabenos (SASSEVILLE et al., 2015), isso facilita a fraude na rotulagem desses produtos, fato que incentiva o estudo de métodos cada vez mais eficientes para a identificação e determinação dessa classe de compostos.

2.3 FENOXIETANOL

O 2-fenoxietanol ou conhecido apenas como fenoxietanol, é um éter glicólico, e possui muitas aplicações em cosméticos, vacinas e produtos farmacêuticos (TROUTMAN et al., 2015). Seu uso como conservante na indústria cosmética aumentou significativamente nos últimos anos, devido principalmente ao seu baixo potencial de sensibilização dérmica (KIM et al., 2015), é particularmente eficaz contra bactérias Gram-negativas. O FE usado em cosmético é majoritariamente sintético, embora ele ocorra naturalmente nas folhas da *Camelia Sinensis* (chá verde), essa forma natural do FE tem sido aplicada em cosméticos ditos “naturais” (KROWKA, 2014), o que amplia sua aceitação pelo mercado. Como conservante cosmético, a ANVISA (2001) segue as recomendações da Comunidade Europeia e estabelece o limite de concentração máxima de 1,0 % (m/m) para FE. Algumas de suas propriedades físico-químicas são mostradas na TABELA 2.

O FE também pode ser usado como solvente, sendo costumeiramente usado como solvente para outros conservantes, incluindo os parabenos, que possuem relativa baixa solubilidade em água, além de serem sólidos em temperatura ambiente. Como o FE é líquido a temperatura ambiente, é fácil sua incorporação em formulações cosméticas (STEINBERG, 2011). Também é usado como antisséptico tópico e como solvente para repelentes de insetos, além de ser usado como fixador em perfumes (TROUTMAN et al., 2015). Outro uso do FE é como agente anestésico, usado durante o manejo de algumas espécies de peixes (WEYL; KAISER; HECHT, 1996).

TABELA 2 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FENOXIETANOL.

Composto	
Fenoxietanol	
CAS^a	122-99-6
Massa molar (g mol⁻¹)^a	138,166
Fórmula Molecular^a	C ₈ H ₁₀ O ₂
pKa^a	15,10
Log K_{ow}^a	1,16

^a: dados obtidos em pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

O FE é rapidamente absorvido, distribuído, metabolizado e excretado pela urina, o principal metabólito é o ácido 2-fenoxiacético. Esse metabólito é formado num processo de oxidação pelas enzimas álcool desidrogenase citosólica e a aldeído desidrogenase, esse processo ocorre tanto na pele quanto no fígado (SCSS, 2016).

O uso do FE como conservante em cosméticos ainda gera algumas dúvidas em relação a sua segurança. Em 2012, a agência reguladora de cosméticos da França, emitiu nota alertando sobre a necessidade de diminuir a concentração máxima permitida de FE em cosméticos, uma vez que não há estudos suficientes sobre os efeitos sistêmicos atribuíveis ao FE, e essa seria uma medida de segurança para a exposição cumulativa aos produtos cosméticos contendo esse conservante (ANSM, 2012). Isso fez com que a Comunidade Europeia realizasse estudos visando confrontar essas afirmações, tendo sido decidido que a concentração máxima do FE continua sendo 1,0 % para a utilização em cosméticos, levando em conta as informações levantadas (SCSS, 2016). Ainda não há um consenso geral quanto à segurança do uso de FE em cosméticos, e a indústria cosmética continua utilizando este conservante em seus produtos, evidenciando a relevância do seu controle analítico.

2.4 DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM COSMÉTICOS

Visando garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos cosméticos, se faz necessário o controle de qualidade dos produtos comercializados. A complexidade e

diversidade de composição das matrizes cosméticas e seus diferentes estados físicos faz com que sejam desenvolvidas diversas metodologias analíticas.

A diluição da amostra com respectiva extração em fase sólida (SPE, do inglês: *solid-phase extraction*) associada à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, do inglês: *high performance liquid chromatography diode array detection*) ou a cromatografia à gás associada a espectrometria de massas (GC-MS, do inglês: *gas chromatography-mass spectrometry*) são métodos analíticos largamente usados na determinação de conservantes em cosméticos (CABALEIRO et al., 2014).

Apenas a Comunidade Europeia estabeleceu, de acordo com a *Seventh Commission Directive* 96/45/EC de 2 julho de 1996, métodos oficiais para identificação e determinação de conservantes em cosméticos. A identificação é feita após a acidificação da amostra, seguida de extração com acetona e respectiva filtração. Realiza-se então, a precipitação dos ácidos graxos em meio básico, seguida de outra extração com éter dietílico para remoção dos compostos lipofílicos. Posteriormente, acidifica-se o extrato obtido das etapas anteriores e realiza-se a identificação por cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês: *thin layer chromatography*). Para a determinação quantitativa de parabenos e FE em amostras de cosméticos, a amostra deve ser acidificada e a extração deve ser feita com uma mistura água/etanol, seguida da determinação por HPLC-UV.

Devido à complexidade das matrizes cosméticas, existe a necessidade de um preparo de amostra adequado antes da separação e identificação cromatográfica, a fim de eliminar interferentes da matriz da amostra e aumentar o tempo de vida útil das colunas. Uma grande variedade de métodos de extração foi publicada nos últimos anos. Esses métodos envolvem o uso de diferentes técnicas de extração, como: SPE (SHEN et al., 2007; BELTRAN et al., 2010; NÚÑEZ et al., 2010), microextração em fase sólida (SPME, do inglês: *solid-phase microextraction*) (MARTÍNS et al., 2011; ZOTOU et al., 2010; UYSAL E GÜRDAY, 2008; HAN et al., 2008; SHEN et al., 2007; MÁRQUEZ-SILLEIRO et al., 2010), microextração em fase líquida (LPME, do inglês: *liquid-phase microextraction*) (CABALEIRO et al., 2013; PENA-PEREIRA et al., 2010; JAIN et al., 2013; EBRAHIMPOUR et al., 2012; FARAJZADEH et al., 2010; SARAJI E MIRMAHDEIH, 2009; MSAGATI et al., 2008), extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês: *supercritical fluid extraction*) (LEE et al., 2006; WANG E CHANG, 1998; SCALIA E GAMES, 1992) e extração por líquido pressurizado (PLE, do inglês: *pressurized liquid extraction*) (SÁNCHEZ-PRADO et al., 2010).

As técnicas de microextração têm recebido grande destaque, devido a vantagens como: simplicidade, miniaturização da etapa de preparação e principalmente menor consumo de reagentes orgânicos (CABALEIRO et al., 2014). Também, novos

adsorventes têm sido propostos, com o objetivo de aumentar a seletividade, a reprodutibilidade e a eficiência da extração. Dentre alguns, é possível destacar: nanotubos de carbono (MÁRQUEZ-SILLEIRO et al., 2010), grafeno (YE et al., 2013) e partículas magnéticas funcionalizadas (TAHMASEBI et al., 2012)

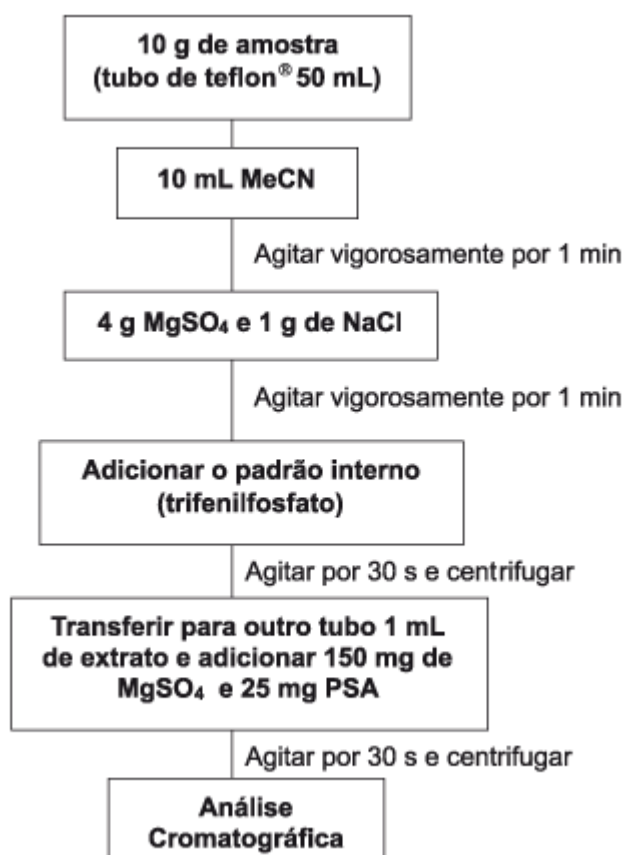
Apesar da grande popularização das técnicas miniaturizadas, quando se trata de matrizes complexas, um método de extração que se popularizou na última década, é o método QuEChERS (acrônimo para *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*), ou seja, um método de extração que tem entre suas vantagens, ser: rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Esse método foi proposto por Anastassiades et al. (2003), para a determinação de agrotóxicos em frutas e verduras.

O método QuEChERS original propõe as seguintes etapas: extração com acetonitrila, seguida da partição líquido-líquido promovida pela adição de sais (comumente sulfato de magnésio - $MgSO_4$, e cloreto de sódio - $NaCl$), que provocam o efeito *salting out*, e posteriormente uma etapa de limpeza ou *cleanup*, feita por uma extração em fase sólida dispersiva (D-SPE, do inglês: *Dispersive solid phase extraction*), utilizando como sorvente a amina primária secundária (PSA, do inglês: *primary secondary amine*). O efeito *salting out* tem o objetivo de melhorar a recuperação de compostos polares, pois a adição de sais diminui a solubilidade de compostos polares na fase aquosa, e ao mesmo tempo diminui a quantidade de solvente orgânico na fase aquosa e vice-versa, já a etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados das análises (PRESTES et al., 2009), o método é ilustrado pelo fluxograma da FIGURA 1.

Apesar do método QuEChERS ter sido originalmente proposto para a determinação de pesticidas em alimentos, rapidamente surgiram estudos avaliando a aplicação desse método na análise de outras matrizes complexas e outros analitos em diversas matrizes, constatando-se a grande versatilidade desse método de extração. Diversas modificações ao método original foram propostas visando aumentar o recuperação e diminuir os efeitos de matriz, essas modificações permitiram melhorar ainda mais o desempenho do QuEChERS em matrizes complexas. Essas modificações se dão nos solventes, sais e sorventes utilizados em cada uma das etapas do método de extração (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2017).

Em matrizes cosméticas, houve aplicação do QuEChERS para a determinação de fragrância almíscar sintética em diversos tipos de cosméticos, nesse estudo foi utilizado para análise um sistema GC-MS, e acetonitrila como solvente extrator e o *clean up* foi realizado com sorventes PSA e C18, o método foi considerado robusto, apresentando boa precisão ($CV < 15\%$) e boa exatidão (recuperação média de 85%) (HOMEM et al., 2013).

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA REPRESENTATIVO DO MÉTODO QUECHERS ORIGINAL.



FONTE: PRESTES et al., 2009

Há na literatura o uso desse método modificado para a extração de parabenos em algumas matrizes, como lodo de ETA (Estação de Tratamento de Água). Nesse estudo CERQUEIRA et al. (2014), usaram um sistema UPLC-ESI-MS/MS para determinação dos compostos, e o método QuEChERS proposto utilizou acetonitrila como solvente extrator e sorvente PSA na etapa de *clean up*, obtendo recuperações entre 50 % e 93 % e coeficientes de variação menores que 10 %.

O método QuEChERS também foi utilizado para se determinar parabenos em sedimentos, nesse estudo foi utilizado um sistema LC-MS/MS, e acetonitrila foi utilizada como solvente extrator, na etapa de *clean up* foi utilizado como sorvente uma mistura de PSA e C18, obtendo valores satisfatórios de recuperação e boa precisão (CARMONA et al., 2014).

Segundo González-curbelo et al. (2015), o aumento da popularidade do QuEChERS nos últimos anos se deve principalmente ao fato de que esse método satisfaz as necessidades dos laboratórios modernos, como a redução do uso de solventes e materiais de consumo, além de diminuir o tempo e o custo da análise. A grande vantagem do QuEChERS é sua versatilidade, essa técnica mostrou ser capaz de

se adaptar a novos desafios, conseguindo lidar com uma grande variedade de analitos em uma ampla diversidade de amostras (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). No entanto, o uso de metodologias baseadas em QuEChERS é pouco explorada na análise de parabenos e fenoxietanol em matrizes complexas, não há na literatura relato de trabalhos usando essa técnica de preparo de amostra para a determinação destes analitos em matrizes cosméticas.

2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A HPLC é uma das técnicas mais utilizadas na análise de amostras complexas (MALLIKA et al., 2013). Para a análise de cosméticos, a detecção por ultravioleta (UV) é o método mais utilizado (FEI et al., 2011; MELO E QUEIROZ, 2010; EBRAHIMPOUR et al., 2012; YAMINI et al., 2012; CABUK et al., 2012), mas também foi reportada a determinação por espectrometria de massas (LEE et al., 2006; NÚÑEZ et al., 2008; GONZÁLEZ-MARIÑO et al., 2009; BENIJTS et al., 2003; GEARA-MATTA et al., 2011; CHEN et al., 2012).

No caso em particular dos parabenos e FE, Rastogi (2000) descreveu um método HPLC-UV baseado no método padrão estabelecido pela Comunidade Europeia, onde foram avaliados 67 tipos de cremes de pele. A rotulagem incorreta com a concentração dos parabenos ocorreu em 10 % dos produtos investigados, e para o FE, 7 % dos produtos apresentaram concentração fora dos limites estabelecidos.

Borremans et al. (2004), também descreve um método HPLC-UV para a determinação de FE, 1-fenoxipropan-2-ol, metil, etil, propil, butil e benzil parabenos, utilizando SPE no preparo de amostra. Nesse estudo, a faixa linear para o FE foi de 40 a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 10 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os parabenos. Esse estudo foi validado de acordo com os parâmetros da Comunidade Europeia, que diverge dos parâmetros adotados pela ANVISA. No entanto ressalta-se a necessidade de se validar o método desenvolvido utilizando amostras enriquecidas com a adição dos conservantes, uma vez que não se tem materiais de referências comercialmente disponíveis, e isso resulta numa grande influência do método de preparo de amostra utilizado.

Memon et al. (2005), descreve um método para determinação de conservantes, incluindo MP e PP em cosméticos por cromatografia líquida micelar, onde as amostras eram diluídas e posteriormente injetadas no sistema cromatográfico. Nesse estudo, a faixa linear estudada para MP e PP variou de 5 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção de 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tanto para MP quanto para PP. Na análise de amostras cosméticas reais foram encontradas as concentrações máximas de 0,184 % (m/m) para MP e 0,248 % para PP.

Wu et al. (2008) descreve um método UPLC (do inglês *ultra performance liquid chromatography*) com detecção por DAD, para a determinação de 21 conservantes em cosméticos, incluindo FE, MP e PP, extraídos com metanol em um ultrassonicador. Nesse estudo, foram obtidos limites de detecção de $1,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FE, e $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e PP, os valores de recuperação ficaram entre 90,5 e 97,8%. Na análise de amostras cosméticas reais, as concentrações máximas encontradas foram de 0,19 % (m/m) para FE, 0,10 % para MP e 0,015 % para PP.

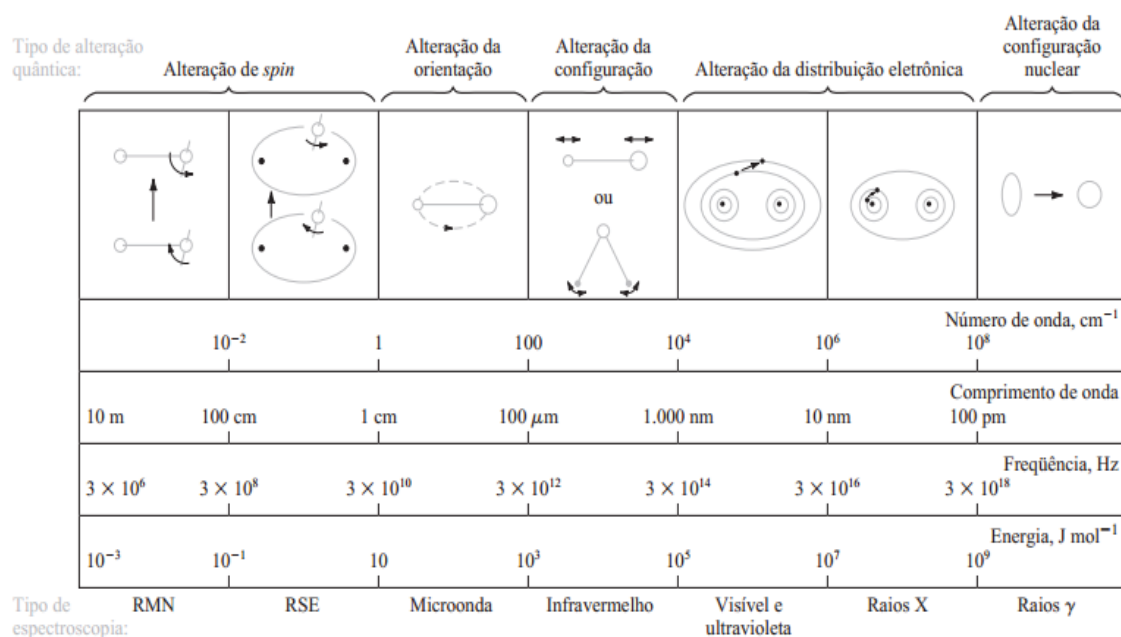
A detecção por fluorescência (FLD - do inglês *fluorescence detector*) também foi descrita por Zgoła-Grzeškowiak et al. (2016), sem a necessidade do uso de agentes derivatizantes. Nesse estudo apenas a diluição da amostra foi usada como etapa de preparação de amostra, devido à grande sensibilidade e seletividade apresentada pela detecção por fluorescência. Assim os autores determinaram parabenos em tônicos, água micelares e perfumes de banho e obtiveram limites de quantificação no intervalo de 24 a $46 \mu\text{g mL}^{-1}$ que está de acordo com o estipulado pela Comunidade Europeia.

A HPLC acoplada à MS tem sido amplamente aplicada à determinação de conservantes em cosméticos. Os detectores MS permitem uma identificação com baixos limites de detecção, porém a técnica tem um alto custo (LEE et al., 2006; OCAÑÁ-GONZÁLEZ et al., 2015). Nos últimos anos, a GC-MS também tem sido aplicada na análise de parabenos. Esses métodos normalmente incluem procedimentos de extração não usuais. A aplicação de detectores MS para obtenção de baixos limites de detecção não é primordial na análise de cosméticos (visto que esses compostos estão presentes em uma concentração relativamente alta em matrizes cosméticas), mas se torna interessante quando se trata de outros tipos de matrizes, como amostras ambientais, onde as concentrações das espécies tendem a serem muito menores em comparação com as amostras cosméticas.

2.6 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Os métodos espectroscópicos são baseados na quantidade de radiação produzida ou absorvida por espécies químicas de interesse, e são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida nessa medida. As regiões espectrais são mostradas na FIGURA 2, assim como os tipos de alterações resultantes da interação da radiação com a amostra. A espectroscopia foi fundamental na construção da teoria atômica moderna, além disso, é crucial na elucidação de estruturas moleculares, assim como na determinação quantitativa e qualitativa de compostos orgânicos e inorgânicos (SKOOG et al., 2006).

FIGURA 2 – AS REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO.



FONTE: ADAPTADO DE SKOOG et al., 2006.

2.6.1 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-VIS

A espectrofotometria na região do UV-Vis é uma técnica analítica extensamente utilizada, devido principalmente sua robustez, seu custo relativamente baixo além de seu grande número de aplicações desenvolvidas (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Os métodos espectrofotométricos podem ser matematicamente descritos pela lei de Lambert-Beer ou apenas Lei de Beer, que funciona para medidas de absorção de radiação por amostras sólidas, líquidas ou gasosas nas regiões do UV-Vis e infravermelho do espectro eletromagnético. A Lei de Beer nos diz que a absorbância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente (c) e ao caminho óptico (b) do meio absorvente, como descrito pela equação (1):

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

Onde, (ϵ) é a constante de proporcionalidade chamada de absorvidade molar. Vale enfatizar que a Lei de Beer descreve bem o comportamento de soluções diluídas (ROCHA, TEIXEIRA, 2004; SKOOG et al., 2006).

Devido seu relativo baixo custo, a espectrometria na região do UV-Visível torna-se uma técnica interessante para a determinação de conservantes (MALLIKA et al., 2013). No entanto, a determinação espectrofotométrica simultânea de vários componentes em uma mistura complexa pode ser uma tarefa difícil, especialmente para componentes que

possuem características espectrais semelhantes, como os parabenos. A dificuldade em distinguir sinais sobrepostos é frequentemente encontrada em métodos analíticos, fato que inviabiliza uma avaliação quantitativa univariada. Assim, métodos de derivação e calibração multivariada têm um papel importante na solução destes problemas, viabilizando a análise de multicomponentes em uma mistura.

Khani et al. (2014), descreve um método que utiliza ferramentas de calibração multivariada para determinar metilparabeno e propilparabeno simultaneamente em matrizes cosméticas, nesse estudo a determinação é feita por um método PLSR com correção de sinal ortogonal (WOSC-PLSR), a extração dos analitos era feita por um método de microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquidos iônicos (IL-DLLME) IL-DLLME/WOSC-PLS/UV-Vis, onde o modelo otimizado foi construído com 4 variáveis latentes, gerando um erro relativo médio de previsão de 4,30 % para MP e 7,49 % para PP. Na aplicação do método em amostras reais, foram obtidas recuperações entre 80,0 e 97,6 %, mostrando-se adequado para a determinação simultânea de MP e PP. Nesse estudo, os autores concluíram que a determinação espectrofotométrica simultânea de MP e PP é difícil, principalmente pela grande sobreposição espectral desses compostos, nesse aspecto, o sistema WOSC-PLSR usado se mostrou mais adequado para contornar esses problemas do que os métodos OSC-PLSR e PLSR.

EI-Gindy (2007), também desenvolveu um método espectrofotométrico associado a ferramentas quimiométricas para determinar simultaneamente MP e PP, além de outros dois compostos em xaropes. Nesse estudo, os modelos foram construídos por PLSR (modo PLS-1) e PCR, e não foi utilizada etapa de pré-processamento dos espectros para a construção dos modelos. A faixa linear estudada foi de 1,0 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e 0,2 a 1,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para PP, na análise de amostras reais as recuperações obtidos foram próximas de 100 %, tanto para os modelos construídos por PLS-1 quanto por PCR.

2.6.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A região do infravermelho corresponde à região com número de onda entre aproximadamente 12.800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , sendo essa região comumente dividida em três sub-regiões, chamadas: infravermelho próximo (NIR, do inglês: *near infrared*) que compreende o intervalo de 12.800 a 4.000 cm^{-1} ; infravermelho médio (MIR, do inglês: *mid-infrared*) que compreende o intervalo de 4.000 a 400 cm^{-1} ; e o infravermelho distante (FIR, do inglês: *far-infrared*) que engloba o intervalo de 400 a cerca de 10 cm^{-1} (SKOOG et al., 2006; SILVERSTEIN, WEBSTER E KIEMLE, 2007).

A região do infravermelho médio é extensamente usada, pois compreende a chamada região de impressão digital (1400 a 600 cm^{-1}), onde pequenas mudanças na

constituição ou estrutura de uma molécula resultam em mudanças significativas nas bandas de absorção (SKOOG et al., 2006; SILVERSTEIN, WEBSTER E KIEMLE, 2007).

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula. Um espectro de infravermelho é, basicamente, obtido ao passar radiação infravermelha por uma amostra e determinar qual fração dessa radiação incidente é absorvida num valor específico de energia. Num espectro de absorção, a energia em que aparece uma banda, corresponde à frequência de vibração de uma parte da amostra (STUART, 2004).

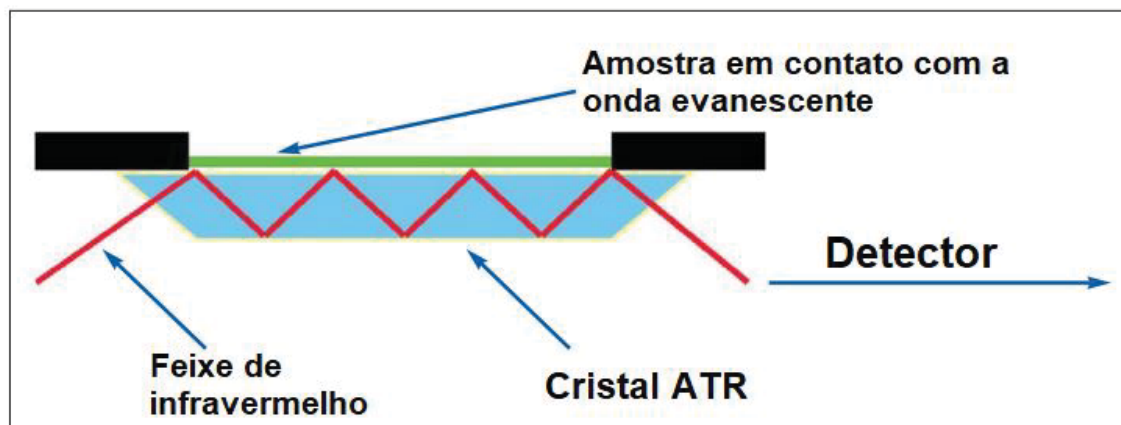
Durante muito tempo, os espectros de infravermelho eram obtidos por equipamentos do tipo dispersivo, que utilizavam redes de difração. Nas últimas décadas, houve um grande crescimento no uso de espectrômetros com transformada de Fourier (FTIR, do inglês: *Fourier transform infrared*), devido as suas vantagens em relação aos equipamentos do tipo dispersivo, como ganho de tempo de análise (pois não utilizam monocromadores) e melhor razão sinal/ruído, aumentando as aplicações da região do MIR. O grande sucesso da espectroscopia FTIR se deve principalmente por sua robustez e simplicidade operacional (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Outra vantagem da técnica FTIR é que permite a operação em modo de reflectância total atenuada (ATR, do inglês: *Attenuated Total Reflectance*), que é uma técnica não-invasiva e não-destrutiva, que permite analisar uma grande variedade de tipos de amostras, como líquidos, sólidos, géis, filmes, pós entre outros.

O acessório de ATR opera medindo as mudanças que ocorrem no feixe de infravermelho refletido quando esse entra em contato com a amostra, como ilustra a FIGURA 3. No processo de reflexão, o feixe de infravermelho é direcionado para um meio opticamente denso (um cristal com alto índice de refração) sob um ângulo crítico. A reflectância interna cria a chamada onda evanescente na superfície do cristal que entra em contato com a amostra, a intensidade dessa onda cai exponencialmente conforme se afasta da superfície do cristal, por isso é necessário um bom contato entre a amostra a superfície do acessório. Nas regiões do espectro de infravermelho em que a amostra absorve energia, a onda evanescente será atenuada e retornará para o feixe de infravermelho seguindo para o detector, gerando assim o espectro de infravermelho (PERKIN ELMER, 2005).

O uso de ATR é comum para a obtenção de espectros para as amostras de difícil manuseio. Entretanto, sua aplicação vem aumentando devido sua grande versatilidade, e principalmente por necessitar um mínimo preparo de amostra, já que é compatível com amostras nos mais diversos estados físicos.

FIGURA 3 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO FUNCIONAMENTO DE UM ACESSÓRIO DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR).



FONTE: ADAPTADO DE PERKIN-ELMER (2005).

O ATR é frequentemente associado com a região do infravermelho médio, essa região fornece um perfil completo da composição das amostras, o que a torna uma ferramenta de grande potencial analítico. A complexidade dos espectros de infravermelho, assim como alguns problemas de não-linearidade verificados entre a intensidade do sinal analítico e a concentração das espécies de interesse, podem ser contornadas com o uso de técnicas multivariadas para o desenvolvimento de métodos analíticos na determinação simultânea de compostos (BLANCO et al., 2007).

Na área de produtos cosméticos, não há estudos que envolvam a determinação de conservantes por técnicas espectroscópicas na região do infravermelho. No entanto, o potencial da técnica tem sido demonstrado pela sua utilização no desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, com boa exatidão e precisão para a indústria farmacêutica (BLANCO et al., 2008).

2.7 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área multidisciplinar que visa aplicar ferramentas matemáticas e estatísticas para resolver problemas encontrados na química, auxiliando no planejamento de experimentos, na otimização de processos e na extração do máximo de informação de um conjunto de dados. Atualmente, a quimiometria é um instrumento essencial na química analítica, mas seu uso se ramifica para as mais diversas áreas de estudo. Essa ferramenta tem sido útil nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos, que já utilizam ferramentas quimiométricas no controle de qualidade e na tomada de decisões (FERREIRA, 2015).

2.7.1 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. O procedimento consiste em duas fases: a calibração e a previsão. Inicialmente, constrói-se uma matriz de dados **Xcal** a partir da resposta instrumental (contendo n linhas correspondentes ao número de amostras do conjunto de calibração e m colunas correspondentes à resposta instrumental em diferentes comprimentos de onda - no caso de métodos espectroscópicos). Uma matriz com valores de concentrações **Ycal** (contendo n linhas correspondentes a cada uma das amostras do conjunto de calibração) é feita empregando-se um método referência que descreva a concentração do analito em cada uma das amostras (NAGATA et al., 2001).

O objetivo dessa fase de calibração é produzir um modelo que relaciona a resposta instrumental com os valores obtidos pelo método tido como referência, através da escolha de um modelo matemático (determinando o vetor dos coeficientes de regressão – **b**) que melhor reproduza **Ycal** a partir da matriz **Xcal**, conforme equação (2):

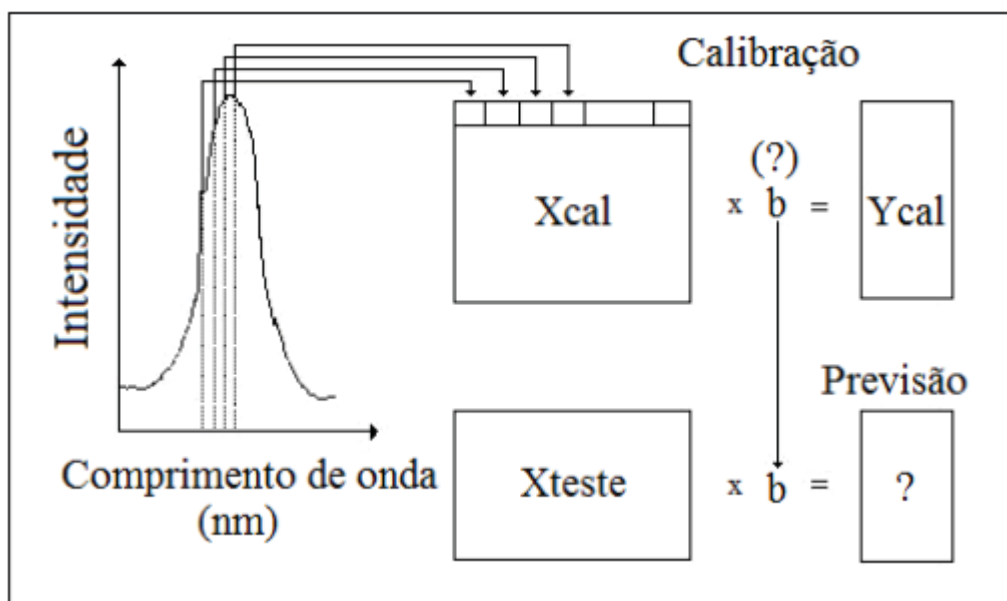
$$\mathbf{Xcal} = \mathbf{b} * \mathbf{Ycal} \quad (2)$$

.O modelo gerado é então utilizado na fase de previsão (com um conjunto de teste) para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator **Y** da equação (2), para obter a equação (3), exige a utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, (**Xteste^t**), conforme a equação (3):

$$\mathbf{Yprev} = \mathbf{Xteste}^t * \mathbf{b} \quad (3)$$

A forma de organização dos dados para aplicação da calibração multivariada é representada na forma de matriz, ilustrada na FIGURA 4 (NAGATA et al., 2001).

FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.



FONTE: ADAPTADO DE NAGATA et al., 2001.

2.7.2 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

Majoritariamente, as análises de dados multivariados objetiva por desenvolver modelos para quantificar uma propriedade de interesse. Uma maneira de abordar esse problema é mediante a construção de modelos funcionais e algorítmicos auxiliados por uma grande quantidade de medidas experimentais, ou seja, tais modelos são de caráter empírico. Os modelos são determinados pelos dados experimentais disponíveis, utilizando os métodos matemáticos chamados de regressão (FERREIRA, 2015).

A calibração multivariada baseada em técnicas de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês: *Partial Least Squares Regression*), permite a determinação de um composto de interesse em matrizes complexas, ou ainda, a análise de multicomponentes em sistemas mais simples. A PLSR é particularmente útil para prever um conjunto de variáveis dependentes a partir de um conjunto muito grande de variáveis independentes (ABDI, 2010). Esse é o método de regressão mais popular na Quimiometria (FERREIRA, 2015).

Este método de regressão possui duas variantes, conhecidas como PLS1 e PLS2. No método PLS1, cada coluna da matriz Y_{cal} (variável dependente) é modelada individualmente, ou seja, para cada constituinte de interesse é calculado um conjunto separado de *scores* e variáveis latentes. Já no método PLS2, obtém-se apenas um conjunto de *scores* e variáveis latentes para todas as colunas da matriz Y_{cal} (FERREIRA et al., 1999).

A PLSR possui grande aplicação em métodos espectroscópicos, sendo que o método consiste em aproximar o espaço multidimensional das medidas originais em outro de dimensão reduzida, mas na decomposição da matriz \mathbf{X} das variáveis independentes, é imposta uma restrição de maneira que a solução seja a propriedade de interesse. Os fatores, chamados de variáveis latentes, são definidos de maneira a manter uma relação entre a variância em \mathbf{X} e a previsão da variável dependente, \mathbf{Y} . Uma das vantagens do modelo PLSR, é que o mesmo é construído em uma etapa única, sendo as informações da matriz \mathbf{X} e da propriedade de interesse, consideradas durante a decomposição e a compressão dos dados (FERREIRA, 2015).

A PLSR é baseada na Análise de Componentes Principais (PCA). O método PCA decompõe a matriz de dados \mathbf{X} em um novo sistema de eixos (chamados de componentes principais), isso torna viável que as amostras possam ser representadas em um número menor de dimensões, sem que ocorra a perda de informações relevantes sobre o sistema. Com a obtenção desse novo sistema de eixos, a parte não modelada de \mathbf{X} é considerada como uma matriz de erros (\mathbf{E}), as novas coordenadas da amostra são ditas “scores” (\mathbf{t} ou \mathbf{u}) e os “loadings” (\mathbf{p} ou \mathbf{q}), sendo esse último o peso com que cada variável antiga contribui na formação das componentes principais. Na PLSR, a matriz \mathbf{X}_{cal} e a matriz \mathbf{Y}_{cal} sofrem decomposição matricial, sendo então representadas por *scores* e *loadings*:

$$\mathbf{X}_{cal} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (4)$$

$$\mathbf{Y}_{cal} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{E} \quad (5)$$

Posteriormente, realiza-se uma relação entre as duas matrizes de *scores* de cada um dos blocos de dados, através de um modelo linear (Equação 6):

$$\mathbf{U} = \mathbf{b} * \mathbf{T} \quad (6)$$

Após obtenção do vetor \mathbf{b} (chamado de vetor de coeficiente de regressão), é possível utilizá-lo para realizar a previsão da propriedade de interesse de novas amostras, através de seus dados espectrais (NAGATA et al., 2001). Para a obtenção do vetor \mathbf{b} que melhor represente a correlação desejada, dois fatores devem ser considerados: a escolha no número de variáveis latentes suficientes para explicar a informação necessária e a detecção e retirada de amostras anômalas no conjunto de calibração. Para ajudar nessas decisões, comumente são utilizados procedimentos de validação cruzada, onde durante a construção dos modelos, uma ou mais amostras do

conjunto de calibração são excluídas (cada amostra é excluída uma única vez), então, os valores da propriedade de interesse das amostras excluídas são estimados e comparados com os respectivos valores experimentais, quando são calculados os resíduos. Através dos valores de resíduos, obtém-se a raiz da média quadrática da validação cruzada (RMSECV), que determina o número de variáveis latentes que gera o menor erro de previsão (FERREIRA, 2015).

Os métodos de calibração multivariada têm sido aplicados para resolver problemas em análises de parabenos por espectrofotometria UV-Vis em amostras complexas (KHANI et al., 2014). Em amostras alimentícias, como no estudo de Chen e Ni (2009), onde foram testados diversos métodos quimiométricos para a determinação de conservantes (incluindo MP e PP) em alimentos, nesse estudo, os menores erros relativos de previsão foram obtidos utilizando PCR (erro relativo de 6,98 % para MP e 4,45 % para PP) e redes neurais artificiais associadas a funções de base radial (RBF-ANN – erro relativo de 7,21 % para MP e 5,34 % para PP). E também em amostras farmacêuticas, como o estudo de Collado et al. (2000), que determinou MP e outros compostos simultaneamente em soluções oftalmológicas utilizando métodos multivariados. Conservantes, incluindo MP e PP, também foram determinados em produtos farmacêuticos, através da espectroscopia NIR usando métodos multivariados de calibração (BLANCO et al., 2008).

Dentro da área de análise de matrizes cosméticas, o uso de ferramentas quimiométricas são pouco exploradas, mas existem alguns estudos recentes, como o de Deconinck et al. (2014), que utiliza um método supervisionado de reconhecimento de padrões (método *k*-NN) para detectar agentes branqueadores ilegais em cosméticos por espectroscopia ATR-FTIR. E também, o trabalho de Godinho, Santos e Poppi (2016), no qual eles utilizam uma metodologia baseada em espectroscopia Raman associada com calibração multivariada para determinação do teor de fragrância em perfumes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método cromatográfico para a determinação de metilparabeno, propilparabeno e/ou fenoxietanol em matrizes cosméticas e avaliar o desempenho analítico de métodos espectroscópicos associados à calibração multivariada para a determinação destes conservantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estabelecer um método cromatográfico (HPLC-DAD) de referência na determinação de conservantes em produtos cosméticos.
- 2) Validar o método cromatográfico desenvolvido.
- 3) Desenvolvimento de modelos multivariados para determinação de conservantes por espectrofotometria UV-Visível.
- 4) Aplicar o modelo multivariado desenvolvido por espectrofotometria UV-Visível de melhor desempenho na determinação das espécies de interesse em cosméticos.
- 5) Desenvolvimento de modelos multivariados para determinação de conservantes por espectroscopia no infravermelho.
- 6) Aplicar o modelo multivariado desenvolvido por espectroscopia infravermelho de melhor desempenho na determinação das espécies de interesse em cosméticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E INSUMOS

Os reagentes empregados para o método de extração, são: Sulfato de Magnésio Anidro - $MgSO_4$ (>99,5 %, Sigma-Aldrich[®]), Cloreto de sódio – NaCl (P.A., Merck[®]), Florisil[®] 60-100 mesh (Química Moderna), sílica gel 100 (C18 – Fluka Analytical[®]), sílica PSA SPE (Supelco[®]). Os solventes empregados para a determinação cromatográfica foram metanol grau HPLC (99,99%, JTBaker[®]), acetona grau HPLC (99,9 %, Panreac[®]) e água ultrapura obtida por osmose reversa e posteriormente deionizada (18,2 MΩ cm, Millipore-Simplicity UV, Bedford, MA, USA), filtro de membrana Whatman[®] acetato de celulose ME 25/21 ST 0,45 μm, Ø=47 mm. Todas as soluções aquosas foram preparadas em água ultrapura.

Os padrões de alta pureza (>99%) dos conservantes estudados foram de procedência Sigma-Aldrich[®].

Todos os materiais e vidrarias empregados no trabalho foram previamente calibrados. A descontaminação das vidrarias e tubos foi realizada por lavagem com álcool etílico comercial, água da torneira e banho de ácido nítrico 10% por 24 horas. Após esse período procedeu-se o enxague com água de torneira, água destilada, água deionizada (nesta ordem) e então foram secas ao ar (vidrarias volumétricas) ou em estufa (temperatura máxima de 60 °C).

4.2 EQUIPAMENTOS

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (HPLC – Agilent Technologies[®] 1260 Infinity), equipado com injetor automático (G1329B – 1260 ALS) e detector de arranjo de diodos (G1315C-1260 DAD). Para a separação, foi utilizada uma coluna de octadecilsilano (C18 ZORBAX Eclipse, 50 x 4,6 mm, 5 μm) com controle de temperatura em 25 °C, pré-coluna C18 de mesma marca, eluição gradiente MeOH:água e vazão de 1 mL min⁻¹, sendo monitorado os comprimentos de onda de 254 nm e 270 nm. O cromatógrafo é operado pelo *software* OpenLAB[®] CDS (EZChrom edition) versão A.04.05 e as amostras foram diluídas em fase móvel, com injeção de 50 μL.

Os espectros de absorção na região UV foram adquiridos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC (*software* UVPC39[®]), no intervalo de 190 a 350 nm (resolução de 0,2 nm), com velocidade média de varredura, largura da fenda de 1,0 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Os espectros de infravermelho foram adquiridos em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Varian, modelo 640-IR, equipado com acessório ATR de marca Pike[®], modelo Miracle[®] com cristal de diamante, a resolução da medida é de 4 cm^{-1} , faixa de leitura de $4000\text{ a }550\text{ cm}^{-1}$ e 4 varreduras por amostra.

As pesagens foram efetuadas em balança analítica digital OHAUS[®] Adventurer Pro AV264P ($\pm 0,1\text{ mg}$) e balança analítica Mettler-Toledo[®] XS205DU com precisão de $\pm 0,01\text{ mg}$. A agitação das amostras foi realizada em vortex B. Braun[®] Biotech International Certomat MV, e a centrifugação em centrífuga Eppendorf[®] 5702.

4.3 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Para a elaboração da análise multivariada empregou-se o pacote PLS-toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) que opera em ambiente Matlab[®] v.7.0.1 (Math Work Inc.). Os espectros foram processados por meio do programa OriginPro[®] v 8.0724 (OriginLab).

4.4 METODOLOGIA

4.4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

Foram preparadas soluções estoque de cada um dos analitos, na concentração de 1000 mg L^{-1} em metanol grau HPLC, pesando-se $10,00\text{ mg}$ dos padrões em balança analítica Mettler-Toledo XS205DU, e diluindo-os em $10,00\text{ mL}$ de metanol grau HPLC. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e refrigerados à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir destas soluções estoque, foram preparadas soluções contendo concentrações intermediárias através da diluição em metanol, que posteriormente foram utilizadas para preparar as soluções trabalho, diluídas em fase móvel, ou conforme metodologia empregada.

4.4.2 PREPARO DE AMOSTRA

Como o presente trabalho visa à análise de amostras cosméticas, para o desenvolvimento do método cromatográfico foram utilizados cosméticos comprados em comércio locais e isentos dos analitos de interesse (dado fornecido a partir do rótulo do produto e confirmado posteriormente através da análise por cromatografia), que foram fortificados com soluções padrões conforme a metodologia utilizada. Dentre os cosméticos analisados, foram considerados para a primeira etapa do trabalho, cremes hidratantes, cremes limpadores e sabonetes líquidos.

Objetivando a extração e o *clean up* das amostras, foi estabelecido um método baseado em QuEChERS para o preparo de amostra. A etapa de otimização dos parâmetros do procedimento QuEChERS consistiu na avaliação univariada dos seguintes parâmetros:

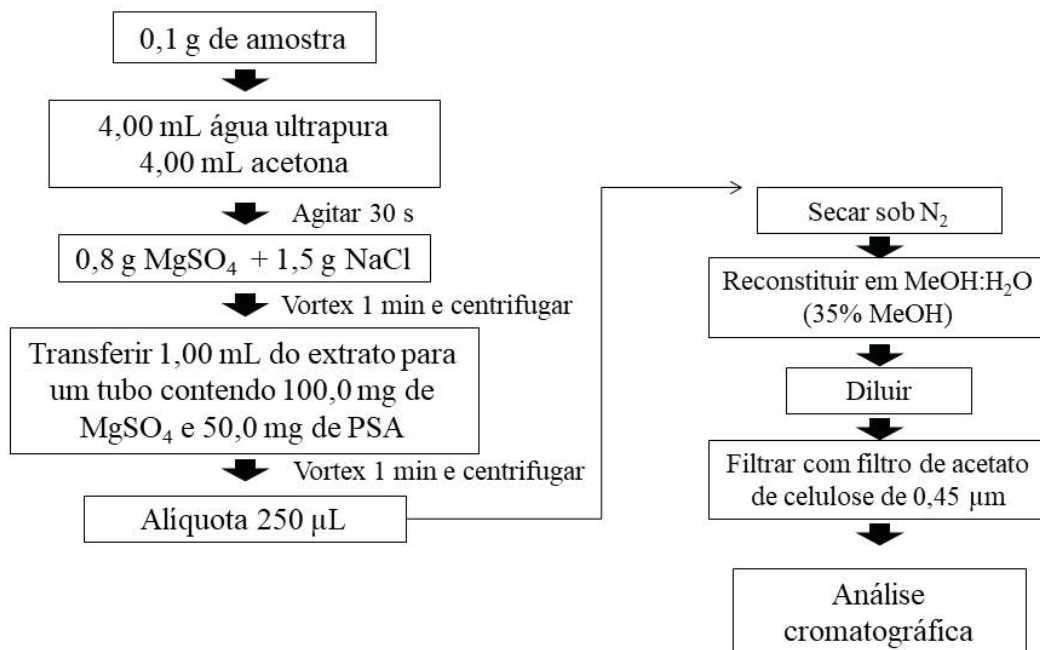
- Solvente orgânico: Acetonitrila, metanol, acetona, Acetonitrila/acetona, acetonitrila/metanol;
- Sorvente de *clean up*: amina primária-secundária (PSA – do inglês: *primary secondary amine*), C18, Florisil[®], C18 + PSA, C18 + Florisil[®].

Os quais foram avaliados em termos de recuperação em relação à curva construída com os padrões das espécies de interesse, e em termos de coeficiente de variação (CV %). O procedimento QuEChERS desenvolvido e otimizado pode ser descrito da seguinte forma:

- Etapa de extração: pesou-se 100,0 mg de amostra em um tubo cônico de polipropileno de 15 mL, e então adicionou-se 4,00 mL de água ultrapura e 4,00 mL de acetona (solvente extrator), após homogeneização por agitação manual por 30 segundos, adicionou-se uma mistura de sais (0,8 g de MgSO₄ e 1,5 g NaCl) e em seguida, procedeu-se a agitação vortex por 1 min e centrifugação por 15 min a 4400 rpm.
- Etapa de Clean up: transferiu-se 1,00 mL do extrato obtido anteriormente (etapa de extração) para outro tubo cônico de polipropileno de 15 mL contendo 100,0 mg de MgSO₄ e 50,0 mg de sorvente amina primária-secundária (PSA), então todo o conteúdo foi agitado em vortex por 1 min e seguida centrifugado por 15 min a 4400 rpm.

Após a etapa de *clean up*, uma alíquota de 250 µL do extrato foi transferida para um vial de 2 mL e seco sob gás nitrogênio (N₂ – procedência Air Liquide[™]). Posteriormente, reconstituiu-se o extrato seco em fase móvel (35% MeOH e 65% H₂O) até o volume de 1,00 mL. Uma alíquota de 200 µL foi transferida para outro vial de 2 mL e diluída até o volume de 1 mL. Então, a amostra foi filtrada com filtro de acetato de celulose de 0,45 µm, e injetada no sistema HPLC-DAD. As etapas do método QuEChERS modificado desenvolvido são ilustradas na FIGURA 5.

FIGURA 5 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DO MÉTODO QUECHERS MODIFICADO UTILIZADO NO PREPARO DAS AMOSTRAS.



FONTE: O AUTOR (2018).

4.4.3 MÉTODO HPLC-DAD

Baseando-se na literatura (ZGOŁA-GRZESKOWIAK et al., 2016), um modo de eluição gradiente foi desenvolvido para a determinação simultânea de todos os analitos, empregando-se metanol:água (v/v), com uma composição inicial de 35% de metanol, aumentando até 60% em 13 min, e retornando linearmente à condição inicial até 23 min. Foram injetados 50 µL de amostra, sob vazão de 1,0 mL min⁻¹ à temperatura de 25°C.

4.4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método cromatográfico desenvolvido foi validado segundo as orientações do “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” (ANVISA – RE nº 899, de 29 de maio de 2003) e segundo “Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos” (INMETRO – DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2010). Os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados empregando o método QuEChERS modificado desenvolvido na etapa de preparo de amostra, e como matriz branca cosmética, foi utilizado um gel limpador isento dos analitos de interesse. A formulação do cosmético utilizado emprega os seguintes compostos (ordem decrescente de concentração): água, lauril éter sulfato de sódio, polietileno glicol (peg-8), cocoamidopropil betaína, hexileno glicol, cloreto de

sódio, dioleato de metilglicose (peg-120), corante amarelo 5, corante verde 3, glicerina, ácido glicólico, trietanolamina, ácido salicílico, benzoato de sódio, hidróxido de sódio, glicirrizinato dipotássio, caprilil glicol, ácido caprilil salicílico, ácido cítrico, butilenoglicol e fragrância.

4.4.4.1 SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas dos extratos de amostras branco (gel limpador) com os extratos das amostras branco fortificadas com solução padrão de MP, PP e FE na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os parabenos e $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FE. Comparando-se os cromatogramas é possível verificar se há a presença de picos provenientes de substâncias interferentes na mesma região de tempo de retenção dos analitos, assim como, observar se há diferença no tempo de retenção das espécies de interesse na amostra branco em relação ao cromatograma da solução padrão do analito.

4.4.4.2 CURVA ANALÍTICA

Foram avaliadas curvas analíticas em triplicata na faixa de concentração de 0,10 a $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os parabenos e de 1,50 a $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o fenoxietanol. Para isso, foi utilizada a matriz isenta das espécies de interesse (gel limpador), que foi então fortificada e submetida ao processo de extração. Foram também avaliadas curvas analíticas em triplicata na mesma faixa de concentração anteriormente citada, com padrões preparados a partir da diluição da solução estoque e diluídos com a fase móvel em sua proporção inicial, metanol:água 35:65 (v/v), sendo essas curvas utilizadas na etapa de desenvolvimento do método QuEChERS e para fins comparativos. Os analitos foram monitorados por detecção no ultravioleta por DAD nos comprimentos de onda: 254 nm (para o MP e PP), e 270 nm (para o FE). A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação da curva analítica.

4.4.4.3 EXATIDÃO

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada pelo cálculo do fator de recuperação. Para a determinação da exatidão, a mesma amostra branco (gel limpador) usada na a construção das curvas analíticas, foi fortificada em 3 níveis de concentração ($n=5$), sendo um nível de baixa concentração, outro de média concentração e um terceiro

de alta concentração (em relação a curva analítica), e foi utilizada a média das recuperações em cada concentração para o cálculo da exatidão (Equação 7):

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (7)$$

Os valores de exatidão devem estar entre 80 e 120 %, de acordo com os critérios de aceitação da ANVISA (2003).

4.4.4.4 PRECISÃO

O estudo de precisão do método desenvolvido foi feito por ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada com a amostra branco (gel limpador) que foi fortificada com solução padrão dos analitos em 3 níveis de concentração (n=5), sendo avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV), como mostra a Equação 8, em que DP é o desvio padrão e CM é a concentração média das replicatas:

$$\text{CV(\%)} = \frac{\text{DP}}{\text{CM}} \times 100 \quad (8)$$

Avaliou-se a concordância entre os resultados. O limite de aceitação é de CV < 15%, de acordo com a ANVISA (2003).

Para a avaliação da precisão intermediária, foram realizados ensaios de repetibilidade em dois dias diferentes (n=10), e esta também foi avaliada em termos de coeficiente de variação (CV), com o mesmo limite de aceitação da repetibilidade.

4.4.4.5. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para cada um dos analitos, os seus respectivos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) do método foram estimados a partir dos parâmetros de suas curvas analíticas, obtidas após extração da matriz branca fortificada. Os cálculos de LD e LQ são mostrados nas Equações 9 e 10 respectivamente:

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (9)$$

$$\text{LQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (10)$$

Em que, s é o desvio padrão do coeficiente linear da equação e S é o coeficiente angular da curva analítica.

4.4.4.6 TESTE DE ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico indica sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A robustez do método foi avaliada por meio do teste de Youden, no qual foi empregado amostra branco (gel limpador) fortificada com solução padrão na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e PP, e $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FE. As condições experimentais foram variadas conforme descrito na TABELA 3, realizando-se 8 ensaios em duplicata seguindo o planejamento fatorial fracionado característico do teste de Youden (TABELA 4) (KARAGEORGOU e SAMANIDOU, 2014). Para a escolha dos fatores referentes aos parâmetros do cromatógrafo, foi utilizado como base o trabalho de Ribani et al.(2004).

TABELA 3 – FATORES AVALIADOS NO TESTE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

	Fator	Nominal	Varição
A	T coluna (°C)	25	27
B	% MeOH inicial	35	36
C	fluxo (mL min^{-1})	1,00	0,95
D	t vortex (min)	1'00"	1'10"
E	t centrífuga (min)	15'00"	16'00"
F	PSA (mg)	50	55
G	MgSO ₄ (mg)	100	105

FONTE: O AUTOR (2018).

TABELA 4 – MATRIZ DOS FATORES AVALIADOS NO TESTE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	A	A	A	a	a	a	a
B	B	B	B	b	B	B	b	b
C	C	c	C	c	C	c	C	c
D	D	D	D	d	d	d	D	D
E	E	e	E	e	e	E	e	E
F	F	f	F	F	F	f	f	F
G	G	g	G	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	U	v	w	x	y	z

FONTE: O AUTOR (2018).

O efeito de cada fator pode ser avaliado com os valores das respostas de cada ensaio, sendo a concentração a resposta de interesse nesse estudo. Por exemplo, ao se aplicar as condições do ensaio **1**, a resposta será **s** e assim sucessivamente. O cálculo do efeito de cada fator pode ser realizado pela diferença entre as respostas dos ensaios da condição nominal do fator (representados pela letra em maiúsculo na TABELA 4) e as respostas dos ensaios que correspondem a variação do fator (representados pelas letras em minúsculo na TABELA 4), conforme demonstra a Equação 11:

$$\text{Efeito Aa} = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad (11)$$

O mesmo processo é realizado para cada um dos fatores. A robustez de um determinado fator pode então ser avaliada pelo teste de comparação entre duas variâncias (teste F) (Equação 12), onde se compara a variância obtida dos ensaios da condição nominal com a variância obtidas dos ensaios de variação e se compara o valor obtido com um valor de F_{tabelado} .

$$\text{Teste F} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (12)$$

Onde $s_1 > s_2$.

Nesse caso, o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser menor que o valor de F_{tabelado} para que as duas variâncias comparadas não sejam diferentes entre si.

4.4.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.

Para o desenvolvimento dos modelos multivariados, foram preparadas 25 misturas sintéticas através da diluição das soluções estoque na faixa de concentração de 4,0 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MP e PP conforme mostrado na TABELA 5. As misturas sintéticas foram preparadas em balões volumétricos de 10,0 mL usando como solvente água ultrapura, e posteriormente conduzidas para a análise espectrofotométrica na região do UV.

Os dados experimentais obtidos foram tratados com o objetivo de reduzir as variações indesejáveis não removidas na aquisição dos dados. Para isso, foram testados alguns procedimentos de transformação de dados, como (FERREIRA, 2015):

- a) Alisamento pelo método de Savitzky-Golay: visa à redução da componente aleatória dos dados, resultando no aumento da razão sinal/ruído (S/R). O filtro

desse método depende de dois parâmetros: o número de pontos da janela e do grau do polinômio ajustado.

- b) Correção da linha base utilizando derivadas: método utilizado quando se tem deslocamento do espectro como um todo em relação ao zero de absorvância, nesses casos, a primeira derivada pode corrigir esse deslocamento. A segunda derivada também é importante, pois nos informa sobre a concavidade de uma curva. Vale ressaltar que a área abaixo de um pico do espectro e sua relação com a concentração é preservada ao aplicar a derivada.

Foram elaborados modelos de calibração multivariada utilizando-se a metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) no modo PLS-2 e otimizados pela triagem de número de variáveis latentes, ausência de amostras anômalas, erros de validação cruzada (RMSECV), que é uma forma de sumarizar os resíduos das previsões da validação cruzada, descrita pela Equação 13.

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2}{I}} \quad (13)$$

Onde y_i é o valor real e \hat{y}_i é o valor estimado e I representa o número de amostras usadas na validação cruzada.

Para a validação cruzada foi utilizado o procedimento *leave one out*, que consiste basicamente em excluir uma amostra de cada vez, construindo um modelo sem esta amostra, e prever o valor de suas variáveis dependentes. O processo é repetido até que todas as amostras do conjunto tenham sido consideradas como amostra de previsão (KIRALJ e FERREIRA, 2009).

Foi utilizado também, como parâmetro para escolha do modelo otimizado, um conjunto de validação externa (erro relativo médio, ERM – Equações 14 e 15) e um vetor de coeficiente de regressão representativo para a análise requerida.

$$\% \text{ ER} = \frac{\text{valor estimado} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \times 100 \quad (14)$$

$$\% \text{ ERM} = \frac{\sum_{p=1}^P |ER_p|}{n^\circ \text{ de amostras}} \quad (15)$$

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NO UV PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.

Nº da mistura	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	MP	PP
1	4,0	4,0
2	5,5	4,0
3	7,0	4,0
4	8,5	4,0
5	10,0	4,0
6	4,0	5,5
7	5,5	5,5
8	7,0	5,5
9	8,5	5,5
10	10,0	5,5
11	4,0	7,0
12	5,5	7,0
13	7,0	7,0
14	8,5	7,0
15	10,0	7,0
16	4,0	8,5
17	5,5	8,5
18	7,0	8,5
19	8,5	8,5
20	10,0	8,5
21	4,0	10,0
22	5,5	10,0
23	7,0	10,0
24	8,5	10,0
25	10,0	10,0

FONTE: O AUTOR (2018).

4.4.6 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS (PB).

Para o desenvolvimento dos modelos multivariados, foram preparadas 31 misturas sintéticas através da diluição das soluções estoque na faixa de concentração de 4,0 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e PP conforme mostrado na TABELA 6. Para simular a presença de outro conservante (fenoxietanol), empregado concomitantemente com os parabenos, as misturas sintéticas foram preparadas na presença de concentrações variadas deste outro componente (5,0 a 13,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todas as misturas foram preparadas em balões volumétricos de 10,0 mL usando como solvente metanol. Foram elaborados modelos de calibração multivariada utilizando-se a metodologia PLSR, sempre testando procedimentos de transformação de dados como alisamento e correção

por derivação dos espectros, os modelos também foram otimizados pela triagem de número de variáveis latentes, ausência de amostras anômalas (observado pelos valores de *leverage* e pelos valores dos resíduos de Student de cada amostra), erros de validação cruzada *leave-one-out* (RMSECV) e validação externa (erro relativo médio, %) e obtenção de um vetor de coeficiente de regressão representativo para a análise requerida.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NO UV PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS (PB) NA PRESENÇA DE FENOXIETANOL (FE).

N° da mistura	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	FE	MP	PP	PB (MP + PP)
1	5,0	3,0	8,0	11,0
2	5,0	10,0	3,0	13,0
3	15,0	3,0	3,0	6,0
4	6,0	5,1	6,0	11,1
5	8,0	3,7	6,0	9,7
6	5,0	6,5	5,5	12,0
7	10,0	3,0	5,5	8,5
8	6,0	6,5	5,0	11,5
9	8,0	5,1	5,0	10,1
10	9,0	4,4	5,0	9,4
11	10,0	3,7	5,0	8,7
12	8,0	6,5	4,0	10,5
13	10,0	5,1	4,0	9,1
14	12,0	3,7	4,0	7,7
15	9,0	6,5	3,5	10,0
16	10,0	5,8	3,5	9,3
17	12,0	4,4	3,5	7,9
18	10,0	6,5	3,0	9,5
19	6,0	7,9	4,0	11,9
20	7,0	7,2	4,0	11,2
21	7,0	5,1	5,5	10,6
22	8,0	4,4	5,5	9,9
23	8,0	5,8	4,5	10,3
24	9,0	5,1	4,5	9,6
25	10,0	4,4	4,5	8,9
26	7,0	6,5	4,5	11,0
27	13,0	3,7	3,5	7,2
28	7,0	7,9	3,5	11,4
29	6,0	8,6	3,5	12,1
30	11,0	4,4	4,0	8,4
31	7,0	3,7	6,5	10,2

FONTE: O AUTOR (2018).

4.4.7 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Nesta etapa, foi estabelecido um número de 4 varreduras na leitura das amostras, sendo que com esse número de varreduras, a inserção de ruídos nos espectros era mínima, fato que pôde ser observado pela comparação com os espectros obtidos com um número maior de varreduras. Optou-se por não utilizar um número maior de varreduras devido à evaporação da acetona, o que prejudica a análise. Após a leitura de cada amostra, o ar atmosférico foi medido como *background*.

As soluções dos padrões foram preparadas pela dissolução direta dos padrões de alta pureza em acetona (utilizando vidraria volumétrica calibrada), sendo estas preparadas na concentração de 50,0 mg mL⁻¹ para o FE e 10,0 mg mL⁻¹ para MP e para PP. Para o desenvolvimento dos modelos multivariados, foram preparadas 35 misturas sintéticas na faixa de concentração de 0,6 mg g⁻¹ a 4,6 mg g⁻¹ para MP, de 0,5 mg g⁻¹ a 2,5 mg g⁻¹ para PP e 1,0 mg g⁻¹ a 11,0 mg g⁻¹ para FE conforme mostra a TABELA 7, onde PB são os parabenos totais, sendo este a soma dos valores de concentração de MP e PP.

As misturas foram preparadas fortificando-se uma matriz branco, um creme hidratante comercial, isenta dos analitos de interesse, cuja composição é (ordem decrescente de concentração): água, parafina líquida, isohexadecano, glicerina, palmitato de isopropila, cera microcristalina, óleo de rícino hidrogenado (PEG-40), diisoestearato de triglicerol, óleo de amêndoa (*Prunus Amygdalus Dulcis*), glicerol glicosídeo, flor de sal, sulfato de magnésio, citrato de sódio, ácido cítrico, sorbato de potássio, etil-hexil-glicerina, linalool, d-limoneno, álcool benzílico, geraniol, citronelol, butilfenil metilpropional, alfa-isometilionona e perfume.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.

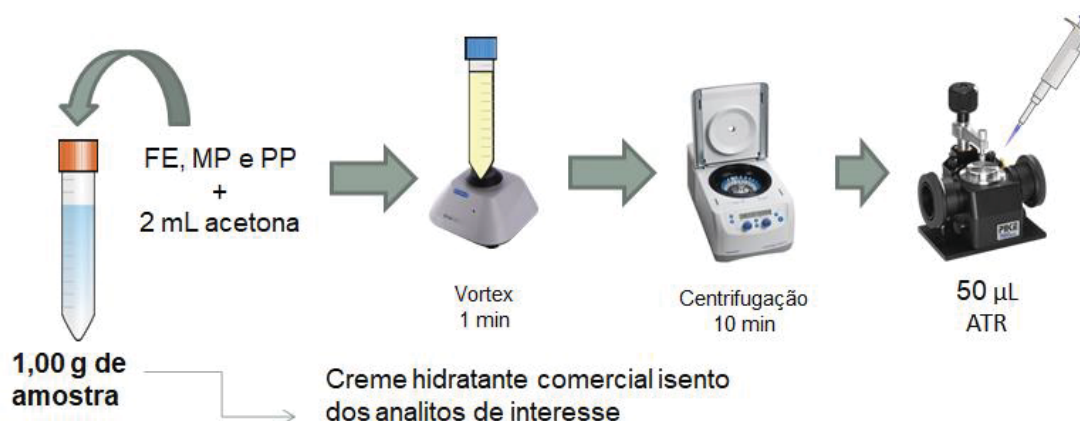
Nº da mistura	Concentração (mg g ⁻¹)			
	FE	MP	PP	PB (MP + PP)
1	1,0	0,6	2,5	3,1
2	1,0	4,6	0,5	5,1
3	11,0	0,6	0,5	1,1
4	2,0	1,0	2,1	3,1
5	2,0	1,8	1,7	3,5
6	4,0	1,0	1,7	2,7
7	1,0	2,6	1,5	4,1
8	6,0	0,6	1,5	2,1
9	2,0	2,6	1,3	3,9
10	3,0	2,2	1,3	3,5
11	4,0	1,8	1,3	3,1
12	5,0	1,4	1,3	2,7
13	6,0	1,0	1,3	2,3
14	4,0	2,6	0,9	3,5
15	6,0	1,8	0,9	2,7
16	8,0	1,0	0,9	1,9
17	5,0	2,6	0,7	3,3
18	6,0	2,2	0,7	2,9
19	8,0	1,4	0,7	2,1
20	6,0	2,6	0,5	3,1
21	2,0	3,4	0,9	4,3
22	3,0	3,0	0,9	3,9
23	3,0	1,4	1,7	3,1
24	3,0	1,8	1,5	3,3
25	4,0	1,4	1,5	2,9
26	4,0	2,2	1,1	3,3
27	5,0	1,8	1,1	2,9
28	6,0	1,4	1,1	2,5
29	3,0	2,6	1,1	3,7
30	9,0	1,0	0,7	1,7
31	3,0	3,4	0,7	4,1
32	2,0	3,8	0,7	4,5
33	7,0	1,4	0,9	2,3
34	3,0	1,0	1,9	2,9
35	7,0	1,8	0,7	2,5

FONTE: O AUTOR (2018).

Objetivando um preparo mínimo de amostra, a apresentação da amostra para a leitura no sistema ATR-FTIR foi realizada da seguinte forma: pesou-se 1,00 g de amostra

em tubo cônico de polipropileno, fortificou-se com solução dos padrões conforme necessário, e adicionou-se 2,00 mL de acetona, agitou-se em vortex por 1 min e posterior centrifugação (4400 rpm) por 10 min, em seguida, leitura no sistema ATR-FTIR. A deposição da solução resultante sobre o ATR foi feita utilizando uma pipeta volumétrica com volume de 50 μ L. O esquema ilustrativo do procedimento é mostrado na FIGURA 6.

FIGURA 6 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE POR ATR-FTIR.



FONTE: O AUTOR (2018).

Mais uma vez, os modelos de calibração multivariada foram elaborados utilizando-se a metodologia PLSR (PLS-1), e foram otimizados pela transformação dos dados com método de alisamento, correção por derivada (primeira e segunda derivadas) e correção de espalhamento multiplicativo (MSC), bastante comum com técnicas ATR-FTIR. Os modelos também foram otimizados pela triagem de número de variáveis latentes, ausência de anomalias, erros de validação cruzada *leave-one-out* (RMSECV) e validação externa (erro relativo, %) e obtenção de um vetor de coeficiente de regressão representativo para a análise requerida. Neste último requisito, observou-se a inserção de ruídos e as regiões do espectro consideradas de maior influência para o modelo construído e sua semelhança com as informações dos espectros dos padrões dos analitos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA BASEADO EM QuEChERS

Para o estabelecimento do método QuEChERS na extração dos analitos, foram realizados testes de alguns parâmetros de maneira univariada, buscando a compreensão da influência do tipo de solvente usado na etapa de extração e do sorvente usado na etapa de *clean up*. Nesta etapa, foram utilizadas 3 tipos de amostras cosméticas isentas dos analitos de interesse, sendo um creme hidratante, um gel limpador (o mesmo que será utilizado na etapa de validação do método cromatográfico) e um sabonete líquido. Os valores de recuperação e coeficiente de variação foram estimados com base na curva analítica construída pelas análises em triplicata das soluções dos padrões dos analitos estudados.

As condições de tempo de agitação e centrifugação não foram alteradas durante o estudo. Na etapa de partição, foram estabelecidas as massas necessárias dos sais para que ocorresse a partição dos solventes de maneira que a fase que corresponde ao solvente orgânico utilizado fosse o mais próximo do volume inicial adicionado, indicando assim que um volume mínimo desse solvente ficou presente na fase aquosa. Tal objetivo foi alcançado de forma reprodutível utilizando 0,8 g de $MgSO_4$ e 1,5 g de NaCl.

Entre os solventes avaliados, todos os analitos apresentaram boa solubilidade em cada um deles, sendo a solubilidade aumentada em solventes mais polares (para todos os analitos). Por isso, observou-se uma tendência em obter melhores resultados empregando metanol, entretanto, com as condições utilizadas não foi possível obter separação da fase aquosa na etapa de *salting out* para esse solvente, e portanto o metanol só foi utilizado em conjunto com outros solventes.

Os testes realizados com o emprego de diferentes solventes são apresentados na TABELA 8, onde temos os valores de recuperação para os solventes estudados: acetona, acetonitrila (ACN), ACN/MeOH (60:40 v/v) e ACN/Acetona (60:40 v/v). Os valores de recuperação foram estimados pela análise das amostras brancas fortificadas na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e PP e $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FE.

TABELA 8 – VALORES DE RECUPERAÇÃO (%) E CV (%) PARA OS SOLVENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE EXTRAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS.

Solvente	FE		MP		PP	
	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
Acetona	83,7	5,2	84,0	8,9	88,6	9,0
ACN	55,2	16,2	68,5	29,1	76,5	23,9
ACN/MeOH	40,5	1,3	41,8	12,3	47,2	12,5
ACN/Acetona	68,1	13,8	74,4	20,3	78,6	23,6

FONTE: O AUTOR (2018).

Embora o método QuEChERS original utilize acetonitrila na etapa de extração, com base nos resultados obtidos, optou-se por usar a acetona como solvente extrator, pois forneceu os melhores valores de recuperação, e os menores valores de coeficiente de variação. Foi possível observar uma tendência dos valores de recuperação obtidos com acetonitrila (solvente com maior valor de $\log K_{ow}$), onde os valores de recuperação aumentaram conforme maior o valor de $\log K_{ow}$ para a espécie. Os valores obtidos com a acetona se devem principalmente a boa solubilidade que todos os analitos apresentam nesse solvente. Além disso, outra principal vantagem de se utilizar a acetona é em relação à etapa de secagem da amostra, onde a acetona é facilmente volatilizada e com isso é diminuído o consumo de gás nitrogênio. Entretanto, os tubos utilizados durante o procedimento experimental são sempre mantidos fechados, para não favorecer a volatilização do solvente utilizado.

Na TABELA 9 são mostrados os resultados em relação ao estudo para a escolha do sorvente da etapa de *clean up*. Foram avaliados 3 tipos de sorventes, sendo o PSA, a octadecilsilano (C18) e Florisil[®], além da combinação binária entre os mesmos.

TABELA 9 – VALORES DE RECUPERAÇÃO (%) E CV (%) PARA OS SORVENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE CLEAN UP DO MÉTODO QUECHERS.

Sorvente	FE		MP		PP	
	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
PSA	84,5	3,8	84,2	11,9	88,2	8,3
C18+PSA	79,5	13,8	80,1	25,4	80,4	21,8
C18	65,9	12,6	70,6	31,4	72,5	31,2
Florisil[®]	77,5	39,1	86,2	18,5	91,4	25,0
C18+Florisil[®]	80,1	20,6	90,0	0,9	90,9	1,2

FONTE: O AUTOR (2018).

Com base nos resultados, optou-se por utilizar o sorvente PSA, devido seus valores satisfatórios de recuperação e baixos valores de coeficiente de variação, para todos os analitos. Apesar da combinação C18/Florisil[®] ter apresentado melhores resultados para os parabenos, é possível observar valores elevados de coeficiente de variação para o FE, ou seja, a composição da matriz cosmética tem grande influência sobre o método QuEChERS empregado. Assim, o PSA mostrou um resultado mais consistente para os 3 analitos, além disso, o uso de apenas um tipo de sorvente simplifica o procedimento experimental, e diminui o custo do método empregado.

As matrizes cosméticas apresentam uma grande diversidade de compostos, desde a presença de compostos polares (por exemplo, ácidos orgânicos e álcoois), quanto compostos apolares (como óleo mineral e outros compostos gordurosos). O sorvente octadecilsilano (C18) é relatado como sendo eficaz na limpeza de matrizes que contêm gordura, já o sorvente Florisil[®] é eficaz principalmente na remoção de compostos de baixa polaridade (CABRERA et al., 2012). Isso explica os valores elevados de CV que estes sorventes mostraram quando utilizados individualmente, visto que a proporção de compostos de baixa polaridade pode mudar de um tipo de cosmético para outro, entretanto, a combinação destes dois sorventes apresentou bons resultados, indicando assim um efeito sinérgico na retenção dos compostos interferentes das amostras analisadas.

O PSA, por sua vez, apresenta um efeito quelante. Isso resulta em uma boa retenção de ácidos graxos livres, além de compostos polares presentes na matriz (PRESTES et al., 2009), fato que explica os bons resultados obtidos e demonstra sua versatilidade para o *clean up* de amostras cosméticas. O PSA já foi utilizado na etapa de *clean up* na análise alcaloides em cosméticos herbais, onde foi verificado que ele oferece uma boa interação com os compostos polares da matriz como álcoois e surfactantes catiônicos, enquanto o Florisil[®] mostrou uma absorção não seletiva dos compostos polares (XUN et al., 2017).

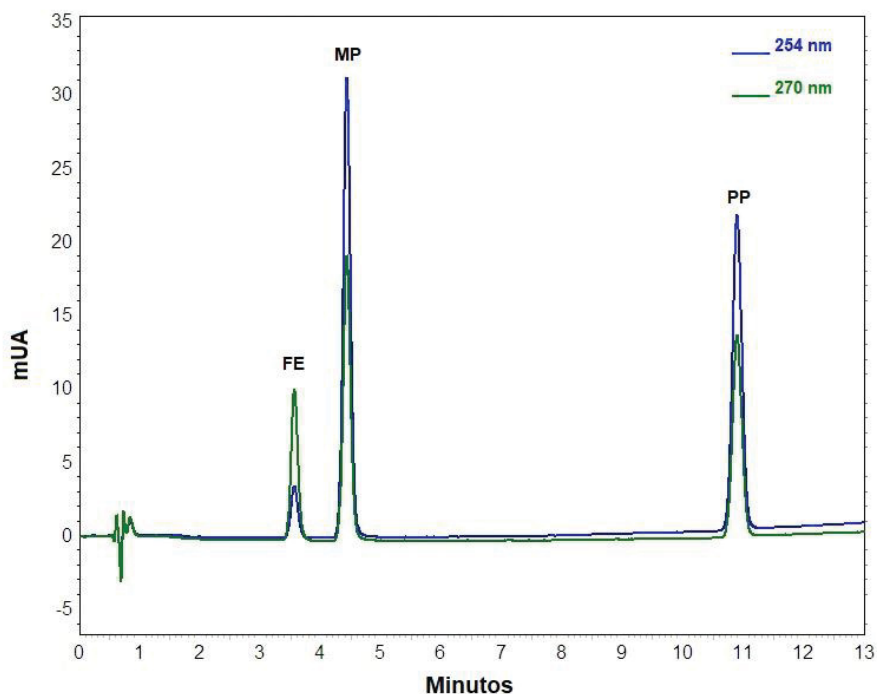
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS-HPLC-DAD

5.2.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS, LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Conforme descrito na seção 4.4.3, foi estabelecido um modo de eluição gradiente empregando-se MeOH:água, que foi otimizado de maneira obter resolução adequada para todos os analitos mantendo-se um tempo de corrida relativamente baixo. Pelos cromatogramas da FIGURA 7, pode-se observar a boa resolução obtida para todos os

analitos em um tempo de corrida inferior a 12 minutos, fato que evidencia a boa frequência analítica do método cromatográfico. O tempo de retenção para cada analito foi de 3,53 minutos para o FE, 4,34 minutos para o MP e 10,80 minutos para o PP, o que é condizente com seus valores de $\log K_{ow}$, visto que sendo a fase móvel polar, há uma tendência de que os compostos com menores valores de $\log K_{ow}$ (mais polares) apresentem os menores tempos de retenção (como pode ser observado nas TABELAS 1 E 2).

FIGURA 7 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS SOLUÇÕES CONTENDO A MISTURA DOS PADRÕES NA CONCENTRAÇÃO DE $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ PARA MP E PP, E $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ PARA FE, COM DETECÇÃO NO ULTRAVIOLETA POR DAD EM 270 NM PARA FE E 254 NM PARA MP E PP.



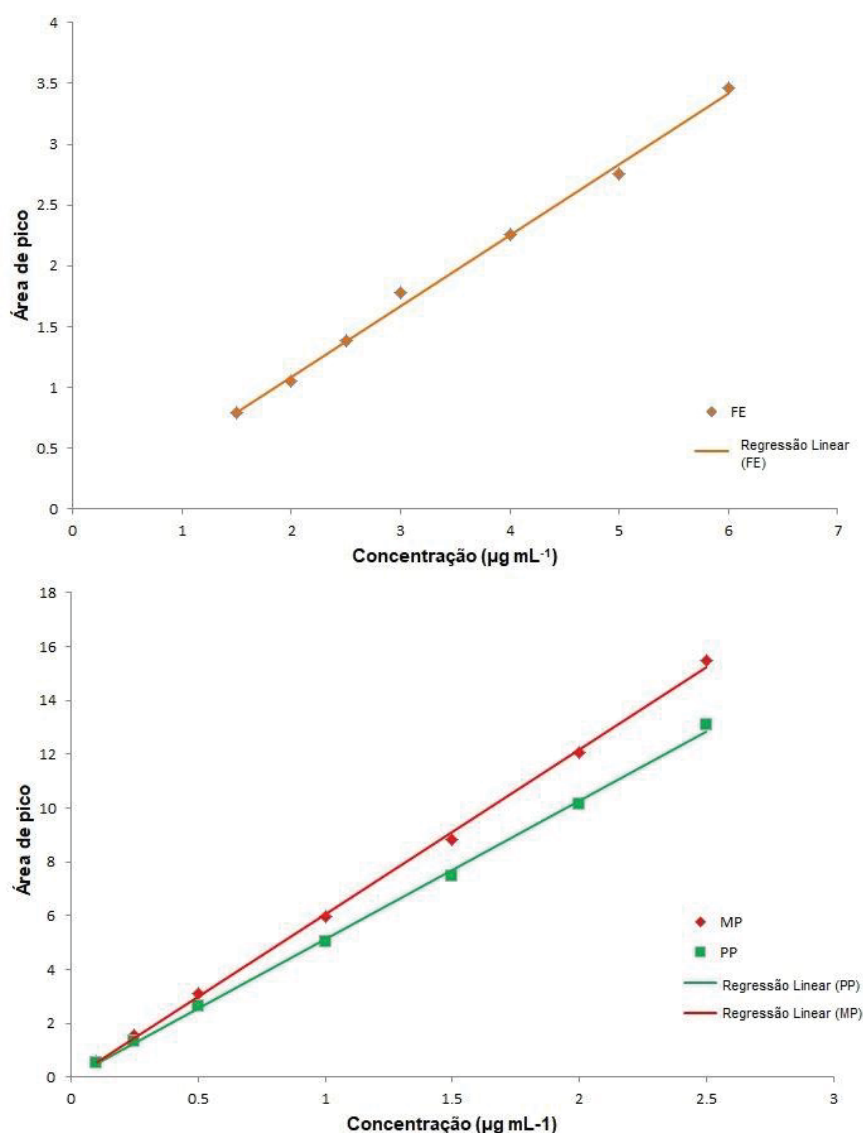
FONTE: O AUTOR (2018)

Com relação ao sistema de detecção, foram avaliados os comprimentos de onda de 254 e 270 nm. Sendo que 254 nm corresponde ao máximo de absorção para os parabenos, e é relatado na literatura o uso do comprimento de onda de 270 nm para quantificar FE (BORREMANS et al., 2004) Os testes posteriores mostraram uma linearidade satisfatória para esse analito nos comprimentos de onda especificados.

Inicialmente foi feito o preparo da curva analítica utilizando soluções padrão dos analitos (em triplicata), para ser avaliada a linearidade instrumental. Para isso, foi feita a injeção direta dos analitos em sete níveis de concentração. As curvas obtidas são mostradas na FIGURA 8. Os coeficientes de determinação obtidos (R^2) foram de 0,9962,

0,9991 e 0,9989 para FE, MP e PP, respectivamente. Os valores de R^2 obtidos indicam que os valores observados podem ser bem explicados por um modelo de regressão linear.

FIGURA 8 - CURVA DE CALIBRAÇÃO MÉDIA (N=3) DOS ANALITOS FENOXIETANOL (FE), METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP), OBTIDA PELA INJEÇÃO DIRETA DOS PADRÕES DOS ANALITOS.

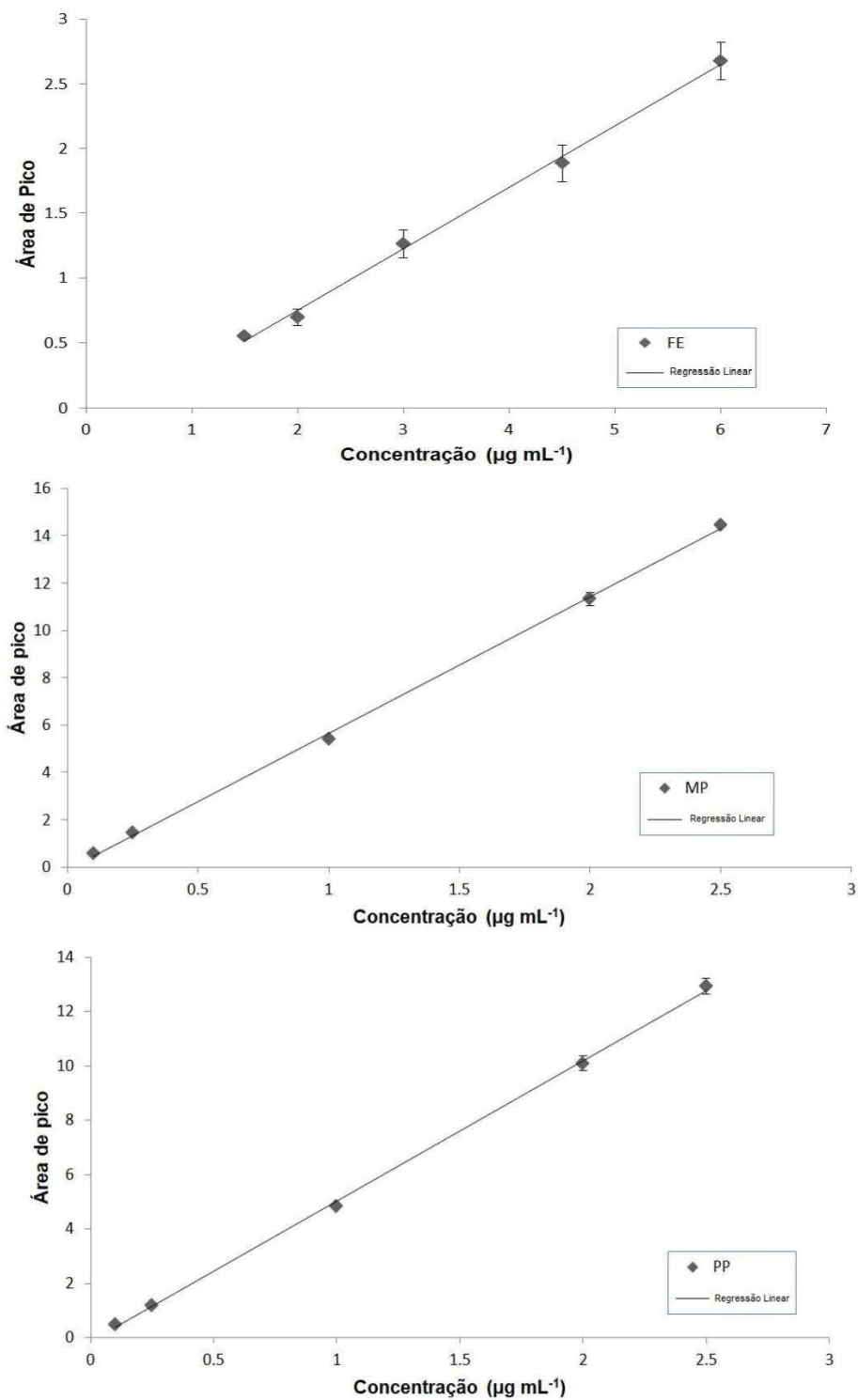


FONTE: O AUTOR (2018).

Após o estabelecimento das condições cromatográficas do método, foram avaliadas as curvas analíticas construídas (em triplicata) fortificando a matriz isenta dos analitos (cosmético gel limpador). A linearidade foi avaliada para as curvas analíticas obtidas para cada composto de interesse, assim como, a sensibilidade, que foi estimada a partir do coeficiente angular do ajuste linear das curvas obtidas. A faixa de concentração estudada foi de 0,10 a 2,50 µg mL⁻¹ para os parabenos e de 1,50 a 6,00 µg

mL^{-1} para o FE (FIGURA 9). Os parâmetros obtidos para as curvas de cada analito são apresentados na TABELA 10.

FIGURA 9 – CURVAS ANALÍTICAS MÉDIAS (N = 3) PARA OS ANALITOS MP (254 NM), PP (254 NM) E FE (270 NM) APÓS EXTRAÇÃO.



FONTE: O AUTOR (2018).

TABELA 10 - PARÂMETROS DA REGRESSÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS POR QuEChERS-HPLC-DAD.

Parâmetros	FE (270 nm)	MP (254 nm)	PP (254 nm)
Coefficiente Linear (a)	-0,199	-0,096	-0,139
Coefficiente angular (b)	0,475	5,756	5,170
Coefficiente de Determinação (R²)	0,997	0,999	0,999
Coefficiente de Correlação (r)	0,998	0,999	0,999
LD (µg mL⁻¹)	0,392	0,0180	0,00360
LQ (µg mL⁻¹)	1,188	0,0546	0,0108

FONTE: O AUTOR (2018).

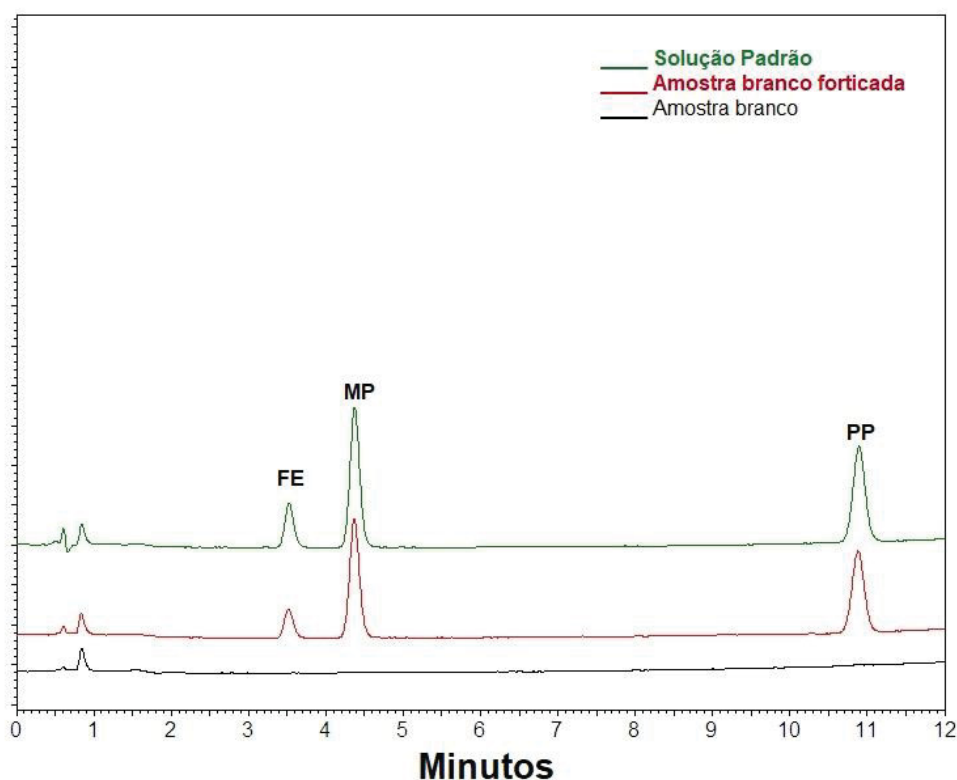
Os parâmetros de linearidade se mostraram satisfatórios, os coeficientes de determinação obtidos indicam que uma boa variância dos dados é explicada pelo modelo linear obtido (maior que 99,7%) e a sua linearidade, dentro da faixa de concentração estudada, segue o recomendado pela ANVISA ($r > 0,990$). Os resíduos mostraram uma dispersão aleatória para todos os analitos. A sensibilidade da curva, que é estimada através do coeficiente angular (b), mostra que o método apresenta uma sensibilidade próxima para os parabens estudados, enquanto para o FE o método é menos sensível, ou seja, um incremento na concentração gera um aumento da resposta instrumental mais significativo para os parabens do que para o FE.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estabelecidos e os valores de concentração estão de acordo com a faixa linear estudada, visto que o ponto inferior da curva analítica está acima do LQ. Para fins comparativos, buscou-se na literatura métodos de determinação de FE em cosméticos por HPLC-DAD, como o trabalho de Wu et al. (2008), onde é relatado um LD de $1,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FE em cosméticos. Para a determinação de MP e PP em cosméticos, foram encontrados trabalhos com métodos por HPLC-UV que relataram um LD igual a: $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ (GAO et al., 2012), $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (GAO; LEGIDO-QUIGLEY, 2011) e $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ (WU et al., 2008). Assim, verifica-se que os limites de detecção obtidos pelo método desenvolvido estão compatíveis e até menores que alguns encontrados na literatura para amostras cosméticas.

5.2.2 SELETIVIDADE

A seletividade, do método cromatográfico desenvolvido, foi avaliada pela comparação da resposta das amostras branco antes e depois de serem fortificadas com os compostos de interesse. Como se observa na FIGURA 10, não há substâncias interferentes coeluído com os analitos e não houve alteração no tempo de retenção de nenhum dos analitos, o que indica que o método é seletivo para os analitos estudados.

FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRA BRANCO E AMOSTRA BRANCO FORTIFICADA COM 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PARA FE, E 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PARA MP E PP EM COMPARAÇÃO COM A SOLUÇÃO PADRÃO DOS ANALITOS.



FONTE: O AUTOR (2018).

5.2.3 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada com cinco replicatas em três níveis de concentração (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (nível baixo), 1,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (nível médio) e 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (nível alto) para MP e PP, sendo que para FE os níveis foram 1,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No estudo de repetibilidade, foram obtidos coeficientes de variação (CV%) inferiores a 5 % na maioria dos casos, exceto no nível intermediário do FE, que

apresentou CV igual a 8,06 %, entretanto esse valor ainda está abaixo do limite preconizado pela ANVISA (CV < 15%). Em termos de precisão intermediária, este parâmetro foi avaliado por meio de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes, os coeficientes de variação ficaram abaixo de 10% em todos os casos.

A exatidão foi obtida em termos de fator de recuperação, para isso foram estabelecidos três níveis de concentração, avaliados com cinco replicatas (mesma condição experimental dos ensaios de repetibilidade), sendo obtidos valores de exatidão entre 93,77 % e 108,13 %. Todos esses valores estão em concordância com o preconizado pela ANVISA, que estabelece que os valores de recuperação devem estar entre 80% e 120%. Os resultados dos ensaios de precisão e exatidão são mostrados na TABELA 11.

TABELA 11 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO E DA EXATIDÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

Analito	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão		Recuperação (%) (n=5)
		Repetibilidade CV(%) (n=5)	Precisão Intermediária CV(%) (n=10)	
MP	0,25	3,98	4,34	99,46
	1,14	3,85	4,83	94,70
	2,00	4,61	5,28	93,78
PP	0,25	3,80	4,42	102,87
	1,14	3,20	5,46	93,77
	2,00	1,38	5,98	95,01
FE	1,80	1,92	8,22	108,13
	2,85	8,06	9,06	97,66
	5,50	3,18	6,30	96,46

FONTE: O AUTOR (2018).

5.2.4 ROBUSTEZ

A robustez do método cromatográfico foi avaliada através do teste de Youden. Uma das formas de se avaliar os resultados do teste de Youden é através do teste F, cujos resultados são mostrados na TABELA 12.

TABELA 12 – VALORES OBTIDOS PELO TESTE F PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

Analito	Valor de F calculado para o efeito						
	A/a	B/b	C/c	D/d	E/e	F/f	G/g
MP	10,90	2,71	2,83	1,43	5,73	1,41	1,14
PP	7,66	1,04	0,14	1,35	3,78	2,18	1,53
FE	1,20	1,80	1,28	1,50	1,32	13,05	1,21

*valor de F tabelado = 15,44 (modo bicaudal, 3 graus de liberdade e 95% de confiança)
 FONTE: O AUTOR (2018).

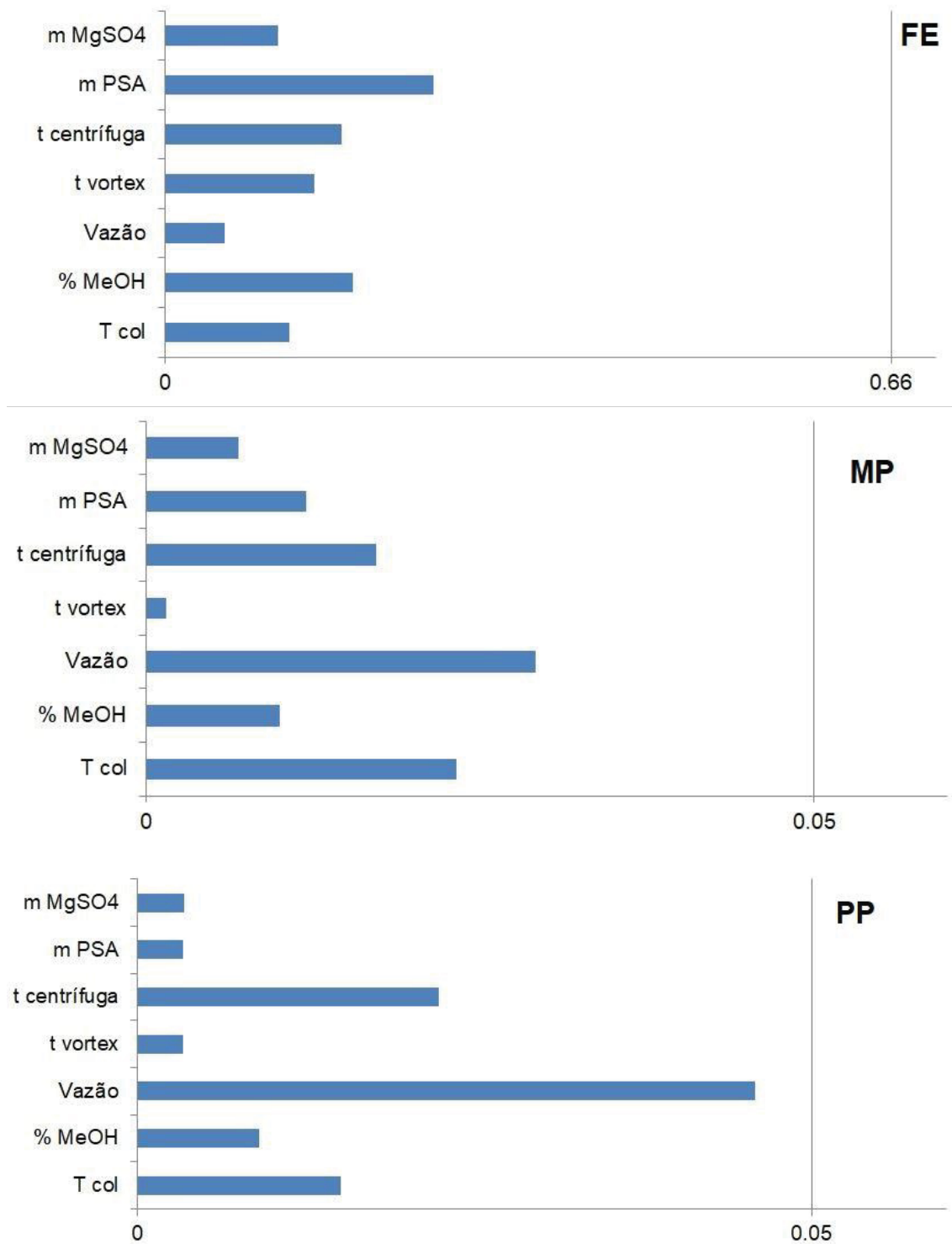
Pelo teste de comparação das variâncias o método mostrou-se robusto, pois nenhum valor de $F_{\text{calculado}}$ para os efeitos apresentou valor maior que o F_{tabelado} , indicando assim que não há diferença significativa entre as variâncias dos ensaios na condição nominal e da condição da variação. Ainda pelo teste de Youden, é possível avaliar os efeitos das variações realizadas, como mostra os gráficos de Pareto da FIGURA 11.

Pelos gráficos de Pareto, é possível observar que o efeito das variações para todos os fatores não foram significativos, indicando que o método é robusto. Apesar disso, é possível observar quais fatores foram mais influenciados pelas variações, no caso do FE, nota-se que a variação da massa pesada de PSA causa um efeito maior em relação aos outros fatores, o que é esperado, visto que o PSA está associado à etapa de *clean up* da amostra, e de fato essa etapa é crucial para a determinação do analito na matriz estudada, entretanto esse efeito não foi estatisticamente significativo.

Para o MP, os fatores que mais são influenciados pelas variações foram à vazão da fase móvel e o tempo de centrifugação. Ambos os fatores tem seus controles automatizados, logo não sofrem variações significativas durante o procedimento experimental. A necessidade de se avaliar esses fatores está relacionada com a transferência do método para outros equipamentos, que pode acarretar em pequenas variações nos programas que controlam cada parâmetro do equipamento.

No caso do PP, a vazão da fase móvel e a temperatura da coluna se mostraram os fatores mais influenciados pela variação, assim como para o MP esses fatores têm seus controles automatizados, logo não sofrem variações durante o procedimento experimental.

FIGURA 11 – GRÁFICOS DE PARETO COM VALORES ABSOLUTOS DE EFEITO OBTIDOS A PARTIR DO TESTE DE YOUDEN.



t crítico = 2,306 (8 graus de liberdade, nível de confiança de 95 %).

FONTE: O AUTOR (2018).

5.2.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS PELO MÉTODO QuEChERS-HPLC-DAD

Foram analisados nove produtos cosméticos comerciais comprados em lojas da região de Curitiba, sendo quatro produtos analisados em triplicata e cinco produtos analisados em duplicata, os valores de concentração obtidos são apresentados na TABELA 13. Entre os cosméticos analisados, temos cremes hidratantes (cosméticos 1, 2, 3 e 8), gel limpador (cosmético 4) e loções hidratantes (cosméticos 5, 6, 7 e 9). A FIGURA 12 mostra os cromatogramas (270 nm) obtidos na análise dessas amostras reais, onde se observa a boa resolução dos picos cromatográficos referentes aos analitos de interesse.

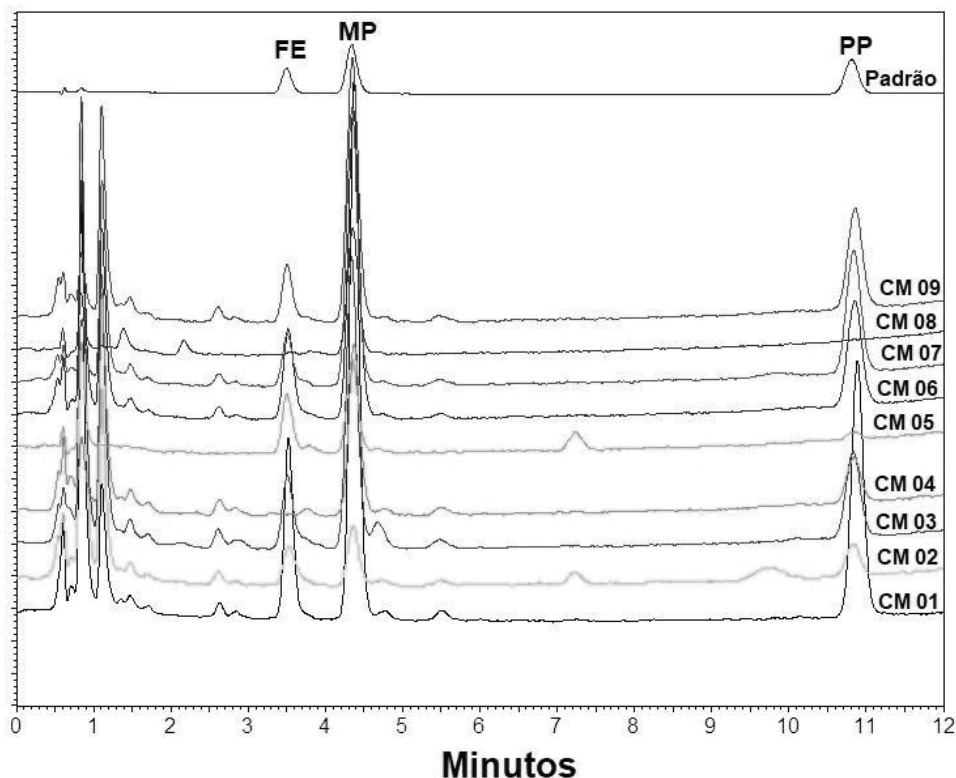
TABELA 13 – VALORES DE CONCENTRAÇÕES DE AMOSTRAS REAIS ANALISADAS PELO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

Cosmético	n	Concentração encontrada					
		FE		MP		PP	
		$\mu\text{g mL}^{-1}$	% - m/m	$\mu\text{g mL}^{-1}$	% - m/m	$\mu\text{g mL}^{-1}$	% - m/m
1	3	4,69±0,41	0,39	1,97±0,08	0,17	0,96±0,02	0,08
2	3	2,80±0,14	0,24	0,38±0,02	0,03	<LQ	-
3	3	4,78±0,04	0,38	1,95±0,14	0,16	1,06±0,08	0,08
4	3	3,94±0,28	0,33	1,97±0,24	0,16	0,96±0,11	0,08
5	2	-	-	2,26±0,01	0,17	-	-
6	2	4,42±0,99	0,37	2,05±0,26	0,17	1,03±0,12	0,09
7	2	-	-	1,19±0,02	0,09	-	-
8	2	5,39±0,60	0,40	0,82±0,03	0,06	0,13±0,01	0,009
9	2	-	-	1,45±0,01	0,11	0,53±0,07	0,04

FONTE: O AUTOR (2018).

Em todos os casos, os valores de concentração encontrados estão abaixo dos limites máximos estabelecidos pela ANVISA. Para o FE, o maior valor encontrado foi de 0,40 %, sendo que o limite máximo permitido é de 1,0 %. Para os parabens, os valores observados também estão abaixo dos limites máximos permitidos, principalmente para o PP, que nenhum valor obtido foi maior que 0,09 %, sendo que o limite individual é de 0,4 %. Mesmo quando consideramos a mistura dos parabens (limite de 0,8 % para a mistura de parabens), todos os cosméticos mostraram valores abaixo desse limite estabelecido, sendo que o maior valor obtido foi igual a 0,25 %, apresentado pelo cosmético 6.

FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS EM 270 NM OBTIDOS POR QUECHERS-HPLC-DAD PARA 9 COSMÉTICOS (CM) COMERCIAIS.



FONTE: O AUTOR (2018).

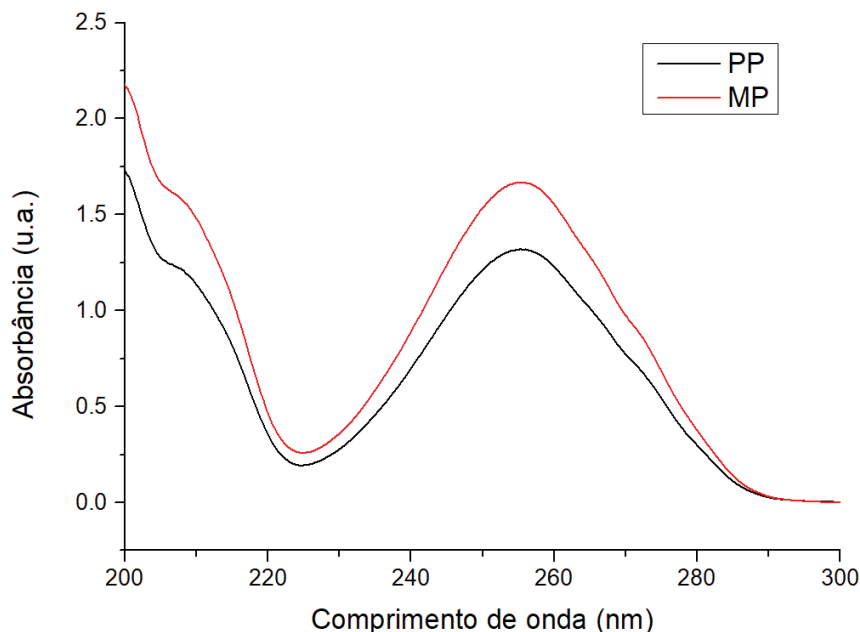
Os produtos cosméticos não trazem em sua embalagem os valores exatos de concentração de cada composto de sua formulação, entretanto, os ingredientes são dispostos em ordem decrescente de concentração, comparando os valores obtidos pelo método desenvolvido com o rótulo desses produtos, em todos os casos, a ordem de concentração obtida estava de acordo com o descrito no rótulo do produto comercial.

5.3 ANÁLISE MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP

5.3.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS PRELIMINARES NA REGIÃO DO UV

Para atender um dos objetivos do trabalho, que visa à determinação de conservantes através de espectrofotometria na região do UV, estudos preliminares foram realizados. A FIGURA 13 mostra o comportamento espectral dos parabenos obtidos pela diluição da solução estoque em água destilada.

FIGURA 13 - COMPORTAMENTO ESPECTRAL NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO DOS PADRÕES DE METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP) EM CONCENTRAÇÃO DE 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EM ÁGUA.



FONTE: O AUTOR (2018).

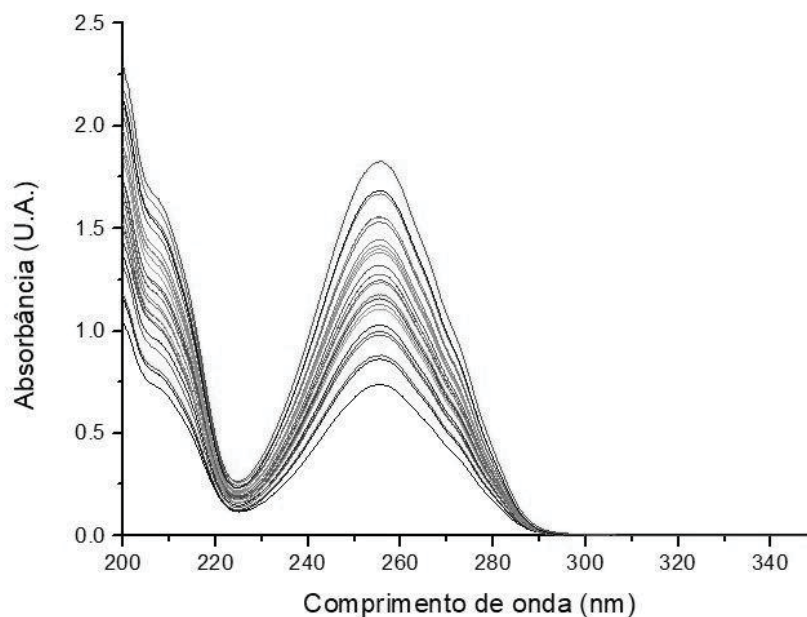
Tanto MP quanto PP apresentam banda com máximo de absorção em aproximadamente 254 nm, sendo que a diferença entre os espectros é evidenciada pelos valores de absorvância para cada composto, ou seja, os valores de absorvância molar para as espécies MP e PP é a principal diferença entre seus espectros, não sendo observados deslocamentos significativos de banda de uma espécie para outra, resultando assim em uma grande semelhança espectral entre as duas espécies.

5.3.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO

Os espectros na região do UV do conjunto de calibração, composto por 25 misturas sintéticas (TABELA 5) preparadas pela diluição em água destilada da solução estoque dos padrões dos analitos, dentro da faixa de concentração de 4,0 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e PP, foram adquiridos (FIGURA 14) e processados através da metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) no modo PLS-2 e utilizando procedimento de validação cruzada. Aqui, além da utilização dos dados originais, foram testados diversos tipos de tratamento de dados (primeira e segunda derivada, alisamento, entre outros) juntamente com procedimento de pré-processamento (dados centrados na média), sempre observando a capacidade de previsão dos modelos através

da validação cruzada e validação externa (conjunto de misturas sintéticas não usadas na etapa de calibração).

FIGURA 14 – COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 25 MISTURAS (TABELA 5) SINTÉTICAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA UV, PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.

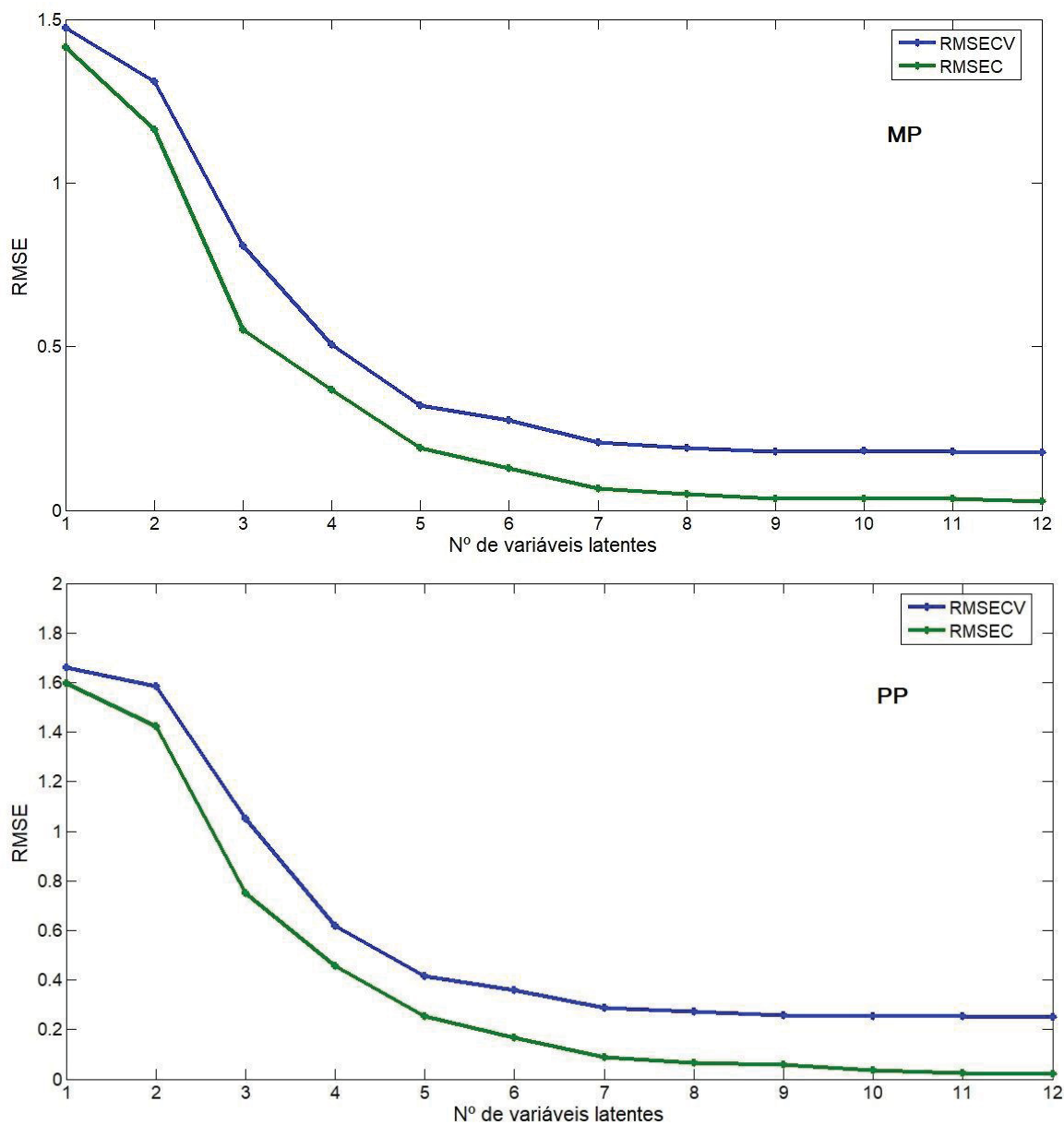


FONTE: O AUTOR (2018).

O modelo construído para determinação de MP e PP com a melhor capacidade de previsão apresentou as seguintes características: intervalo espectral de 200 a 300 nm, dados tratados com a primeira derivada e alisados (Savitsky-Golay) com janela de 15 pontos (polinômio de primeiro grau).

Para a avaliação do número mais adequado de variáveis latentes (VLs) para a construção do modelo multivariado, foi utilizado o método de validação cruzada *leave one out*. Neste processo, o espectro de uma amostra é retirado do conjunto de calibração, e usado como elemento de previsão. Esta operação é repetida quantas vezes forem necessárias para garantir que todas as amostras do conjunto participem como amostra de previsão. A partir desta previsão, os erros que são gerados são apresentados como a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (RMSECV) em função do número de VL. Na Figura 15 foi possível observar esses dados, que foram complementados com a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (RMSEC)..

FIGURA 15 – VALORES DE RMSECV E RMSEC EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.



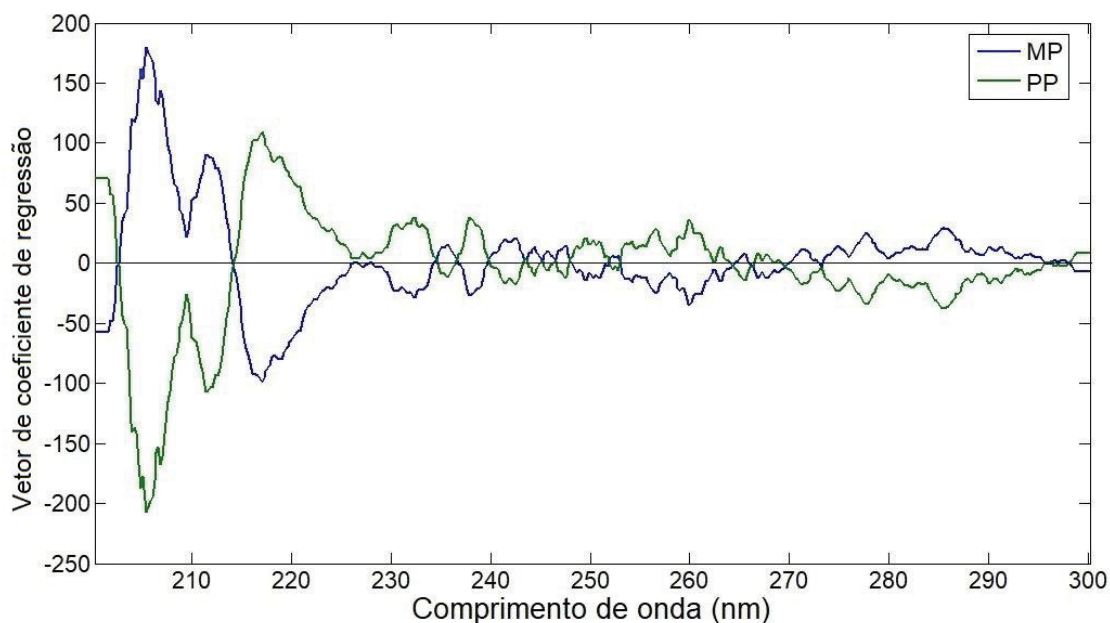
FONTE: O AUTOR (2018).

Pelos valores de RMSECV se observa uma minimização dos erros da validação cruzada entre a quinta e sétima VL, entretanto, para evitar o super-ajuste (*overfitting*) do modelo, também foi utilizado como parâmetro de avaliação os erros obtidos pela validação externa. Apesar da minimização se dar com 7 VLs, não houve significativa redução dos erros de previsão que justificassem a inclusão de tantas VLs no modelo. Assim, optou-se pela utilização de 4 VLs, gerando os valores de RMSECV de $0,506 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o MP (RMSEC igual a $0,367 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $0,616 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o PP (RMSEC igual a $0,455 \mu\text{g mL}^{-1}$). Embora fosse esperado que o sistema a ser calibrado apresentasse apenas 2 VLs, sendo uma para cada espécie estudada, a inclusão de mais

VLs pode ser importante para que se possa diferenciar a grande semelhança espectral entre os dois parabenos avaliados.

Na FIGURA 16 é apresentado o vetor de regressão obtido para o modelo construído utilizando a primeira derivada com alisamento em 15 pontos e 4 VLs.

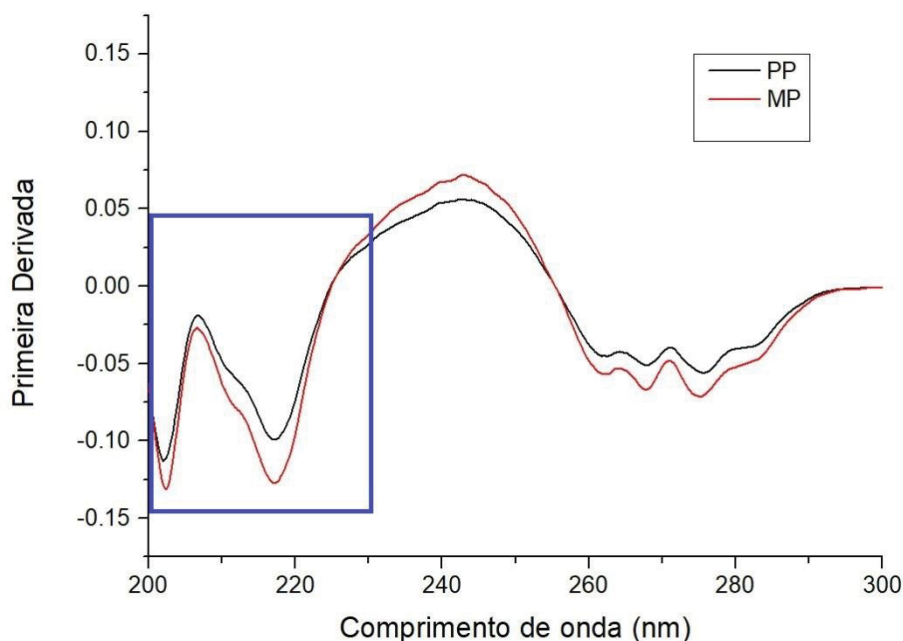
FIGURA 16 - GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA MP E PP DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO.



FONTE: O AUTOR (2018).

A análise do gráfico do vetor dos coeficientes de regressão é importante para se verificar quais regiões dos espectros estão influenciando na construção do modelo, nesse caso, pode-se observar que a região da banda de maior absorção dos parabenos (máximo em cerca de 254 nm) está contribuindo pouco para a construção do modelo (coeficientes de regressão com valores mais próximos de zero), enquanto os menores comprimentos de onda (abaixo de 230 nm) apresentam as informações mais relevantes para o modelo. Além disso, os vetores de regressão do MP e PP apresentam um comportamento inverso em toda a extensão do espectro, ou seja, são praticamente o inverso um do outro em relação ao eixo das abcissas, isso possivelmente se deve ao fato da grande semelhança espectral entre os analitos, assim as mesmas regiões espectrais serão relevantes para a previsão das duas espécies. Pode-se comparar o vetor de regressão obtido para MP e PP, com os respectivos espectros derivados de soluções padrões desses analitos (FIGURA 17).

FIGURA 17 - PRIMEIRA DERIVADA DOS DADOS ESPECTRAIS DE MP E PP NA CONCENTRAÇÃO DE $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ EM ÁGUA.

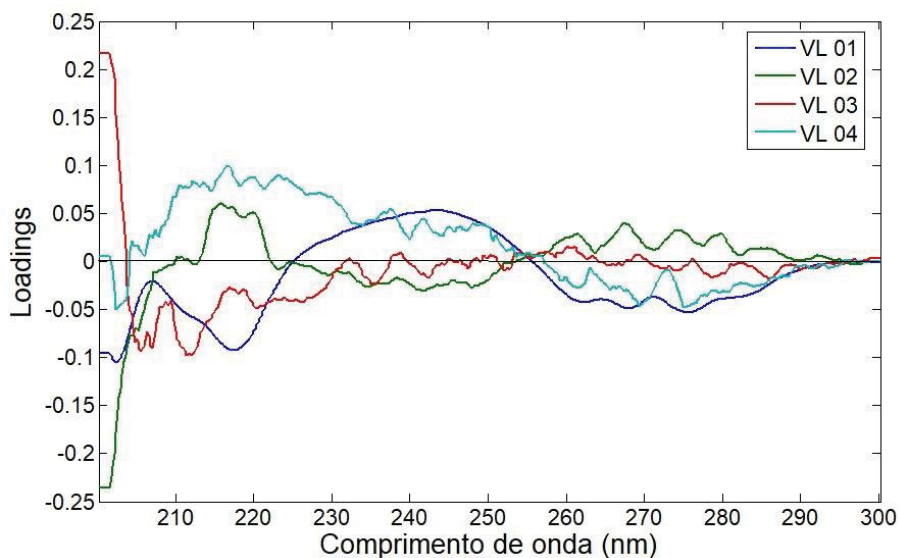


FONTE: O AUTOR (2018).

Podemos observar que na região abaixo do ponto de inflexão próximo de 230 nm (região destacada na FIGURA 17) há uma maior diferenciação entre os analitos, onde a inclinação de uma curva não segue exatamente o mesmo comportamento da outra. Isso explica a grande importância atribuída a essa região ao se observar os vetores de regressão do modelo construído, sendo que o restante do espectro é bastante semelhante para as duas espécies.

No gráfico de *loadings* (Figura 18) podemos avaliar a contribuição de cada variável original para a construção das 04 primeiras VLs, sendo que há pouca inserção de ruído no modelo. Além disso, pode-se observar que o comportamento dos *loadings* para a primeira VL assemelha-se ao comportamento espectral da solução padrão dos analitos. Já para a segunda VL, o comportamento dos *loadings* é similar ao espectro invertido dos padrões dos analitos, ou seja, possivelmente a diferença de absorvidade molar dos compostos está sendo uma informação relevante para a construção do modelo. Para a terceira e quarta VL, o comportamento dos *loadings* está relacionado com informações espectrais dos comprimentos de onda menores que 230 nm, corroborando o que foi observado nos espectros derivados dos padrões dos analitos, que essa região contém grande informação.

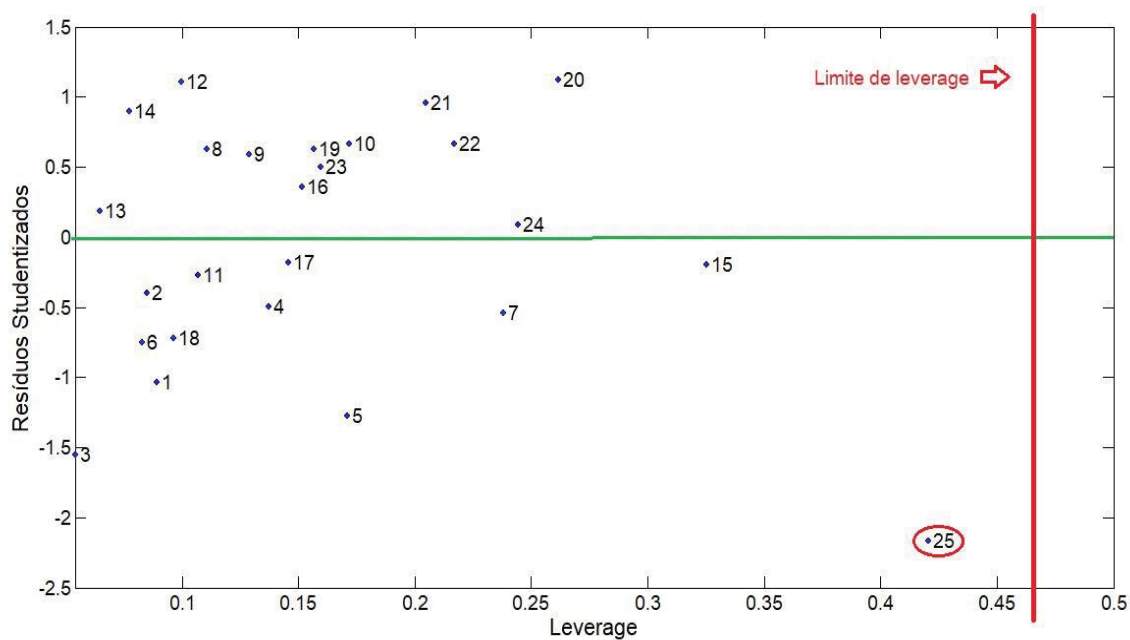
FIGURA 18 – LOADINGS DAS 04 PRIMEIRAS VARIÁVEIS LATENTES DO MODELO CONSTRUÍDO.



FONTE: O AUTOR (2018).

Para a detecção de amostras anômalas, foi avaliado o gráfico de resíduos studentizados vs *leverage*, conforme FIGURA 19.

FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.



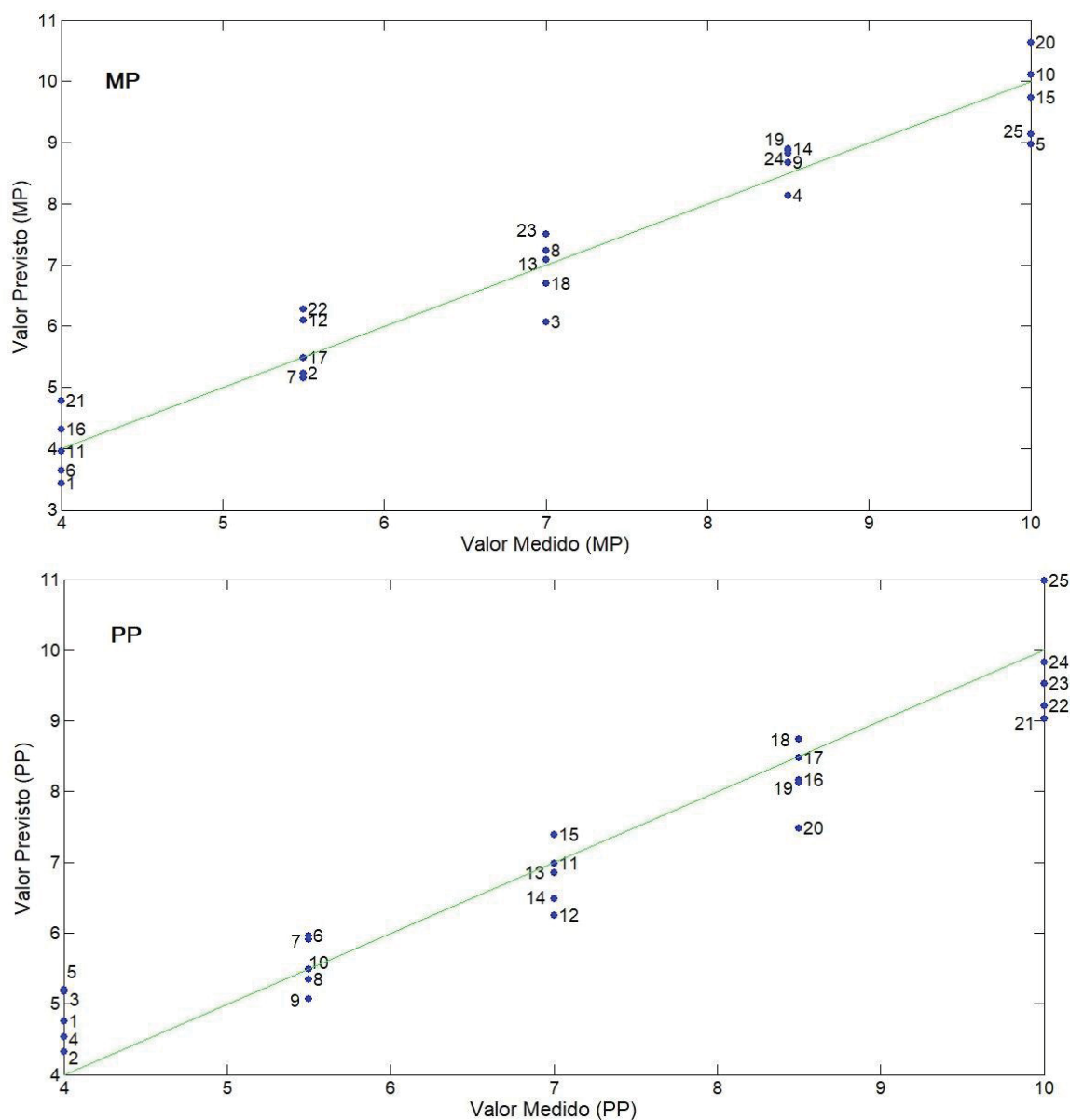
FONTE: O AUTOR (2018).

Os resíduos studentizados indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando um nível de confiança de 95 %, o valor máximo de resíduo permitido é igual a $\pm 2,5$. O *leverage* representa a distância de cada amostra e o centroide do conjunto de dados, assim, amostras com maior ou menor concentração apresentam a tendência de ter um valor de *leverage* mais elevado, pois representam os extremos do centroide. De maneira prática, o limite de *leverage* pode ser calculado como $3*VL/N$, onde VL representa o número de variáveis latentes utilizadas na construção do modelo e N representa o número de amostras do conjunto de calibração. Dessa forma, o limite de *leverage* é igual a 0,48 para o modelo construído. Assim, como observado, nenhuma amostra do conjunto de calibração se mostrou anômala em termos de resíduos e leverage, portanto, nenhuma amostra foi retirada do conjunto de calibração. Entretanto, observa-se que a amostra 25 (destacada na FIGURA 19) mostrou maior valor de leverage e maior valor de resíduo que as outras amostras do grupo, isso se deve ao fato de que essa amostra apresenta as maiores concentrações para ambos os analitos, assim, é esperado que essa amostra apresente maior influência no modelo construído.

A FIGURA 20 mostra os valores reais em função dos valores previstos pelo modelo de regressão, ou seja, a correlação entre os valores durante a validação cruzada para ambos os analitos. Os parâmetros obtidos pela previsão da validação cruzada em função dos valores reais são mostrados na TABELA 14.

Nos valores para PP, pode-se observar a influência das amostras com as menores e maiores concentrações, possivelmente estando isso relacionado com a variação da concentração da outra componente, visto que para as maiores concentrações a influência é maior.

FIGURA 20 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS DE MP E PP.



FONTE: O AUTOR (2018).

TABELA 14 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS DO MODELO CONSTRUÍDO COM 4 VL.

	MP	PP
r	0,971	0,962
RMSEC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,367	0,455
RMSECV ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,506	0,616

FONTE: O AUTOR (2018).

Como se pode observar, o modelo apresentou boa capacidade preditiva para a validação cruzada, devido aos altos valores de coeficientes de correlação obtidos. Indicando assim que os valores previstos são muito próximos aos valores reais das misturas sintéticas.

Assim, o modelo construído foi testado em um conjunto de validação externa, composto por 5 misturas sintéticas (diferentes das misturas do conjunto de calibração), sendo 3 delas em duplicata, os resultados são mostrados na TABELA 15.

TABELA 15 – RESPOSTA PREVISTA E ERROS OBTIDOS PELO MODELO PLSR NA REGIÃO DO UV PARA A PREVISÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.

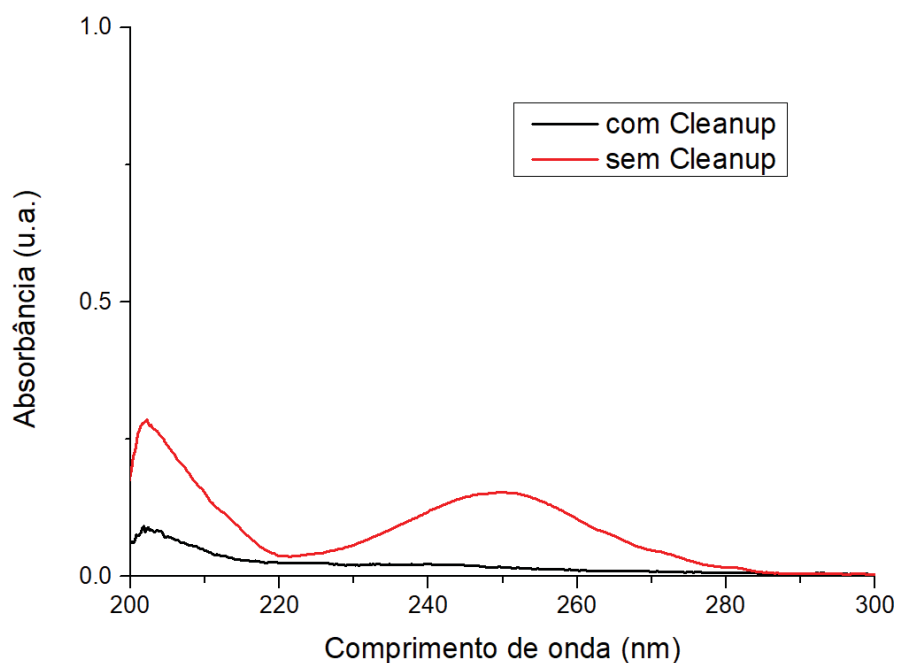
Mistura	Concentração Real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Concentração Prevista ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Erro Relativo (%)	
	MP	PP	MP	PP	MP	PP
1	4,30	4,30	4,14 \pm 0,03	4,62 \pm 0,08	-3,74	7,47
2	9,00	5,00	9,19 \pm 0,11	4,98 \pm 0,03	2,06	-0,33
3	5,00	9,00	5,39 \pm 0,63	8,86 \pm 0,69	7,76	-1,55
4	7,50	8,00	7,48	8,06	-0,33	0,69
5	8,00	8,00	8,07	8,17	0,82	2,07
Erro relativo médio (%)					2,94	2,42

FONTE: O AUTOR (2018).

Pela validação externa, os erros relativos médios foram baixos, sendo 2,94 % para MP e 2,42 % para PP, ainda, foi obtida boa repetibilidade, demonstrada pelos baixos valores de estimativa de desvio padrão para as replicatas realizadas. Desse modo, mesmo com a grande sobreposição das bandas de absorção dos analitos, foi possível a construção de um modelo com boa capacidade de previsão.

Visando a aplicação do modelo multivariado construído em amostras reais, foi verificada a possibilidade da associação do modelo construído com o método QuEChERS desenvolvido. Assim, a FIGURA 21, mostra os espectros da matriz cosmética (creme hidratante) isenta dos analitos de interesse depois de tratada pelo método QuEChERS.

FIGURA 21 - ESPECTRO DO CREME HIDRATANTE ISENTO DOS ANALITOS DE INTERESSE ANTES E DEPOIS DA ETAPA DE CLEAN UP DO QuEChERS.



FONTE: O AUTOR (2018).

Assim, verifica-se a boa eficiência do método QuEChERS na remoção de substâncias interferentes da matriz utilizada, entretanto, é possível observar uma baixa absorção da matriz nos menores comprimentos de onda. Como essa região é pouco seletiva e grande parte dos compostos orgânicos absorvem nela, isso explica a dificuldade da remoção total de substâncias interferentes quando se utiliza a região do UV. Para avaliar a capacidade do método desenvolvido na previsão de amostras reais, foi utilizada a matriz de creme hidratante fortificada com os compostos de interesse e posteriormente tratada pelo método QuEChERS. Foram analisadas 3 misturas (2 em duplicatas) com concentrações variadas de MP e PP, tentando simular o que é encontrado em amostras reais (MP em maior concentração que PP, como verificado por HPLC-DAD). As medidas espectrofotométricas foram feitas contra o extrato da matriz branco em água (*background*). Os resultados obtidos são mostrados na TABELA 16.

TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MODELO CONSTRUÍDO UTILIZANDO MATRIZ BRANCO FORTIFICADA ASSOCIADA AO MÉTODO QuEChERS, PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MP E PP.

Amostra	Concentração Real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Concentração Prevista ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Erro Relativo (%)	
	MP	PP	MP	PP	MP	PP
1	4,50	4,50	2,18 \pm 0,32	5,03 \pm 0,47	-51,58	11,71
2	9,00	5,00	5,85 \pm 0,32	5,51 \pm 0,11	-34,97	10,11
3	9,50	4,30	6,68	4,21	-29,65	-2,07
Erro relativo médio (%)					38,73	7,97

FONTE: O AUTOR (2018).

Pelos valores de erros obtidos, pode-se observar que para a previsão de PP o modelo se mostrou satisfatório, entretanto, para a previsão de MP os erros obtidos foram muito elevados. Possivelmente isso se deve ao efeito de matriz, que resulta na mudança do perfil espectral quando comparado às misturas sintéticas. Adiciona-se a este fato, a grande semelhança entre os vetores de regressão para os dois compostos.

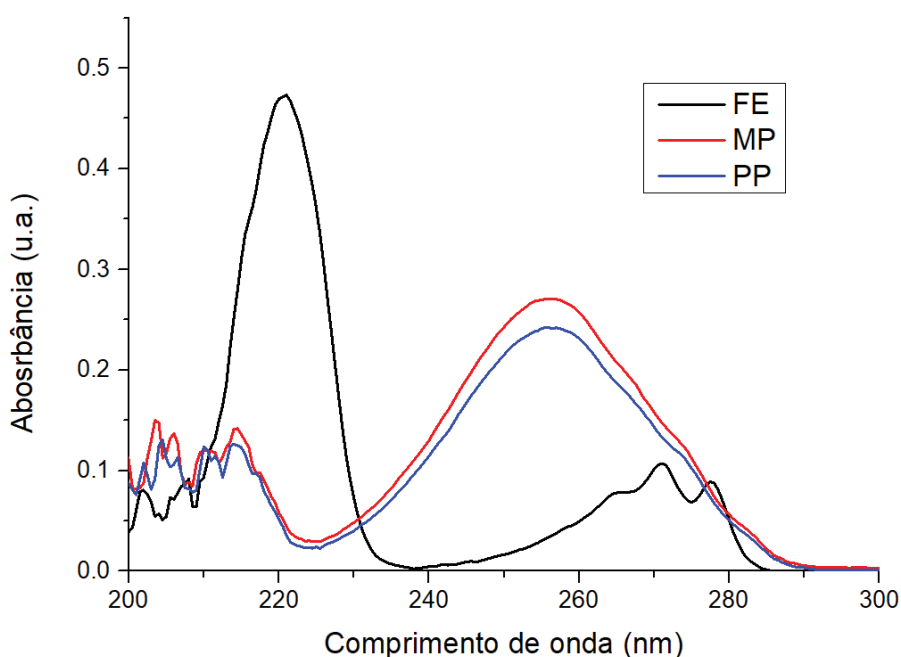
Assim, não foi possível obter um modelo para determinação simultânea de MP e PP com baixos valores de erros de previsão. Apesar disso, é observado que em termos de produtos comerciais, os parabenos na maioria das vezes estão presentes em suas misturas, além disso, a própria ANVISA estabelece o limite máximo de concentração para quando se utiliza a mistura de parabenos. Diante desse fato, optou-se por avaliar também a aplicação de um modelo multivariado para a determinação de parabenos totais em matrizes cosméticas, sendo os parabenos totais nesse caso, a soma das concentrações de MP e PP, na presença de FE, visto que é comum a associação desses 3 conservantes. Como relatado anteriormente, o FE além de aumentar o poder conservante da mistura, também é utilizado como solvente para a dissolução de parabenos, facilitando a incorporação destes últimos em matrizes cosméticas.

5.4 ANÁLISE MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS NA PRESENÇA DE FENOXIETANOL

5.4.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS PRELIMINARES

Visando a determinação de parabenos (mistura de MP e PP) na presença de FE, inicialmente foram feitos estudos preliminares para observar o comportamento espectral desses compostos. A FIGURA 22 mostra o comportamento espectral dos analitos de interesse em metanol. Nesta etapa do trabalho, optou-se por utilizar metanol como solvente, pois foi verificado que na presença do mesmo, o sinal espectral dos analitos de interesse é atenuado na região de menor comprimento de onda (fato que pode ser observado comparando-se as FIGURAS 22 e 13), favorecendo assim as bandas de absorção em maiores comprimentos de onda, o que tende a favorecer a seletividade do método.

FIGURA 22 - COMPORTAMENTO ESPECTRAL NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO DOS PADRÕES EM METANOL DE METILPARABENO (MP) E PROPILPARABENO (PP) E FENOXIETANOL (FE) NAS CONCENTRAÇÕES DE 3,0, 3,0 E 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RESPECTIVAMENTE.



FONTE: O AUTOR (2018).

É possível observar que em metanol, a banda de absorção dos parabenos próximo de 254 nm é evidenciada. Para o FE, vemos uma banda de absorção proeminente em cerca de 220 nm, e uma banda de menor intensidade que começa em torno de 255 nm e termina próximo de 280 nm.

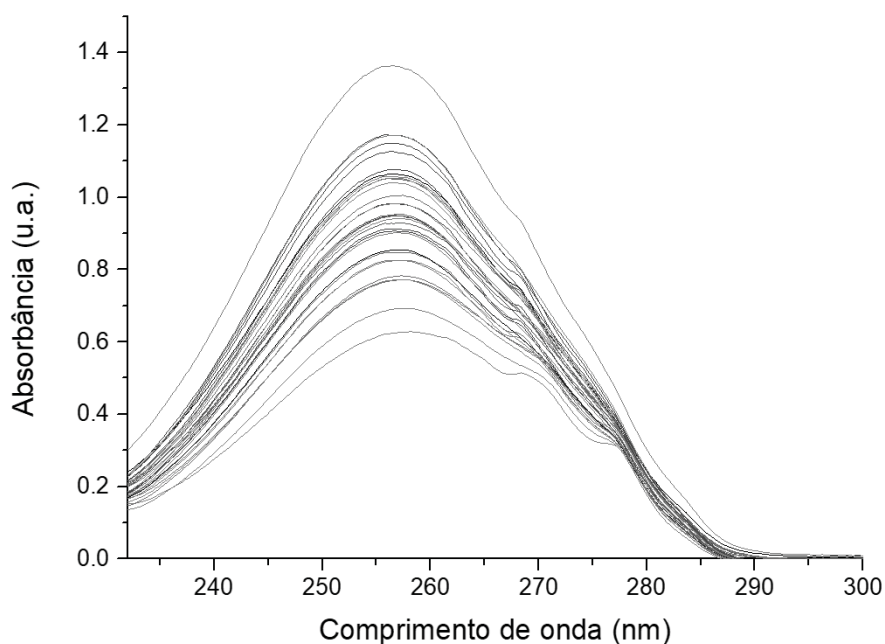
Para a construção do modelo multivariado, foi utilizada a região entre 233 e 300 nm, para se evidenciar a banda de maior absorção dos parabenos, na tentativa de

diminuir a possível influência de substâncias interferentes presentes nas matrizes cosméticas.

5.4.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO

Os espectros na região do UV do conjunto de calibração, composto por 31 misturas sintéticas (FIGURA 23) foram preparadas, conforme a TABELA 6, pela diluição em metanol da solução estoque dos padrões dos analitos, dentro da faixa de concentração de 6,0 a 13,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ considerando o total de parabenos (PB). Em cada mistura sintética foi adicionada uma quantidade de FE que variou de 5,0 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, simulando assim uma condição real para a quantificação dos parabenos na presença de FE. Os espectros das misturas foram adquiridos e processados através da metodologia PLSR no modo PLS-1 com procedimento de validação cruzada. Além da utilização dos dados originais, foram testados diversos tipos de tratamento de dados juntamente com procedimentos de pré-processamento, sempre observando a capacidade de previsão dos modelos através da validação cruzada e validação externa.

FIGURA 23 - COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 31 MISTURAS SINTÉTICAS (TABELA 6) DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA UV, PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS (PB).

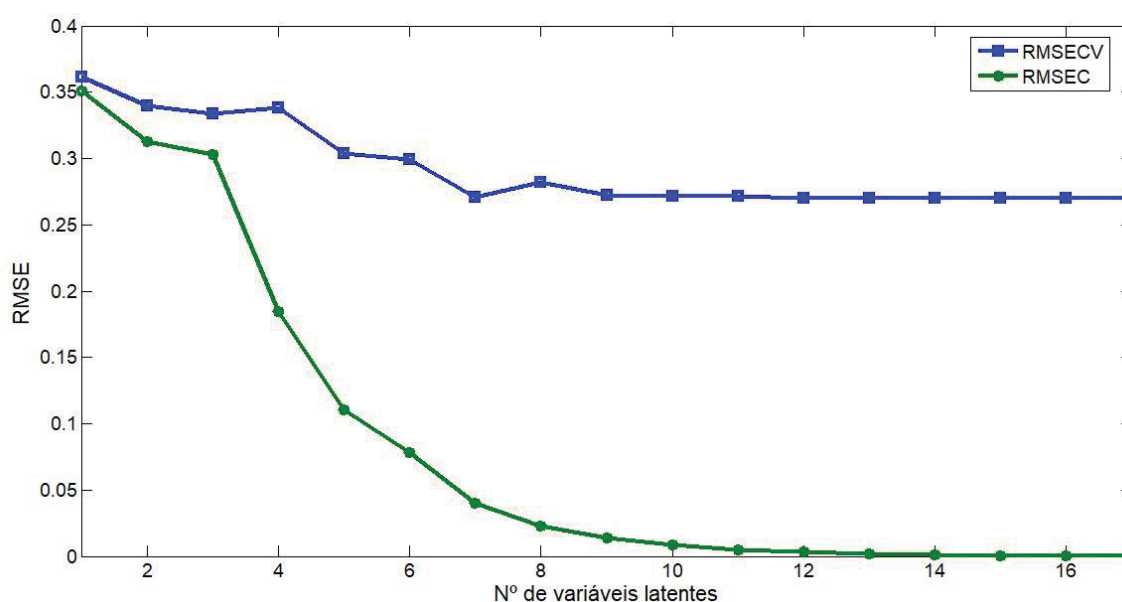


FONTE: O autor (2018).

A melhor capacidade de previsão foi obtida com o modelo construído utilizando primeira derivada e alisamento (Savitsky-Golay) em janela de 9 pontos (polinômio de primeiro grau) como tratamento dos dados, havendo uma minimização dos ruídos espectrais.

Para a avaliação do número mais adequado de variáveis latentes (VL) para a construção do modelo multivariado, foi utilizado o método de validação cruzada *leave one out*. A partir desta previsão, os erros que foram gerados são apresentados como a RMSECV em função do número de VL (FIGURA 24).

FIGURA 24 – VALORES DE RMSECV E RMSEC EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRUÍDO.

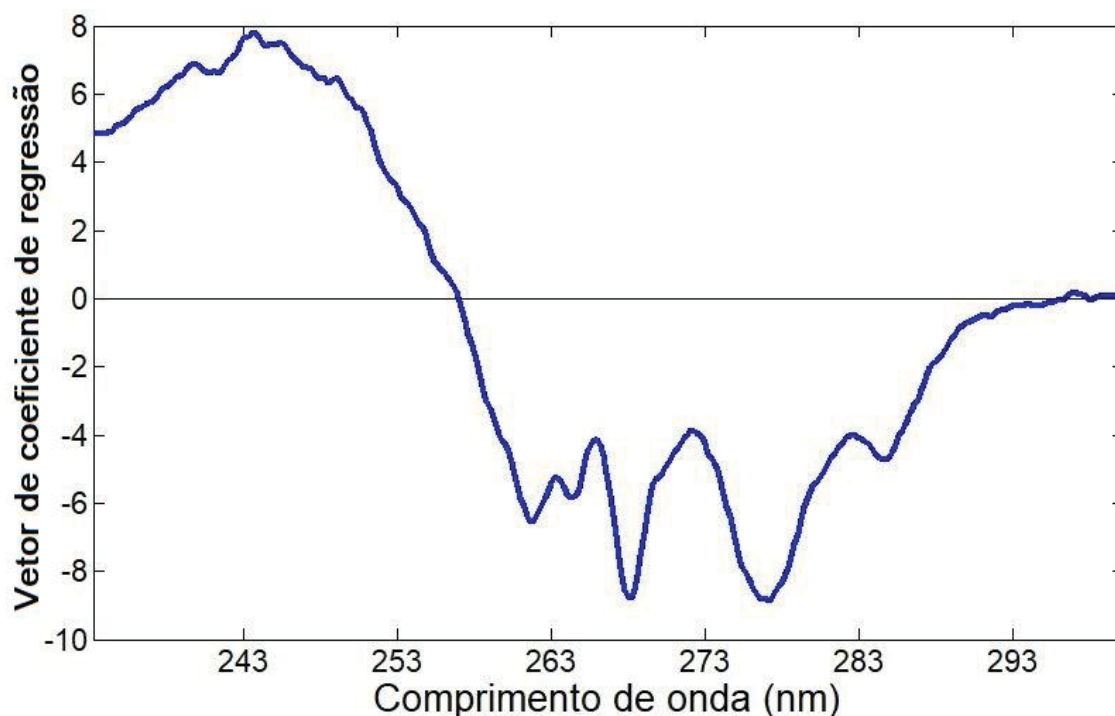


FONTE: O AUTOR (2018).

Observando os valores de RMSECV, temos a minimização dos erros com a sétima VL, o que também é observado nos valores de RMSEC, entretanto, os valores de erro de previsão externa obtidos com 7 VLs não justificam a inclusão de mais VLs, visto que é próximo do valor obtido com apenas 2 VLs. A construção do modelo com 3 VLs também não mostrou redução significativa dos erros de previsão (conjunto de validação externa) que justificassem a utilização de mais uma VLs. Os valores de *loadings* também mostram que a partir da terceira VL não há a inclusão de informação relevante para o modelo, indicando que a utilização de mais VLs acarretaria em um super ajuste do modelo. Para um método espectrofotométrico em que se tem a variação de 3 espécies químicas, o uso de 7 VLs é muito elevado. Assim, era esperado uma minimização dos

erros com um número menor de VLs, e através dos valores obtidos na validação externa, a minimização dos erros ocorreu com o uso de 2 VLs. Por todos estes motivos, optou-se por construir o modelo utilizando 2 VLs. Na FIGURA 25 é apresentado o vetor de regressão obtido para o modelo construído utilizando primeira derivada e alisamento em 9 pontos e 2 VLs.

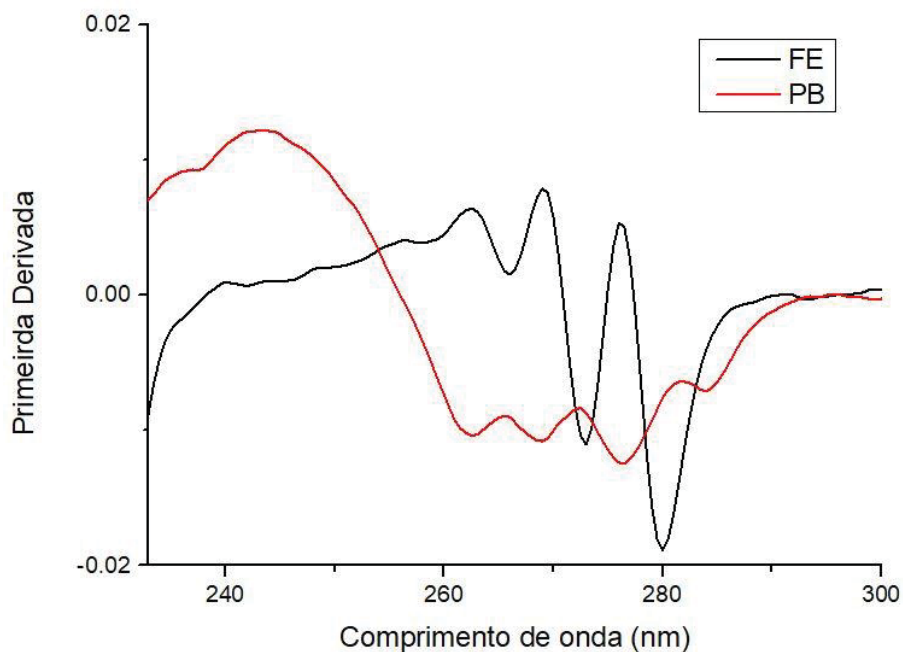
FIGURA 25 - GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO.



FONTE: O AUTOR (2018).

Pela análise do vetor de regressão, é possível observar que a região de maior absorção dos parabenos, próximo de 254 nm, está influenciando positivamente o modelo construído, enquanto a região entre 260 e 280 nm, que corresponde à banda de absorção de FE está influenciando negativamente o modelo construído. Para uma melhor avaliação, a FIGURA 26, apresenta os espectros derivados dos parabenos e do FE.

FIGURA 26 - ESPECTROS DERIVADOS DOS PARABENOS TOTAIS (PB) OBTIDO PELA MISTURA DE UMA SOLUÇÃO PADRÃO NA CONCENTRAÇÃO $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ DE MP E $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ DE PP, E ESPECTRO DERIVADO DE FE NA CONCENTRAÇÃO DE $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

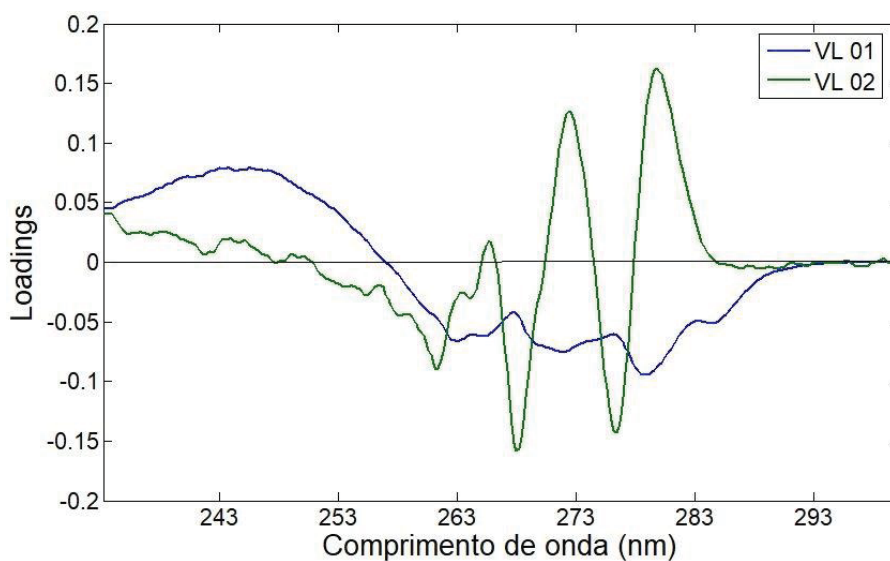


FONTE: O AUTOR (2018).

Assim podemos observar a similaridade entre o vetor de regressão obtido pelo modelo e o espectro derivado do padrão contendo a mistura dos parabenos.

A FIGURA 27 mostra o gráfico de *loadings* em função do comprimento de onda.

FIGURA 27 – LOADINGS DAS 02 PRIMEIRAS VARIÁVEIS LATENTES DO MODELO CONSTRUÍDO.

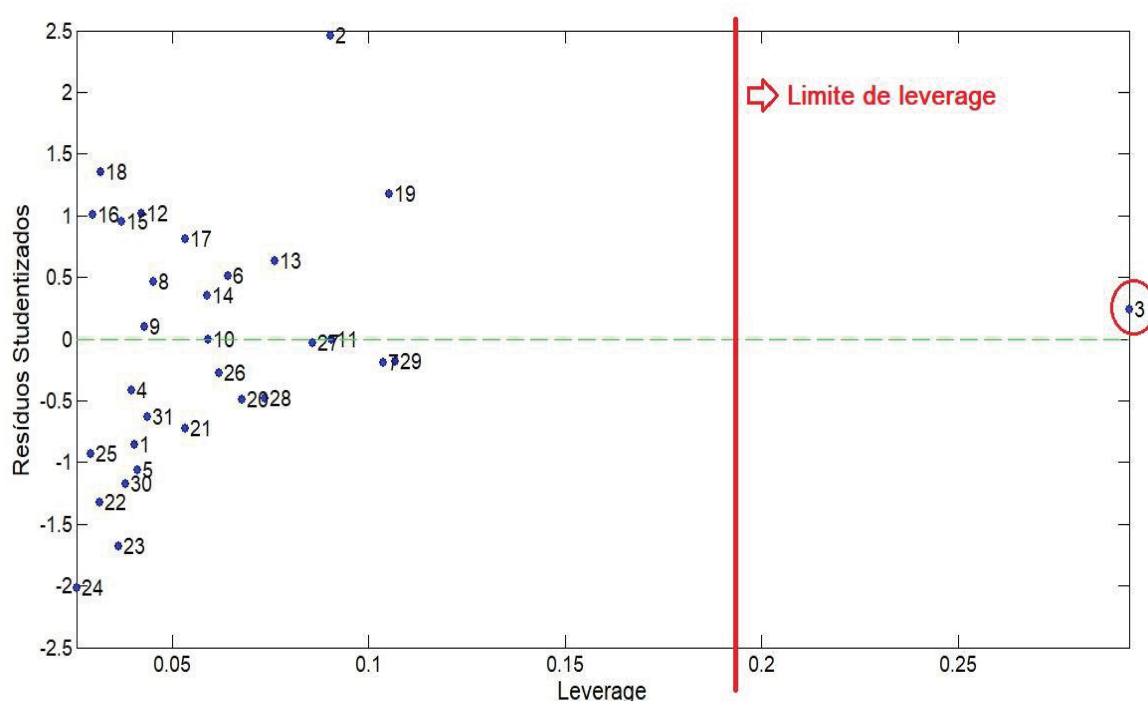


FONTE: O AUTOR (2018).

Pelo gráfico de *loadings* é possível avaliar a contribuição de cada variável original para a construção das 02 primeiras VLs do modelo, sendo que há pouca inserção de ruído no modelo. Podemos observar que o comportamento dos *loadings* para a primeira VL assemelha-se ao comportamento espectral da solução padrão dos parabenos. Já a segunda VL assemelha-se ao comportamento espectral da solução padrão de FE. Sendo essas duas informações consideradas de maior relevância para a construção do modelo.

A presença de amostras anômalas foi avaliada pelo gráfico de resíduos studentizados vs *leverage*, conforme FIGURA 28.

FIGURA 28 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO.

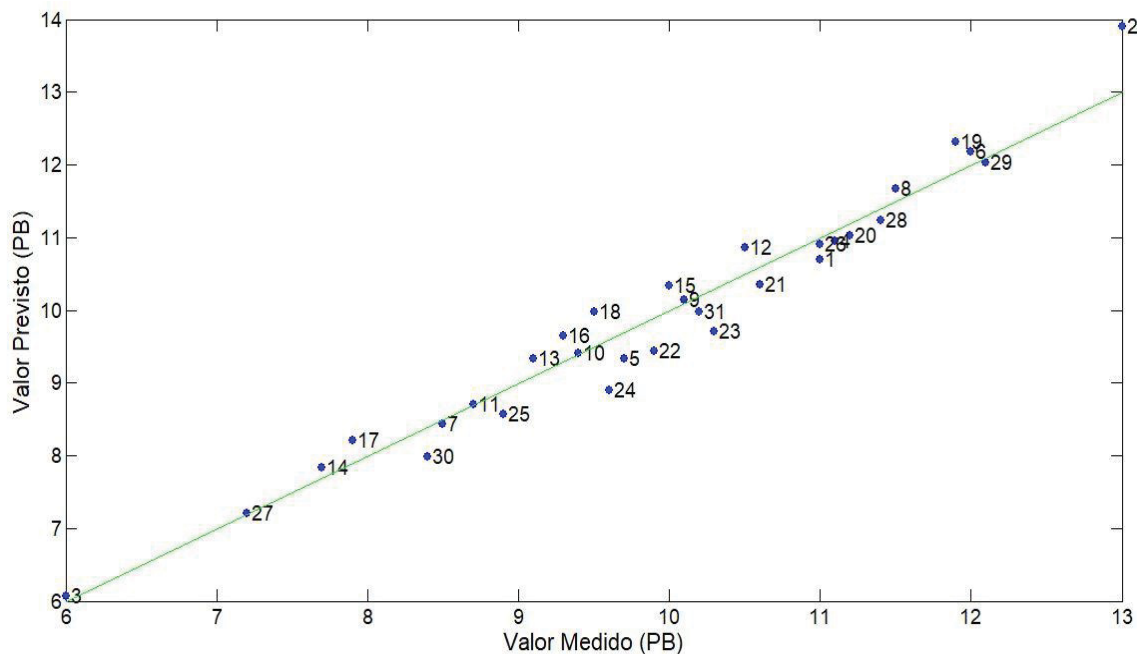


FONTE: O AUTOR (2018).

Em relação aos valores dos resíduos studentizados, todas as amostras estão dentro dos limites máximos permitidos para um nível de confiança de 95 % (limite de $\pm 2,5$). Para a *leverage*, o limite calculado é de 0,19 para o modelo (cálculo descrito anteriormente), sendo que a amostra 3 encontra-se fora do limite de leverage, mas com um valor de resíduo bem próximo de zero. Adicionalmente a amostra 3 apresenta a menor concentração de parabenos totais, e portanto, optou-se por não retirar a amostra do conjunto de calibração para a construção do modelo. Um modelo foi construído com a retirada da amostra 3, porém não houve melhora significativa na previsão com a retirada dessa amostra, optando-se assim pela manutenção da mesma na construção do modelo.

A FIGURA 29 mostra os valores reais em função dos valores previstos pelo modelo de regressão. Os parâmetros obtidos pela previsão da validação cruzada em função dos valores reais são mostrados na TABELA 17.

FIGURA 29 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS DOS PARABENOS TOTAIS (PB).



FONTE: O AUTOR (2018).

TABELA 17 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS.

	PB
r	0,978
RMSEC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,313
RMSECV ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,339

FONTE: O AUTOR (2018).

O modelo apresentou boa capacidade preditiva, dito pelo alto valor de coeficiente de correlação obtido. Indicando assim que os valores previstos são muito próximos aos valores reais das misturas sintéticas.

Assim, o modelo construído foi testado com um conjunto de validação externa, composto por 6 misturas sintéticas (diferentes das misturas do conjunto de calibração), sendo 3 delas em duplicata, os resultados são mostrados na TABELA 18.

TABELA 18 – RESPOSTA PREVISTA E ERROS OBTIDOS PELO MODELO PLSR NA REGIÃO DO UV PARA A PREVISÃO DE PARABENOS TOTAIS.

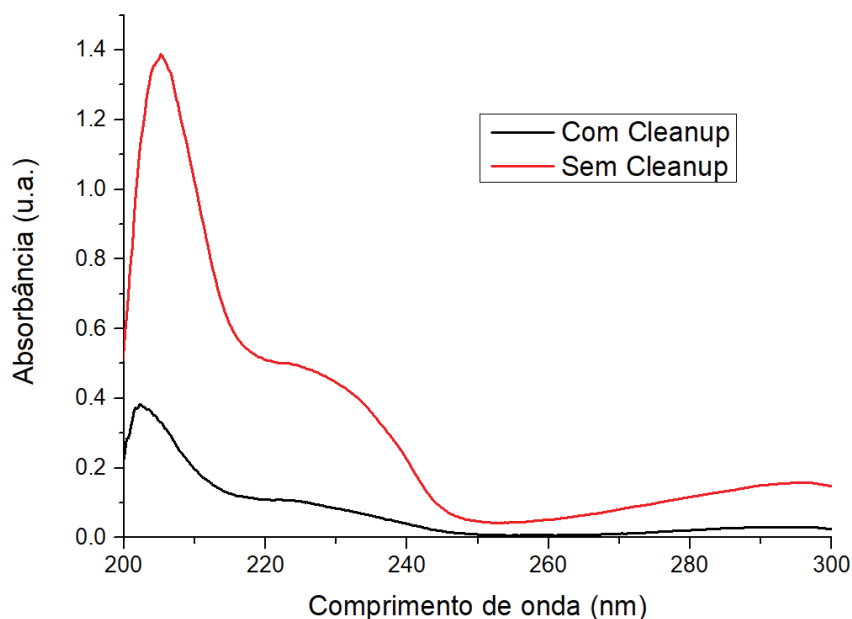
Mistura	Concentração Real ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Prevista ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Erro Relativo (%)
1	8,60	8,95	4,1
2	7,00	7,16 \pm 0,001	2,3
3	13,00	13,36 \pm 0,25	2,8
4	12,00	12,57	4,7
5	10,8	10,88 \pm 0,07	0,7
6	8,00	8,55	6,9
Erro relativo médio (%)			3,6

FONTE: O AUTOR (2018).

A capacidade de previsão do modelo foi confirmada pelo conjunto de validação externa. Observa-se que o erro relativo médio foi de 3,6 %. Entretanto é possível observar uma tendência nos valores de erro relativo, sendo eles sempre valores positivos, o que pode indicar a ocorrência de um erro sistemático no modelo construído.

Visando avaliar a aplicabilidade do modelo construído em amostras reais, foram analisadas 5 amostras (2 amostras em triplicata) fortificadas com MP e PP para a quantificação de parabenos totais (PB) e fortificadas com concentrações variadas de FE, simulando assim uma condição real. As amostras foram submetidas ao método QuEChERS e analisadas pelo modelo construído e por HPLC-DAD para fins comparativos. Nesta etapa, foi utilizada como matriz cosmética um gel limpador isento dos analitos de interesse. As medidas espectrofotométricas das amostras foram feitas usando o extrato da matriz branco em metanol como *background*. O comportamento espectral da matriz branco antes e depois da etapa de *clean up* do método QuEChERS são apresentados na FIGURA 30.

FIGURA 30 – COMPORTAMENTO ESPECTRAL DO GEL LIMPADOR ISENTO DOS ANALITOS DE INTERESSE SUBMETIDO AO QuEChERS.



FONTE: O AUTOR (2018).

Observa-se mais uma vez a eficiência do método QuEChERS na limpeza da amostra, onde após a etapa de *clean up* fica bastante diminuta a absorção da matriz, principalmente na região entre 233 e 300 nm, que foi utilizada na construção do modelo.

Os resultados obtidos pela aplicação do modelo em amostras branco fortificadas são mostrados na TABELA 19, a concentração apresentada pelo método HPLC-DAD foi considerada como concentração real para comparação com a previsão do modelo, visto que o método QuEChERS-HPLC-DAD desenvolvido apresentou exatidão muito próximo de 100 %.

TABELA 19 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MODELO CONSTRUÍDO UTILIZANDO MATRIZ BRANCO FORTIFICADA ASSOCIADA AO MÉTODO QuEChERS, PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS TOTAIS.

Mistura	Concentração HPLC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Prevista ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Erro Relativo (%)
1	6,58 \pm 0,153	6,95 \pm 0,257	5,51
2	9,54 \pm 0,124	10,51 \pm 0,525	10,22
3	7,22	7,83	8,33
4	11,85	12,67	6,93
Erro relativo médio (%)			7,75

FONTE: O AUTOR (2018).

Pelo erro relativo médio obtido (7,75 %), pode-se considerar satisfatório o desempenho do modelo construído, visto que o maior erro relativo obtido está em torno de 10 %. Os erros obtidos nas amostras reais foram maiores do que aqueles obtidos na validação externa, principalmente por causa da possível interferência da matriz. É possível notar que a tendência de sempre apresentar erros relativos positivos ocorreu também neste caso, reafirmando a possibilidade da presença de um erro sistemático no modelo. Possivelmente isso se deve a natureza do sistema utilizado, visto que se considera MP e PP, que possuem absorvidades molares diferentes, como uma espécie apenas (parabenos totais), além da presença do FE. Por fim, o sistema QuEChERS-UV-PLS desenvolvido se mostrou satisfatório para a quantificação de parabenos totais (MP e PP) na presença de FE.

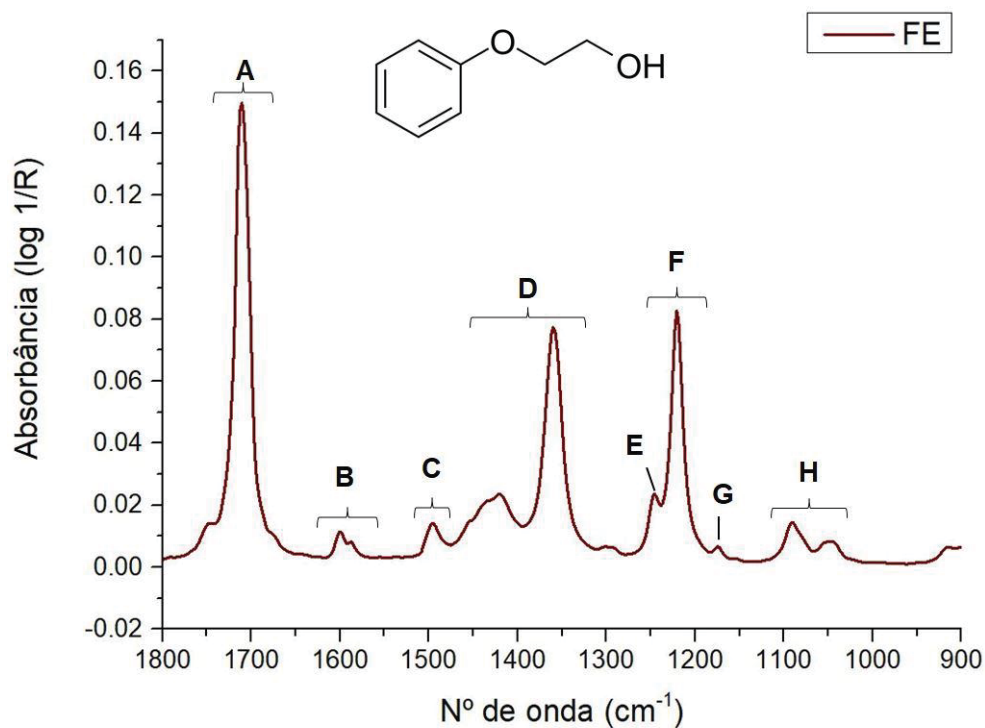
5.5 ANÁLISE MULTIVARIADA ASSOCIADA À ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA DETERMINAÇÃO DE FENOXIETANOL E PARABENOS TOTAIS (PB)

O grande diferencial da espectroscopia na região do infravermelho é que nessa técnica cada substância é capaz de gerar um padrão único de absorção, assim fornecendo maior informação sobre o sistema estudado. Nesse aspecto, foi avaliada a construção de modelos multivariados associados à espectroscopia no infravermelho.

5.5.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

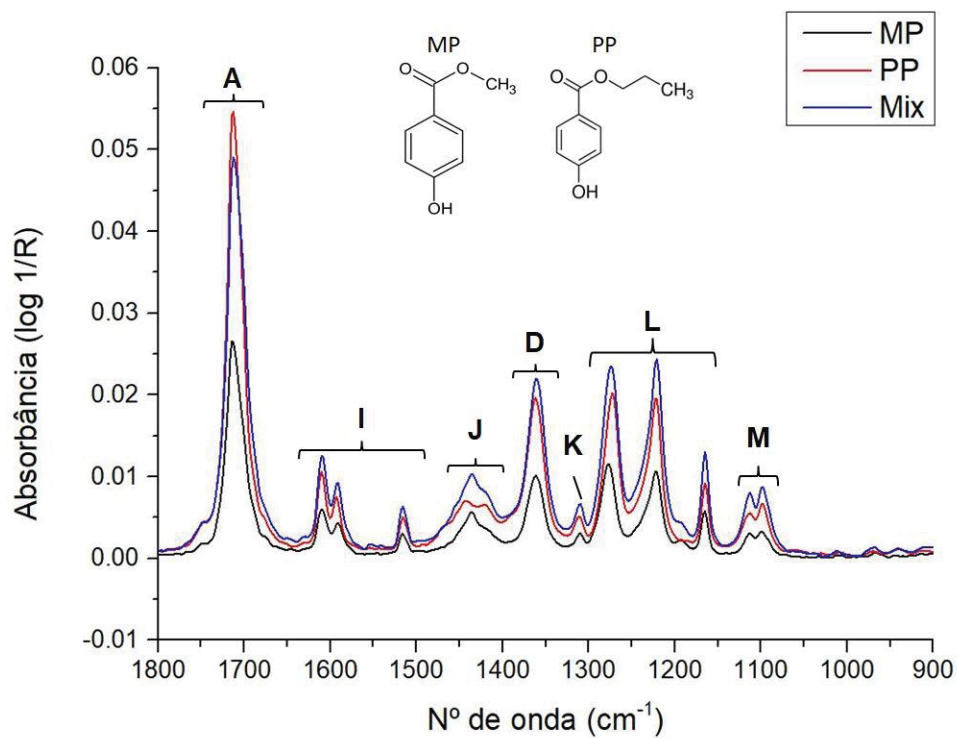
Inicialmente foram obtidos os espectros de solução dos padrões dos analitos. Esses padrões foram preparados em acetona, que será o solvente empregado em todo o procedimento envolvendo o uso de ATR-FTIR deste trabalho. A solução do padrão de cada analito foi preparada na concentração de 25,0 mg mL⁻¹ para FE e 10,0 mg mL⁻¹ para MP e PP, e também foi avaliada uma solução contendo uma mistura de MP e PP (solução Mix) contendo 10,0 mg mL⁻¹ de cada parabeño. Os espectros obtidos são mostrados na FIGURA 31 e na FIGURA 32, e também na TABELA 20 são relacionadas às bandas identificadas em cada espectro.

FIGURA 31 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO POR ATR-FTIR PARA A SOLUÇÃO PADRÃO DE FENOXIETANOL EM ACETONA.



FONTE: O AUTOR (2018).

FIGURA 32 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO OBTIDOS POR ATR-FTIR PARA AS SOLUÇÕES PADRÕES DE PARABENOS EM ACETONA.



FONTE: O AUTOR (2018).

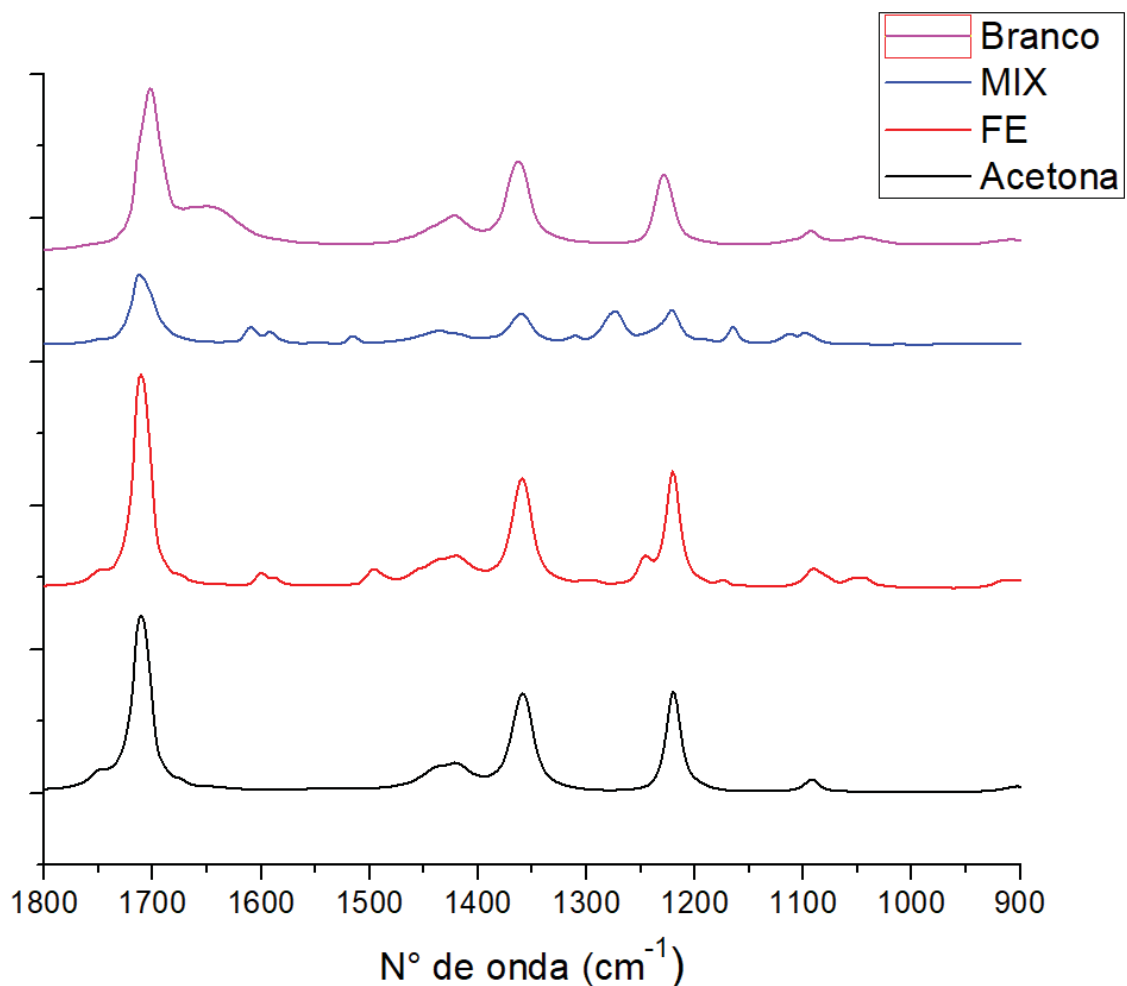
TABELA 20 - RELAÇÃO DAS BANDAS IDENTIFICADAS NOS ESPECTROS DE IV.

Região de absorção	Grupamento com modo de vibração associado
A	C=O
B	C=C / C-H aromático
C	CH ₂
D	O-H / CH ₂ -CH ₂
E	-O aromático / O-C / -OH
F	CH ₂ / O-H
G	C-H aromático
H	O-C / C-C / C-O / C-O-C
I	C=C aromático
J	C-O-H
K	C-O
L	C-O / C(=O)-O
M	O-C-C

FONTE: SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE (2007); BADAWI (2011); GELBRICH et al.,(2013).

É possível observar a presença de alguns grupos característicos nos espectros de infravermelho para cada um dos analitos. No caso do FE, não era esperada uma banda proveniente de modos de vibração do grupo carbonila (C=O), visto que não há esse grupo presente na estrutura do composto, entretanto, essa banda está relacionada com o solvente usado (acetona), que por possuir um grupo carbonila, apresenta sinal no espectro de IV. O fato dos solventes também produzirem sinal no IV, é uma das principais desvantagens de se utilizar essa técnica. A FIGURA 33 compara o espectro no IV das soluções padrões dos analitos de interesse com o espectro obtido nas mesmas condições de análise para a acetona.

FIGURA 33 – ESPECTROS NO IV OBTIDOS DAS SOLUÇÕES PADRÃO DA MISTURA DE MP E PP (MIX), FE, DA AMOSTRA BRANCO E DA ACETONA.



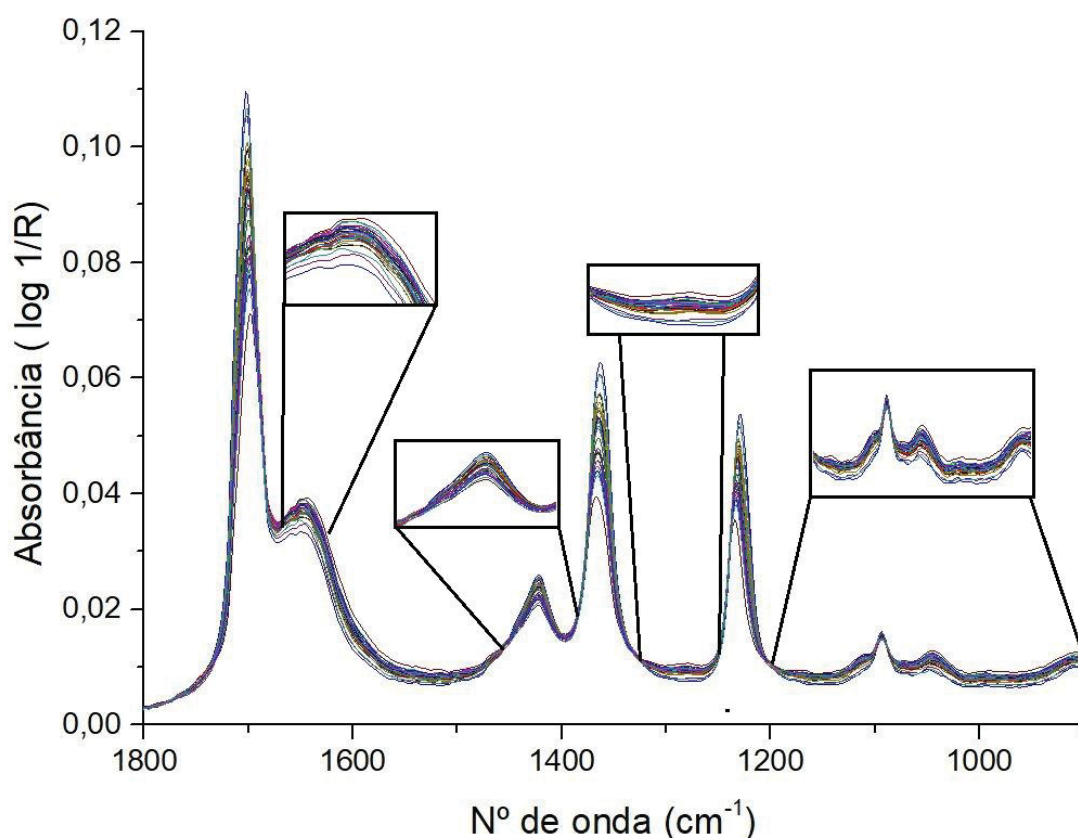
FONTE: O AUTOR (2018).

Apesar da presença das bandas provenientes do solvente acetona, observa-se que não há sobreposição total das bandas dos analitos de interesse, além disso, o sinal proveniente do solvente tende a se manter constante de uma análise para outra, de forma reprodutível, fato pelo qual se adotou um número pequeno de varreduras (4 varreduras) para evitar a volatilização do solvente durante a obtenção dos espectros. O espectro da amostra branco se refere a amostra de creme hidratante utilizado como matriz cosmética isenta dos analitos e submetida ao procedimento de preparo de amostra, é possível observar um espectro semelhante a acetona, e algumas regiões de diferenciação da matriz e dos padrões dos analitos, o sinal proveniente da matriz tende a ser constante em toda análise devido ao procedimento adotado. Assim, acredita-se que seja minimizada a variação causada pela presença de solvente no desenvolvimento do método multivariado.

5.5.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO

Para a construção dos modelos, foi utilizada a região de 1800 cm^{-1} a 900 cm^{-1} , que engloba a chamada região de “impressão digital” (1400 cm^{-1} a 600 cm^{-1}) que fornece uma grande quantidade de informação, pois tem muitos modos de vibrações acoplados, entretanto é uma região de interpretação complexa. Os espectros na região do infravermelho do conjunto de calibração, que compreende 35 amostras preparadas conforme descrito na TABELA 7, foram adquiridos (FIGURA 34), processados e abordados pela mesma metodologia usada na construção dos modelos anteriormente descritos. Também em destaque na FIGURA 34, algumas regiões onde há diferença espectral entre as amostras analisadas.

FIGURA 34 – COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 35 AMOSTRAS (TABELA 7) DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.



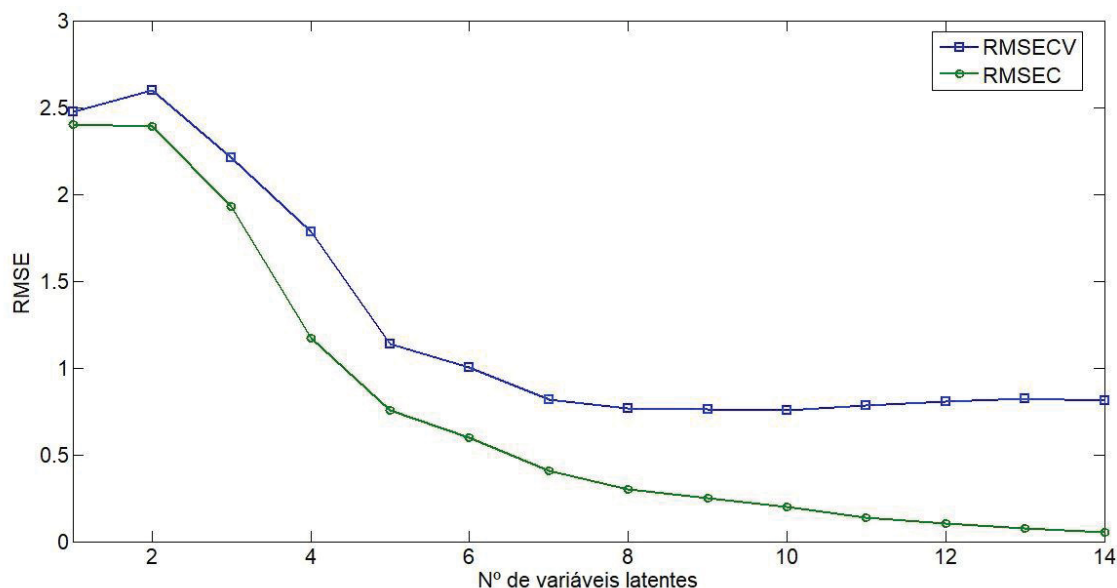
FONTE: O AUTOR (2018).

Inicialmente o objetivo era a construção de um método multivariado utilizando o modo PLS2, entretanto foi verificado que a minimização dos erros se dava com um número diferente de VLs para o FE e para os parabenos (PB). Portanto, através do modo PLS1 foram construídos modelos separados, sendo um modelo para a determinação de

FE e outro para determinação de PB, utilizando o mesmo conjunto de calibração e validação externa para ambos os modelos.

Primeiramente será abordado o modelo construído para a determinação de FE. A melhor capacidade de previsão foi obtida com o modelo construído utilizando os dados espectrais suavizados com alisamento (Savitsky-Golay) em janela de 15 pontos (polinômio de primeiro grau). Para a avaliação do número mais adequado de variáveis latentes (VLs) para a construção do modelo multivariado, foi utilizado o método de validação cruzada *leave one out*. A partir desta previsão, os erros que foram gerados são apresentados como RMSECV em função do número de VL (FIGURA 35).

FIGURA 35 – VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRuíDO PARA DETERMINAÇÃO DE FE.

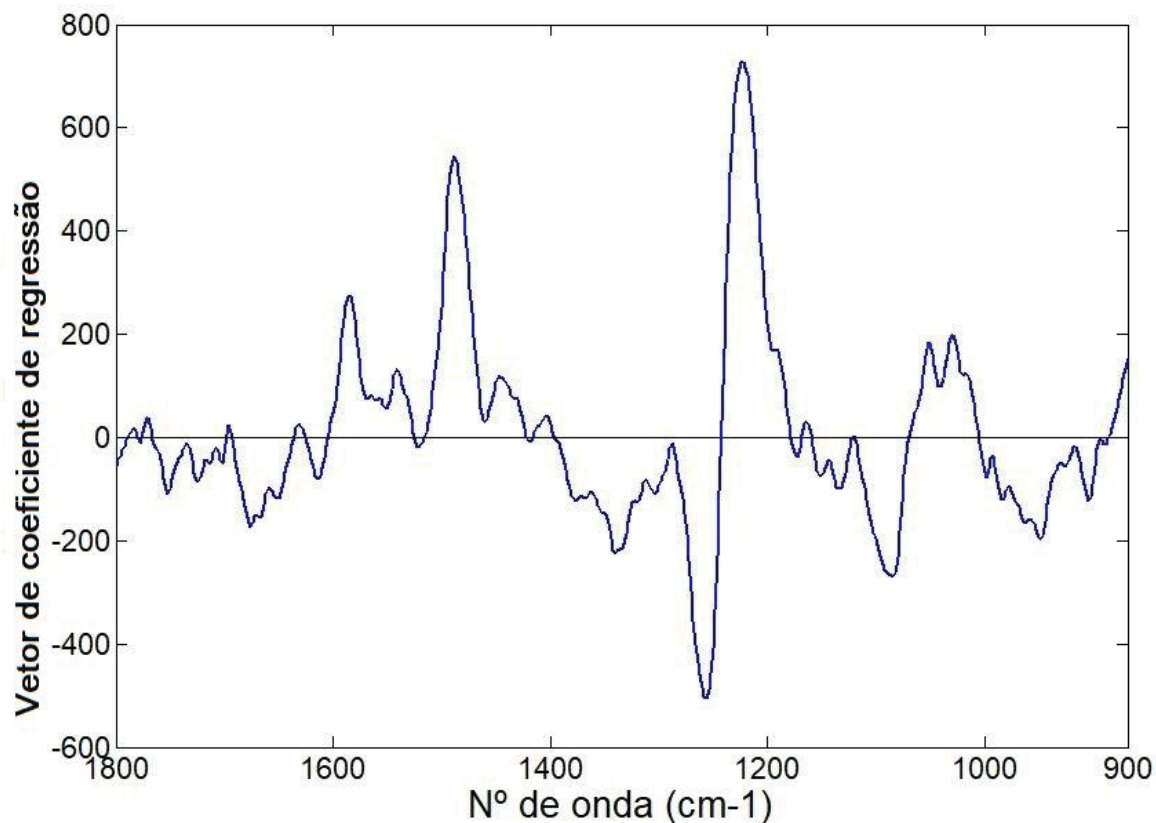


FONTE: O AUTOR (2018).

Observando os valores de RMSECV, observa-se que a minimização dos erros de previsão pela validação cruzada acontece com o uso de 8 VLs, entretanto pela validação externa observou-se a minimização dos erros com o uso de 7 VLs. Assim, optou-se por construir o modelo utilizando 7 VLs. Embora fosse esperada que a minimização dos erros acontecesse com um número menor de VLs, a necessidade de se utilizar um número mais elevado de VLs pode ser explicada pela complexidade dos espectros de IV (em comparação com os espectros de UV, por exemplo).

Na FIGURA 36 é apresentado o vetor de regressão obtido para o modelo construído utilizando alisamento em 15 pontos e 7 VLs.

FIGURA 36 - GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO PLSR (PLS-1) CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE FE.

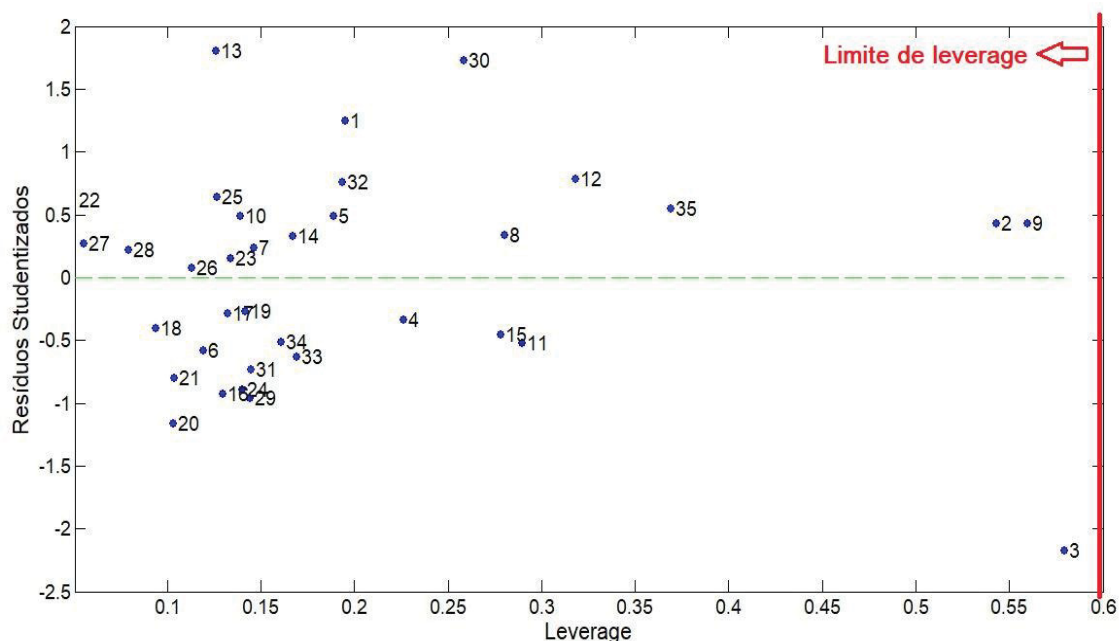


FONTE: O AUTOR (2018).

Pelo gráfico de vetor dos coeficientes de regressão, podemos ver que a região entre 1400 e 1200 cm^{-1} foi de grande influencia na construção do modelo, essa região corresponde às bandas D, E e F (TABELA 20), podendo a banda F corresponder ao coeficiente positivo próximo de 1200 cm^{-1} , a região entre 1600 e 1400 cm^{-1} também apresentou grande influencia positiva na construção do modelo, essa região corresponde às bandas B e C (TABELA 20), outra região de influência positiva na construção do modelo, é entre 1100 e 1000 cm^{-1} que corresponde a banda H (TABELA 20).

A presença de amostras anômalas foi avaliada pelo gráfico de resíduos studentizados *vs leverage*, conforme FIGURA 37.

FIGURA 37 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE FE.

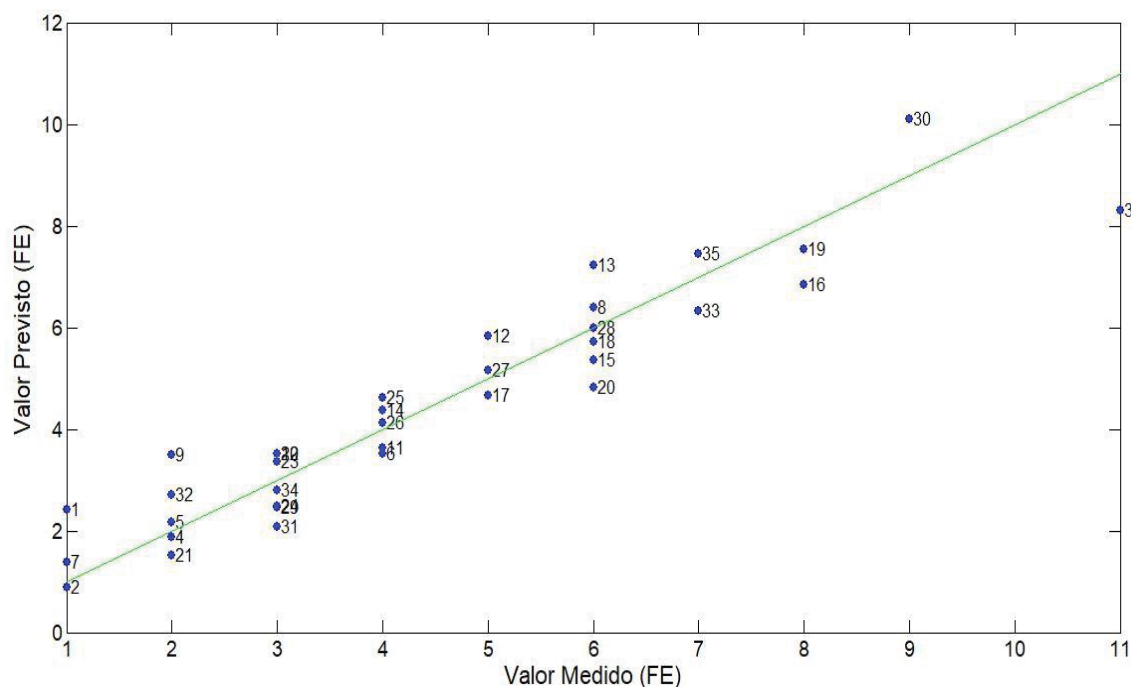


FONTE: O AUTOR (2018).

Em relação aos valores dos resíduos studentizados, todas as amostras estão dentro dos limites máximos permitidos para um nível de confiança de 95 % (limite de $\pm 2,5$). Para a *leverage*, o limite calculado é de 0,60 para o modelo (cálculo descrito anteriormente), nenhuma amostra apresentou valor acima do limite de *leverage*. A amostra 3 apresentou os maiores valores de *leverage* e de resíduo, assim, construiu-se um modelo com a exclusão dessa amostra, mas os erros de previsão não foram significativamente melhorados. Assim, nenhuma amostra foi retirada do conjunto de calibração para a construção do modelo.

A FIGURA 38 mostra os valores reais em função dos valores previstos pelo modelo de regressão. Os parâmetros obtidos pela previsão da validação cruzada em função dos valores reais são mostrados na TABELA 21.

FIGURA 38 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE FE.



FONTE: O AUTOR (2018).

TABELA 21 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE FE.

	FE
r	0,940
RMSEC (mg g⁻¹)	0,404
RMSECV (mg g⁻¹)	0,816

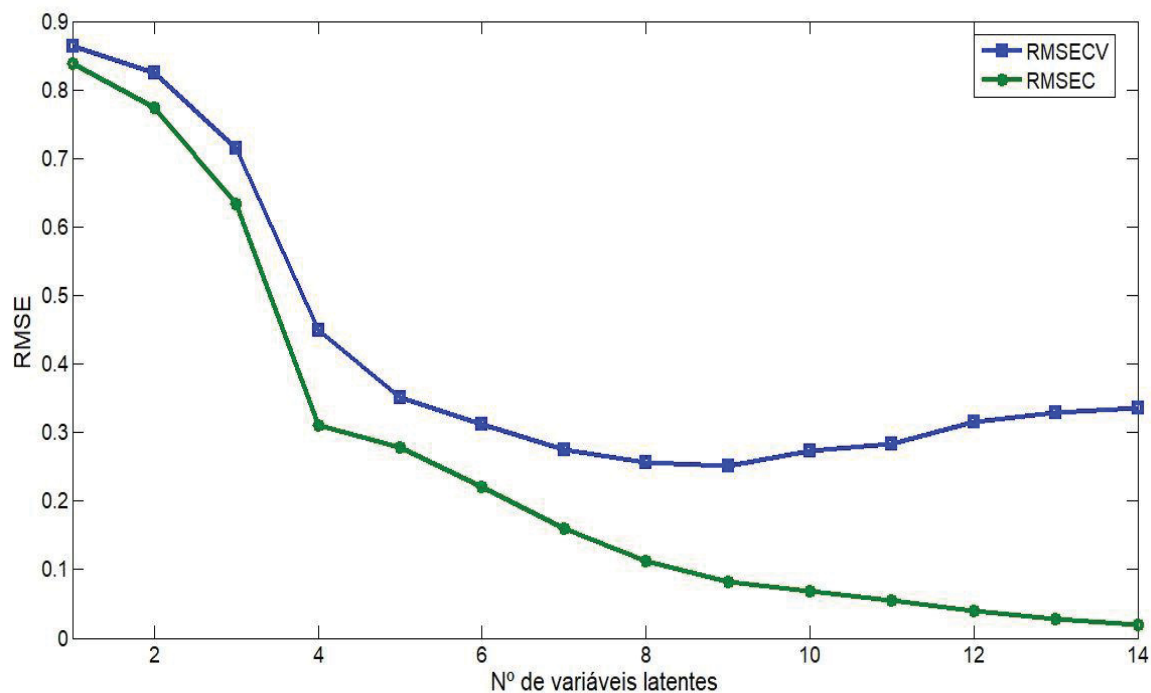
FONTE: O AUTOR (2018).

Embora o valor de RMSECV pareça elevado (0,816 mg g⁻¹), é preciso considerar que a curva varia de 1 a 11 mg g⁻¹ (lembrando que é a massa do analito em relação a massa do creme hidratante), ou seja, na prática é satisfatório, dada a complexidade da amostra (formulação do cosmético), cujos diversos compostos presentes na matriz podem absorver na mesma região que os analitos de interesse, pois possuem os mesmos grupos funcionais.

Já na construção do modelo para determinação de parabenos (PB), constituído pela mistura de MP e PP, a melhor capacidade de previsão foi obtida com o modelo construído utilizando os dados espectrais suavizados com alisamento (Savitsky-Golay) em janela de 25 pontos (polinômio de segundo grau). Para a avaliação do número mais adequado de variáveis latentes (VL) para a construção do modelo multivariado, foi

utilizado o método de validação cruzada *leave one out*. A partir desta previsão, os erros que foram gerados são apresentados como RMSECV em função do número de VL (FIGURA 39).

FIGURA 39 – VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE PB.

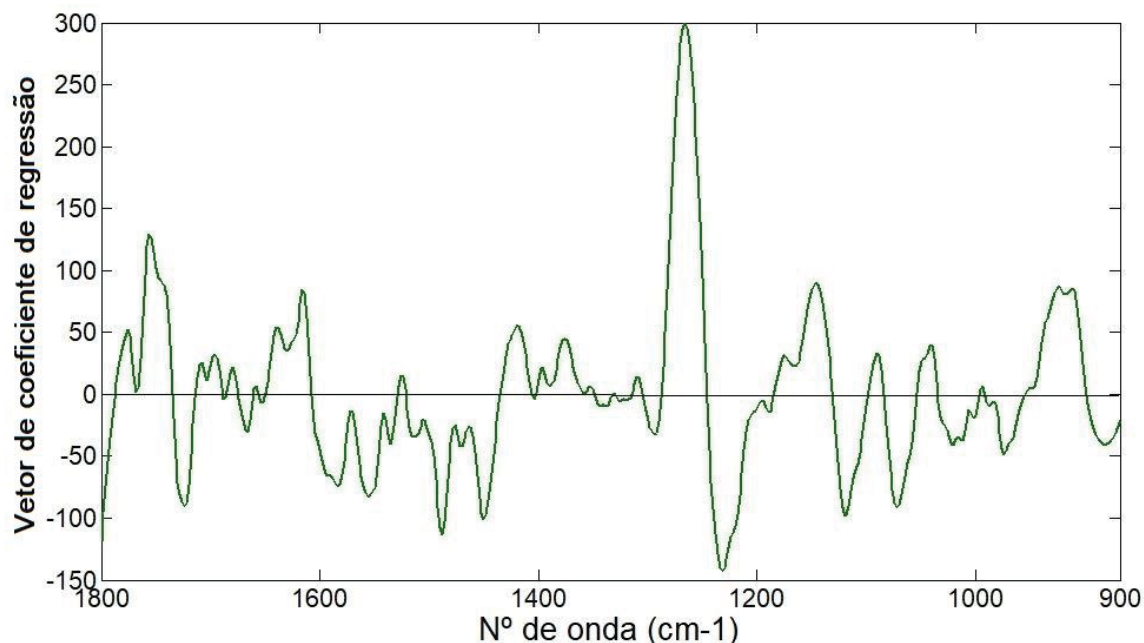


FONTE: O AUTOR (2018).

Observando os valores de RMSECV, observa-se que a minimização dos erros de previsão pela validação cruzada acontece com o uso de 9 VLs, entretanto pela validação externa observou-se a minimização dos erros com o uso de 8 VLs. Assim, optou-se por construir o modelo utilizando 8 VLs.

Na FIGURA 40 é apresentado o vetor de regressão obtido para o modelo construído utilizando alisamento em 25 pontos e 8 VLs.

FIGURA 40 - GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE PB.

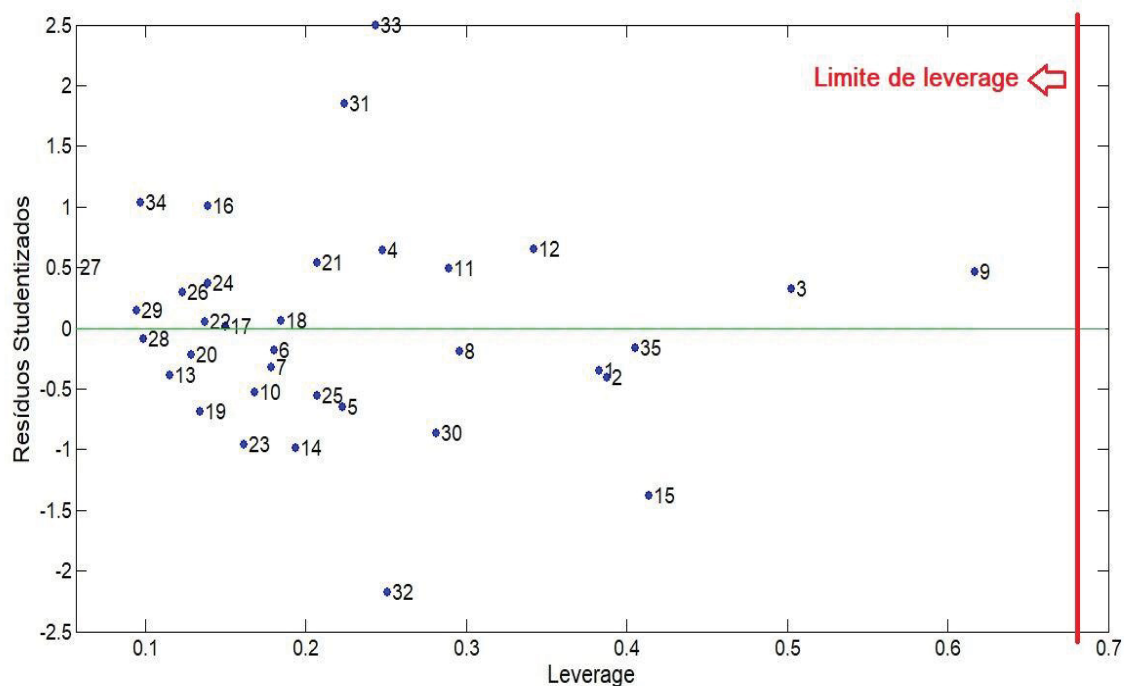


FONTE: O AUTOR (2018).

Pelo gráfico de vetor dos coeficientes de regressão, é possível observar que a região entre 1400 e 1200 cm^{-1} foi de grande influência na construção do modelo, essa região corresponde às bandas D, K e L dos parabenos (TABELA 20), em comparação com o vetor de regressão obtido para o modelo com FE, vemos a inversão entre o pico mais negativo e o mais positivo (acima de 1200 cm^{-1}). A região entre 1800 e 1600 cm^{-1} também apresentou influência positiva na construção do modelo, vemos um pico com influência positiva em torno de 1750 cm^{-1} , nessa região é esperada uma banda de deformação axial do grupo C=O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007), entretanto essa banda não foi observada nos espectros das soluções padrões, possivelmente pela sobreposição da banda A (TABELA 20), ainda próximo a 1600 cm^{-1} vemos uma região de influência positiva que corresponde às bandas I (TABELA 20), outra região de influência positiva na construção do modelo, é entre 1200 e 1100 cm^{-1} que corresponde à banda L (TABELA 20). Próximo a 950 cm^{-1} vemos outra região de influência positiva, que não foi observada nos espectros dos padrões, essa região pode corresponder à deformação de grupo O-H que pode ocorrer da estrutura dessas espécies (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A presença de amostras anômalas foi avaliada pelo gráfico de resíduos studentizados vs *leverage*, conforme FIGURA 41.

FIGURA 41 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DE RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE PB.

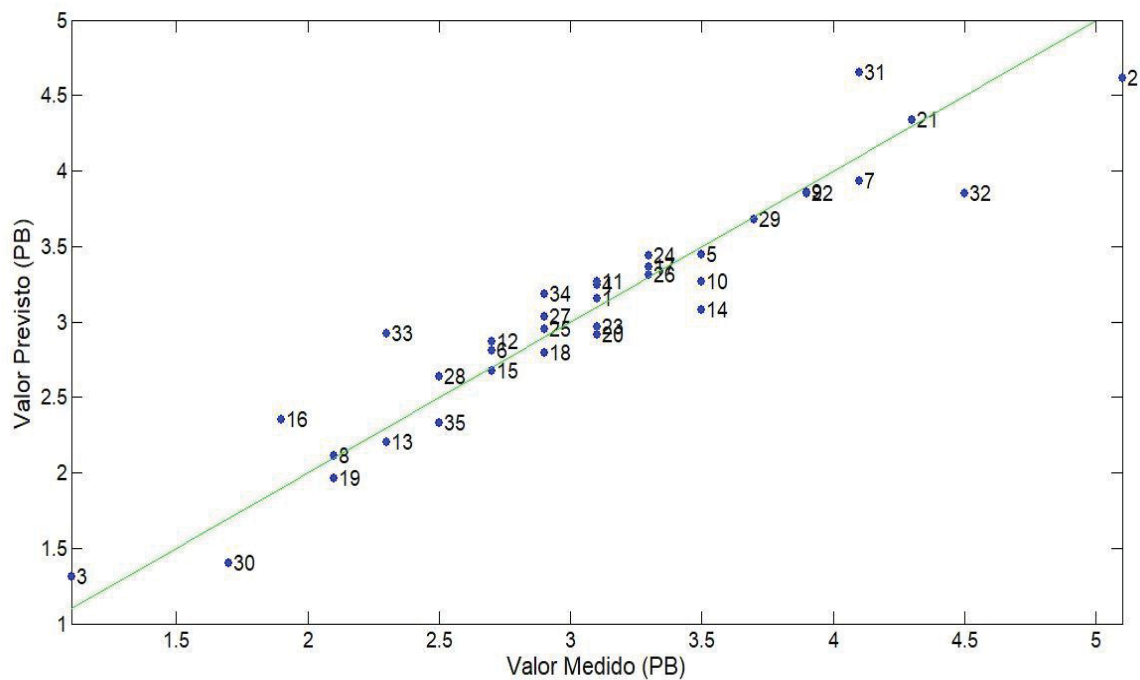


FONTE: O AUTOR (2018).

Em relação aos valores dos resíduos studentizados, todas as amostras estão dentro dos limites máximos permitidos para um nível de confiança de 95 % (limite de $\pm 2,5$). Para a *leverage*, o limite calculado é de 0,68 para o modelo (cálculo descrito anteriormente), nenhuma amostra apresentou valor de *leverage* acima do limite. Assim, nenhuma amostra foi retirada do conjunto de calibração para a construção do modelo.

A FIGURA 42 mostra os valores reais em função dos valores previstos pelo modelo de regressão. Os parâmetros obtidos pela previsão da validação cruzada em função dos valores reais são mostrados na TABELA 22.

FIGURA 42 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES PREVISTOS (VALIDAÇÃO CRUZADA) E OS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE PB.



FONTE: O AUTOR (2018).

TABELA 22 – PARÂMETROS OBTIDOS PELOS VALORES PREVISTOS DA VALIDAÇÃO CRUZADA EM FUNÇÃO DOS VALORES REAIS PARA DETERMINAÇÃO DE PB.

	PB
r	0,950
RMSEC (mg g⁻¹)	0,111
RMSECV (mg g⁻¹)	0,257

FONTE: O AUTOR (2018).

O modelo apresentou uma capacidade preditiva satisfatória, dada pelo seu coeficiente de correlação. O valor de RMSECV obtido foi relativamente baixo, em comparação ao modelo para determinação de FE.

Assim, os modelos construídos foram testados com um conjunto de validação externa, composto por 5 amostras (3 em duplicata), os resultados são mostrados na TABELA 23.

TABELA 23 – RESPOSTA PREVISTA E ERROS OBTIDOS PELO MODELO PARA DETERMINAÇÃO DE FE (PLS-1) E PELO MODELO PARA DETERMINAÇÃO DE PB (PLS-1).

Mistura	Concentração Real (mg g ⁻¹)		Concentração Prevista (mg g ⁻¹)		Erro Relativo (%)	
	FE	PB	FE	PB	FE	PB
1	3,0	2,3	2,80 ± 0,23	2,99 ± 0,03	-6,5	28,8
2	3,7	2,5	3,25 ± 0,50	3,23 ± 0,13	-11,9	29,2
3	2,8	2,5	3,28 ± 0,63	3,19 ± 0,11	17,3	27,6
4	5,0	1,6	5,19	1,85	3,8	15,6
5	3,0	2,7	2,99	3,34	-0,32	23,7
Erro relativo médio (%)					8,0	25,0

FONTE: O AUTOR (2018).

Pelos valores de erro relativos médios obtidos, verifica-se que o modelo para determinação de FE mostrou uma capacidade preditiva satisfatória, visto que o maior erro obtido foi de 17,3 %, o que é satisfatório visto a complexidade da amostra e pelo fato de que a amostra não foi submetida a nenhuma etapa de *clean up*. Entretanto, no caso dos parabenos (PB), o modelo apresentou erro relativo médio de 25,0%, evidenciando uma menor capacidade preditiva.. Também foi possível observar, no caso dos parabenos, uma tendência dos erros gerados serem sempre positivos, o que já era observado no modelo construído utilizando espectrometria no UV.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de preparo de amostra baseado em QuEChERS se mostrou adequado, e apresenta grande potencialidade de aplicação na extração e *clean up* de amostras cosméticas. Na avaliação do solvente extrator, a acetona apresentou os melhores valores de recuperação, e quanto ao sorvente de *clean up*, optou-se por utilizar PSA que apresentou valores satisfatórios de recuperação para os 3 analitos estudados.

Na análise cromatográfica foi possível obter uma boa resolução para todos os analitos estudados. A validação do método cromatográfico foi estabelecida, e todos os critérios de aceitação (ANVISA) foram atendidos. Foi possível obter uma boa linearidade para os analitos (faixa linear de 0,1 a 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MP e MP, e 1,5 a 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FE), a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária com coeficientes de variação (CV %) inferiores a 10% em todas as concentrações avaliadas, a exatidão também foi avaliada, onde foram obtidos valores na faixa de 93,77% a 108,13%, indicando que o método é preciso e exato, e através do Teste de Youden o método se mostrou robusto. O método QuEChERS-HPLC-DAD foi testado em amostras cosméticas reais, onde os valores de concentrações encontrados então abaixo do limite máximo estabelecido pela ANVISA, em todos os casos.

O estudo da determinação simultânea de MP e PP por espectrometria no UV apresentou boa capacidade preditiva em relação ao conjunto de validação externa, entretanto essa capacidade foi comprometida quando o modelo foi aplicado em amostras cosméticas branco fortificadas. Na tentativa de contornar o problema da determinação simultânea, realizou-se a modelagem para a determinação de PB totais (MP e PP conjuntamente) na presença de FE, e seus resultados mostraram-se adequados, gerando um erro relativo médio de 7,75 % para as amostras cosméticas branco fortificadas analisadas por QuEChERS-UV-PLS, representando assim uma metodologia alternativa quando não houver necessidade de se determinar MP e PP individualmente, mesmo na presença de FE.

O estudo da determinação de FE, MP e PP por ATR-FTIR mostrou uma boa capacidade preditiva para o modelo construído para determinação de FE, sendo que o conjunto de validação externa apresentou erro relativo médio de 8,0 %. Entretanto, para a determinação de MP e PP conjuntamente como parabens totais, o modelo construído não apresentou uma capacidade preditiva satisfatória, apresentando erro relativo médio de 25,0 %, e também, todos os erros de previsão foram positivos, o que evidencia a presença de erro sistemático nesse modelo. Os resultados obtidos apresentam importância analítica, visto que demonstram o potencial da aplicação da técnica ATR-FTIR para determinação de compostos em matrizes cosméticas, sendo esta área pouco

explorada na literatura, no caso do FE onde a concentração era compatível com a técnica, foram obtidos baixos erros mesmo sem o uso de etapa de *clean up da amostra*, entretanto, a potencialidade da técnica foi comprometida na determinação dos parabenos.

REFERÊNCIAS

- ABDI, H. Partial Least Squares Regression And Projection On Latent Structure Regression (PLS Regression). **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, p. 97-106, 2010.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.
- ANVISA. Resolução RDC Nº 162, de 11 de setembro de 2001. Estabelece a Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. **Brasília: Diário Oficial da União**, 2001.
- ANVISA. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. **Brasília: Diário Oficial da União**, p. 1–15, 2003.
- ANVISA. Resolução RDC Nº 29, de 10 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre "Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes" e dá outras providências. **Brasília: Diário Oficial da União**, p. 81-87, 2012.
- ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. Evaluation du risque lié à l'utilisation du phénoxyéthanol dans les produits cosmétiques. Disponível em: <<http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Concentration-de-phenoxyethanol-dans-les-produits-cosmetiques-Point-d-information>>. Acesso em: 15 fev. 2017.
- BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B. R.; An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis. **Anal. Chem.**, v. 59, n. 17, p. 1007-1017, 1987.
- BELTRÁN, A.; MARCÉ, R.M.; CORMACK, P.A.G.; BORRULL, F. Synthetic approaches to parabens molecularly imprinted polymers and their applications to the solid-phase extraction of river water samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 677, p. 72–78, 2010.
- BENIJTS, T.; GUENTHER, W.; LAMBERT, W.; DE LEENHEER, A. Sonic Spray Ionization Applied To Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis Of Endocrinedisrupting Chemicals In Environmentalwater Samples. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v. 17, p. 1866–1872, 2003.
- BLANCO, M.; ALCALÁ, M.; BAUTISTA, M. Pharmaceutical Gel Analysis By NIR Spectroscopy: Determination Of The Active Principle And Low Concentration Of Preservatives. **Euro. J. Pharm. Sci.**, v. 33, p. 409-414, 2008.
- BLANCO, M.; ALCALÁ, M.; PLANELLS, J.; MULERO, R. Quality Control Of Cosmetic Mixtures By NIR Spectroscopy. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 389, n. 5, p. 1577-1583, 2007.
- BLEDZKA D.; GROMADZINSKA J.; WASOWICZ W. Parabéns. From Environmental Studies To Human Helth. **Environment International**, v. 67, p. 27-42, 2014.
- BORREMANS, M.; VAN LOCO, J.; ROOS, P.; GOEYENS, L. Validation Of HPLC Analysis Of 2- Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-Ol, Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl And Benzyl 4-Hydroxybenzoate (Parabens) In Cosmetic Products, With Emphasis On Decision Limit And Detection Capability. **Chromatographia**, v. 59, p. 47–53, 2004.

BRAUSCH, J. M.; R., GARY M.. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p.1518-1532, 2011.

BÜNING-PFAUE, H.; KEHRAUS, S. Application Of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) In The Analysis Of Frying Fats. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 103, p.793-797, 2001.

BYFORD, J. R. et al. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p.49-60, jan. 2002.

CABALEIRO, N.; CALLE, I. DE LA; BENDICHO, C.; LAVILLA, I. An Overview of Sample Preparation for the Determination of Parabens in Cosmetics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 57, p. 34-46, 2014.

CABALEIRO, N.; CALLE, I. DE LA; BENDICHO, C.; LAVILLA, I. Current Trends In Liquid–Liquid And Solid–Liquid Extraction For Cosmetic Analysis: A Review. **Anal. Methods**, v. 5, p. 323–340, 2013.

CABRERA, L. C. et al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p.227-240, 2012.

CABUK, H.; AKYUEZ, M.; ATA, S. A Simple Solvent Collection Technique For A Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Of Parabens From Aqueous Samples Using Low-Density Organic Solvent. **J. Sep. Sci.**, v. 35, p. 2645–2652, 2012.

CARMONA, Eric; ANDREU, Vicente; PICÓ, Yolanda. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. **Science Of The Total Environment**, v. 484, p.53-63, 2014.

CASHMAN, A. L.; WARSHAW, E. M.. Parabens: A Review of Epidemiology, Structure, Allergenicity, and Hormonal Properties. **Dermatitis (formerly American Journal Of Contact Dermatitis)**, v. 16, n. 02, p.057-66, 2005.

CASTELAIN, F.; CASTELAIN, M. Parabens: a real hazard or a scare story?. **Eur. J. Dermatol.**, v. 22, n. 6, p. 723-727, 2012.

CERQUEIRA, Maristela B.r. et al. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. **Chemosphere**, v. 107, p.74-82, 2014.

CHEN, Y.Q.; NI, Y.N. Simultaneous Spectrophotometric Determination Of Four Preservatives In Foodstuffs By Multivariate Calibration And Artificial Neural Networks. **Chin. Chem. Let.**, v. 20, n. 5, p. 615-619, 2009.

CHEN, Z.F.; YING, G.H.; LAI, H.J.; CHEN, F.; SU, H.C.; LIU, Y.S.; PENG, F.Q.; ZHAO, J.L. Determination Of Biocides In Different Environmental Matrices By Use Of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 404, p. 3175–3188, 2012.

CIUVASOVAITE, V.; ADOMAVICIUTE, E.; VICKACKAITE, V. Solid-Phase Microextraction Of Parabens By Polyaniline–Polypyrrole Coating. **Chemija**, v. 18, p. 11–15, 2007.

COLLADO, M.S.; MANTOVANI, V.E.; GOICOECHEA, H.C.; OLIVIERI, A.C. Simultaneous Spectrophotometric-Multivariate Calibration Determination Of Several Components Of Ophthalmic Solutions: Phenylephrine, Chloramphenicol, Antipyrine, Methylparaben And Thimerosal. **Talanta**, v. 52, n. 5, p. 909-920, 2000.

CRUCES-BLANCO, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; GÁLVEZ-MATA, L.; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, A. Simultaneous Determination, By Capillary Zone Electrophoresis, Of Multiple Components Of Different Industrial Products. **Chromatographia**, v. 53, p. 414–418, 2001.

DARBRE, P. D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W. R.; COLDHAM, N. G.; SAUER, M. J.; POPE, G. S. Concentrations Of Parabens In Human Breast Tumours. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 5-13, 2004.

DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. Antimicrobials in Food, Chapter 9 - Parabens. **CRC Press: FL**, 3^o edição, 2005.

DECONINCK, E. et al. Detection of whitening agents in illegal cosmetics using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 98, p.178-185, 2014..

EBRAHIMPOUR, B.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Emulsification Liquid Phase Microextraction Followed By On-Line Phase Separation Coupled To High Performance Liquid Chromatography. **Anal. Chim. Acta**, v. 751, p. 79–85, 2012.

EL-GINDY, A.; EMARA, S.; SHAABAN, H. Development and validation of chemometrics-assisted spectrophotometric and liquid chromatographic methods for the simultaneous determination of two multicomponent mixtures containing bronchodilator drugs. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 43, n. 3, p. 973-82, 2007.

FARAJZADEH, M.A.; DJOZAN, D.; BAKHTIYARI, R.F. Use Of A Capillary Tube For Collecting An Extraction Solvent Lighter Than Water After Dispersive Liquid–Liquid Microextraction And Its Application In The Determination Of Parabens In Different Samples By Gas Chromatography-Flame Ionization Detection. **Talanta**, v. 81, p. 1360–1367, 2010.

FEI, T.; LI, H.; DING, M.; ITO, M.; LIN, J.M. Determination Of Parabens In Cosmetic Products By Solid-Phase Microextraction Of Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate Thin Film On Fibers And Ultra High-Speed Liquid Chromatography With Diode Array Detector. **J. Sep. Sci.**, v. 34, p. 1599–1606, 2011.

FERNANDES, J.P.S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A.C.G.; SOUSA, M.R.; DA SILVA, G.R.; CIANCIULLI, M.E.; CORRÊA, M.F.; FERRARINI, M. Estudo Das Relações Entre Estrutura E Atividade De Parabenos: Uma Aula Prática. **Química Nova**, v. 36, p. 890-893, 2013.

FERREIRA. M. M. C. Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações. In: Calibração – Métodos de Regressão. **Editora Unicamp**, Campinas, SP, 2015, p. 346-350.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

GAO, W.; LEGIDO-QUIGLEY, C. Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. **Journal Of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p.4307-4311, 2011.

GAO, W. et al. UV gradient combined with principal component analysis: Highly sensitive and specific high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams. **Journal Of Chromatography A**, v. 1228, p.324-328, 2012.

GARNER, N., SIOL, A., EILKS, I. Parabens as preservatives in personal care products. **Chemistry in Action**, v. 103, p. 36-43, 2014.

GEARA-MATTA, D.; LORGEUX, C.; ROCHER, V.; CHEBBO, G.; MOILLERON, R. Contamination Of Wastewater By Endocrine Disruptors In France: Analytical Development For Triclosan, Triclocarban And Parabéns. **Tech. Sci. Methodes**, v. 10, p. 17–24, 2011.

GODINHO, R. B.; SANTOS, M. C.; POPPI, R. J.. Determination of fragrance content in perfume by Raman spectroscopy and multivariate calibration. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 157, p.158-163, 2016.

GONÇALO, M.; GOOSSENS, A. Whilst Rome Burns: The Epidemic of Contact Allergy to Methylisothiazolinone. **Contact Dermatitis**, v. 68, n. 5, p.257-258, 2013.

GONZÁLEZ-CURBELO, M.Á. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 71, p.169-185, 2015.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J.B.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Simultaneous Determination Of Parabens, Triclosan And Triclocarban In Water By Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v. 23, p. 1756–1766, 2009.

GRUVBERGER, B.; BRUZE, M. Preservatives. **Clinics in Dermatology**, v. 15, n. 4, p.493 – 497, 1997.

HAJKOVA, R.; SOLICH, P.; DVORAK, J.; SICHA, J. Simultaneous Determination Of Methylparaben, Propylparaben, Hydrocortisone Acetate And Its Degradation Products In A Topical Cream By RP-HPLC. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, n. 4-5, p. 921-927, 2003.

HAN, F.; HE, Y.Z.; YU, C.Z. On-Line Pretreatment And Determination Of Parabens In Cosmetic Products By Combination Of Flow Injection Analysis, Solid-Phase Extraction And Micellar Electrokinetic Chromatography. **Talanta**, v. 74, p. 1371–1377, 2008.

HARVEY, P. W. Parabens, Oestrogenicity, Underarm Cosmetics And Breast Cancer: A Perspective On A Hypothesis. **J. Appl. Toxicol.**, v. 23, n. 5, p. 285-288, 2003.

HAUNSCHMIDT, M.; BUCHBERGER, W.; KLAMPFL, C.W.; HERTSENS, R. Identification And Semi-Quantitative Analysis Of Parabens And UV Filters In Cosmetic Products By Direct-Analysis-In-Real-Time Mass Spectrometry And Gas Chromatography With Mass Spectrometric Detection. **Anal. Methods**, v. 3, p. 99–104, 2011.

HE, S.; ZHAO, Y.; ZHU, Z.; LIU, H.; LI, M.; SHAO, Y.; ZHUANG, Q. Comparative Study For The Analysis Of Parabens By Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography With And Without Large-Volume Sample Stacking Technique. **Talanta**, v. 69, n.1, p.166–171, 2006.

HOMEM, V; SILVA, J.A.; CUNHA, C.; ALVES, A.; SANTOS, L. New analytical method for the determination of musks in personal care products by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe extraction followed by GC-MS. **Journal Of Separation Science**, v. 36, n. 13, p.2176-2184, 2013.

HOPPE, A. C.; PAIS, M. C. N. Avaliação da toxicidade de parabenos em cosméticos. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 3, p.49-70, 2017.

JAIN, R.; MUDIAM, M.K.; CHAUHAN, A.; CH, R.; MURTHY, R.C.; KHAN, H.A. Simultaneous Derivatization And Preconcentration Of Parabens In Food And Other Matrices By Isobutyl Chloroformate And Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed By Gas Chromatographic Analysis. **Food Chem.**, v. 141, p. 436–443, 2013.

JENSEN C. D.; JOHANSEN, J. D.; MENNE, T.; ANDERSEN, K. E. Methyl dibromo Glutaronitrile Contact Allergy: Effect Of Single Versus Repeated Daily Exposure. **Contact Dermatitis**, v. 52, n. 2, p. 88-92, 2005.

KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V.. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1353, p.131-139, ago. 2014

KEITHLEY, R.B.; HEIEN, M.L.; WIGHTMAN, R.M. Multivariate Concentration Determination Using Principal Component Regression With Residual Analysis. **Trends Anal. Chem.**, v. 28, p. 1127-1136, 2009.

KHANI, R.; GHASEMI, J.B.; SHEMIRANI, F. Simultaneous Multicomponent Spectrophotometric Monitoring Of Methyl And Propyl Parabens Using Multivariate Statistical Methods After Their Preconcentration By Robust Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 295-303, 2014.

KIM, T.H.; KIM, M.G.; KIM, M.G.; SHIN, B.S.; KIM, K.B.; LEE, J.B.; PAIK, S.H.; YOO, S.D. Simultaneous determination of phenoxyethanol and its major metabolite, phenoxyacetic acid, in rat biological matrices by LC-MS/MS with polarity switching: Application to ADME studies. **Talanta**, v. 144, p. 29-38, 2015.

KIRALJ, Rudolf; FERREIRA, Márcia M. C.. Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: theory and application. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.770-787, 2009.

KROWKA, J. Phenoxyethanol as a safe and important preservative in personal care. **Cosmetics & Toiletries**, v. 129, p. 24-27, 2014.

LABAT, L.; KUMMER, E.; DALLET, P.; DUBOST, J.P. Comparison Of High-Performance Liquid Chromatography And Capillary Zone Electrophoresis For The Determination Of Parabens In A Cosmetic Product. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 23, n. 4, p. 763-769, 2000.

LEE, M.R.; LIN, C.Y.; LI, Z.G.; TSAI, T.F. Simultaneous Analysis Of Antioxidants And Preservatives In Cosmetics By Supercritical Fluid Extraction Combined With Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1120, p. 244–251, 2006.

LIMA, F.S.G.; ARAÚJO, M.A.S.; BORGES, L.E.P. Determination Of Lubricant Base Oil Properties By Near Infrared Spectroscopy Using Diferente Sample And Variable Selection Methods. **J. Near Infrared Spectrosc.**, v. 12, p. 159-166, 2004.

LUNDOV, M. D.; MOESBY, L.; ZACHARIAE, C.; JOHANSEN, J. D. Contamination Versus Preservation Of Cosmetics: A Review On Legislation, Usage, Infections, And Contact Allergy. **Contact Dermatitis**, v. 60, n. 2, p. 70-78, 2009.

LIU, R.X.; KUANG, J.; GONG, Q.; HOU, X.L. Principal Component Regression Analysis With SPSS. **Comput. Methods Programs Biomed.**, v. 71, p. 141-147, 2003.

MAIO, P.; CARVALHO, R.; AMARO, C.; SANTOS, R.; CARDOSO, J. Contact allergy to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (MCI/MI): findings from a Contact Dermatitis Unit. **Cutaneous And Ocular Toxicology**, v. 31, n. 2, p.151-153, 2011.

MALLIKA, J.B.N.; THIRUVENGADARAJAN, V.S.; GOPINATH, C. A Review On Various Analytical Method Developments For The Identification Of Methyl Paraben Presente In Cosmetics. **Int. J. Life Sci.**, v. 3, n. 1, p. 5-9, 2013.

MARENGO, E.; GIANOTTI, V.; ANGIOI, S.; GENNARO, M.C. Optimization By Experimental Design And Artificial Neural Networks Of The Ion-Interaction Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation Of Twenty Cosmetic Preservatives. **J. Chromatogr. A**, v. 1029, n. 1-2, p. 57-65, 2004.

MARHABA, T.F.; BORGAONKAR, A.D.; PUNBURANANON, K. Principal Component Regression Model Applied To Dimensionally Reduced Spectral Fluorescence Signature For The Determination Of Organic Character And THM Formation Potential Of Source Water. **L. Hazard. Mater.**, v. 169, p. 998-1004, 2009.

MÁRQUEZ-SILLEIRO, I.; AGUILERA-HERRADOR, E.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Determination Of Parabens In Cosmetic Products Using Multi-Walled Carbon Nanotubes As Solid Phase Extraction Sorbent And Corona-Charged Aerosol Detection System. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 1-6, 2010.

MARTÍNS, I.; CARREIRA, F.C.; CANAES, L.S.; CAMPOS-JUNIOR, F.A.S.; CRUZ, L.M.S.; RATH, S. Determination Of Parabens In Shampoo Using High Performance Liquid Chromatography With Amperometric Detection On A Boron-Doped Diamond Electrode. **Talanta**, v. 85, p. 1-7, 2011.

MASSART, D.L.; VANDEGINSTE, B.G.M.; BUYDENS, L.M.C; JONG, S.; LEWI, P.J.; SMEYERS-VERBEKE, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. **Elsevier**, 1st ed., p. 1-2, 1997.

McCLURE, W.F. Review: 204 Years Of Near Infrared Technology: 1800-2003. **J. Near Infrared Spectrosc.**, v. 11, p. 487-518, 2003.

MELO, L.P.; QUEIROZ, M.E.C. Simultaneous Analysis Of Parabens In Cosmetic Products By Stir Bar Sorptive Extraction And Liquid Chromatography. **J. Sep. Sci.**, v. 33, p.1849-1855, 2010.

MEMON, N.; IQBAL-BHANGER, M.; KHUHAWER, M. Y. Determination Of Preservatives In Cosmetics And Food Samples By Micellar Liquid Chromatography. **J. Sep. Sci.**, v. 28, p. 635-638, 2005.

MSAGATI, T.A.M.; BARRI, T.; LARSSON, N.; JÖNSSON, J.Å. Analysis And Quantification Of Parabens In Cosmetic Products By Utilizing Hollow Fibre-Supported Liquid Membrane And High Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 30, p. 297-307, 2008.

MUTIHAC, L.; MUTIHAC, R. Mining In Chemometrics. **Anal. Chim. Acta.**, v. 612, n. 1, p. 1-18, 2008.

NETO, J.M.M; MOITA, G.C. Uma Introdução À Análise Exploratória De Dados Multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NOVAKOVA, L.; SOLICH, P.; MATYSOVA, L.; SICHA, J. HPLC Determination Of Estradiol, Its Degradation Product, And Preservatives In New Topical Formulation Estrogel HBF. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 379, n. 5-6, p. 781-787, 2004.

NÚÑEZ, L.; TADEO, J.L.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A.I.; TURIEL, E. Determination Of Parabens In Environmental Solid Samples By Ultrasonic-Assisted Extraction And Liquid Chromatography With Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1214, p. 178–182, 2008.

NÚÑEZ, L.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography- ultraviolet detection. **Talanta**, v. 80, p. 1782–1788, 2010.

OCAÑA-GONZALEZ, J.A.; VILLAR-NAVARRO, M.; RAMOS-PAYÁN, M.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; BELLO-LÓPEZ, M.A. New Developments In The Extraction And Determination Of Parabens In Cosmetics And Environmental Samples: A Review. **Anal. Chim. Acta**, v. 858, p. 1-15, 2015.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Liquid-Phase Microextraction Techniques Within The Framework Of Green Chemistry. **TrAC Trends Anal. Chem.**, v. 29, p. 617– 628, 2010.

PERKIN ELMER. FT-IR Spectroscopy: Attenued Total Reflectance (ATR). 2005. Disponível em <http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf> Acesso em: 15 jan. 2018.

POLATI, S.; GOSETTI, F.; GENNARO, M.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. Preservatives In Cosmetics. Regulatory Aspects And Analytical Methods Analysis Of Cosmetic Products. **Elsevier**, p. 211 – 241, 2007.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRICHODKO, A.; MOCKUNAITE, M.; SMITIENE, V.; VICKACKAITE, V. Hollow Fibre Liquid Phase Microextraction Of Derivatized Parabéns. **Chemija**, v. 22, p. 155–161, 2011.

RADOVAN, C.; CINGHITA, D.; MANEA, F.; MINCEA, M.; COFAN, C.; OSTAFE, V. Electrochemical Sensing And Assessment Of Parabens In Hydro-Alcoholic Solutions And Water Using A Boron-Doped Diamond Electrode. **Sensors**, v. 8, p. 4330–4349, 2008.

RASTOGI, S. C. Analytical control of preservative labelling on skin creams. **Contact Dermatitis**, v. 43, n. 6, p. 339-343, 2000.

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

RICHTER G.; BARTH, J. Contact Allergy To Preservatives In Cosmetics And Relationship To The Degree Of Formaldehyde Allergy. **J. Appl. Cosmetol.**, v. 9, p. 35-38, 1992.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G.. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.807-812, 2004.

ROSSI, A. DE; DESIDERIO, C. Fast Capillary Electrochromatographic Analysis Of Parabens And 4-Hydroxybenzoic Acid In Drugs And Cosmetics. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3410–3417, 2002.

ROUGOOR, C.W.; SUNDARAM, R.; VAN ARENDONK, J.A.M. The Relation Between Breeding Management And 305-Day Milk Production, Determined Via Principal Componentes Regression And Partial Least Squares. **Livestock Prod. Sci.**, v. 66, p. 71-83, 2000.

SÁNCHEZ-PRADO, L.; LAMAS, J.P.; LORES, M.; GARCÍA-JARES, C.; LLOMPART, M. Simultaneous In-Cell Derivatization Pressurized Liquid Extraction For The Determination Of Multiclass Preservatives In Leave-On Cosmetics. **Anal. Chem.**, v. 82, p. 9384–9392, 2010.

SARAJI, M.; MIRMAHDIEH, S. Single-Drop Microextraction Followed By In-Syringe Derivatization And GC-MS Detection For The Determination Of Parabens In Water And Cosmetic Products. **J. Sep. Sci.**, v. 32, p. 988–995, 2009.

SASSEVILLE, D.; ALFALAH, M.; LACROIX, J.P. “Parabenoia” Debunked, or “Who’s Afraid of Parabens?”. **Dermatitis**, v. 26, n. 6, p. 254-259, 2015.

SCALIA, S.; GAMES, D.E. Determination Of Parabens In Cosmetic Products By Supercritical Fluid Extraction And High-Performance Liquid Chromatography. **Analyst**, v. 117, p. 839–841, 1992.

SCSS – SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY. Opinion of the SCSS – Final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 156, 2016.

SENA, M.M.; TREVISAN, M.G.; POPPI, R.J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Quím. Nova**, v. 28, n. 5, p. 910-920, 2005.

SEVENTH Commission Directive 96/45/EC de 2 julho de 1996. Official Journal of the European Communities, Europa, 213, p. 8-15, 1996.

SHABIR, G.A. A Practical Approach To Validation Of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practices. **J. Validation Technol.**, v. 10, n. 3, p. 210-218, 2004.

SHEN, H.Y.; JIANG, H.L.; MAO, H.L.; PAN, G.; ZHOU, L.; CAO, Y.F. Simultaneous Determination Of Seven Phthalates And Four Parabens In Cosmetic Products Using HPLC-DAD And GC-MS Methods. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 48–54, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7ª edição. Rio de Janeiro, RJ: **LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.**, cap. 2, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. et al. Fundamentos de química analítica. São Paulo: **Thomson Learning**, 2006.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERRERA-HERRERA, A. V.; RODRIGUÉZ-DELGADO, M. A. Recent Advances and Developments in the QuEChERS Method. **Comprehensive Analytical Chemistry**, p.319-374, 2017.

SOTTOFATTORI, E.; ANZALDI, M.; BALBI, A.; TONELLO, G. Simultaneous HPLC Determination Of Multiple Components In A Commercial Cosmetic Cream. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 213–217, 1998.

STEINBERG, D. Department of health and human services U.S. food and drug administration. Center for food safety and applied nutrition public meeting: cosmetic microbiological safety issues, 2011.

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. **Analytical Techniques In The Sciences**, p.2-50, 2004.

TAHMASEBI, E.; YAMINI, Y.; MEHDINIA, A.; ROUHI, F. Polyaniline-coated Fe₃O₄ nanoparticles: an anion exchange magnetic sorbent for solid-phase extraction. **J. Sep. Sci.**, v. 35, p. 2256–2265, 2012.

TROUTMAN, J. A.; RICK, D.L.; STUARD, S.B.; FISHER, J.; BARTELS, M.J. Development of a physiologically-based pharmacokinetic model of 2-phenoxyethanol and its metabolite phenoxyacetic acid in rats and humans to address toxicokinetic uncertainty in risk assessment. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 73, n. 2, p.530-543, 2015.

UYSAL, U.D.; GÜRAY, T. Determination Of Parabens In Pharmaceutical And Cosmetic Products By Capillary Electrophoresis. **J. Anal. Chem.**, v. 63, p. 982–986, 2008.

WANG, S.P.; CHANG, C.L. Determination Of Parabens In Cosmetic Products By Supercritical Fluid Extraction And Capillary Zone Electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, v. 377, p. 85–93, 1998.

WEYL, O; KAISER, H; HECHT, T. On the efficacy and mode of action of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, *Carassius auratus* (L.), at different temperatures and concentrations. **Aquaculture Research**, v. 27, n. 10, p.757-764, 1996.

WU, T.; WANG, C.; WANG, X.; MA, Q. Simultaneous Determination Of 21 Preservatives In Cosmetics By Ultra Performance Liquid Chromatography. **Int. J. Cosmetic Sci.**, v. 30, p. 367–372, 2008.

YAMINI, Y.; SALEH, A.; REZAEI, M.; RANJBAR, L.; MORADI, M. Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction Of Various Preservatives From Cosmetics, Beverages, And Water Samples. **J. Liq. Chromatogr. R. T.**, v. 35, p. 2623–2642, 2012.

YAZAR K.; JOHNSON S.; LIND M.L., BOMAN, A.; LIDÉN, C. Preservatives And Fragrances In Selected Consumer-Availablr Cosmetics And Detergents. **Contact Dermatitis**. v. 64, n. 5, p. 265-272, 2011.

YE, N.; SHI, P.; LI, J.; WANG, Q. Application of graphene as solid phase extraction absorbent det parabens in cosmetic products by capillary electrophoresis. **Anal. Lett.**, v. 46, p. 1991–2000, 2013.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; WERNER, J.; JESZKA-SKOWRONA, A.M.; CZARCZYŃSKA-GOŚLIŃSKAB, B. Determination of parabens in cosmetic products using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Anal. Methods**, v. 8, p. 3903-3909, 2016.

ZHANG, Q.; LIAN, M.; LIU, L.; CUI, H. High-Performance Liquid Chromatographic Assay Of Parabens In Wash-Off Cosmetic Products And Foods Using Chemiluminescence Detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 537, p. 31–39, 2005.

ZOTOU, A.; SAKLA, I.; TZANAVARAS, P.D. LC-Determination Of Five Paraben Preservatives In Saliva And Toothpaste Samples Using UV Detection And A Short Monolithic Column. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 53, p. 785–789, 2010.

XUN, Z.; LIU, D.; HUANG, R.; HE, S.; HU, D.; GUO, X.; XIAN, Y. Simultaneous determination of eight alkaloids and oleandrin in herbal cosmetics by dispersive solid-phase extraction coupled with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal Of Separation Science**, v. 40, n. 9, p.1966-1973, 2017.