

## OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM COSMÉTICOS POR HPLC-DAD

Rafael A. Gonçalves<sup>a</sup>, Noemi Nagata<sup>a</sup> e Patricio G. Peralta-Zamora<sup>\*a, </sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 81531-980 Curitiba – PR, Brasil

Recebido em 17/07/2019; aceito em 18/11/2019; publicado na web em 03/02/2020

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF QuEChERS BASED METHOD FOR DETERMINATION OF PRESERVATIVES IN COSMETICS BY HPLC-DAD. Parabens are widely used as preservatives in the last decades. Others 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 as sample preparation. For application in cosmetic samples, the original QuEChERS method was modified and optimized by evaluate of different solvents for extraction and sorbents for clean up step. Increases at recoveries of analytes were obtained employing acetone as solvent and PSA for clean up step, showed recoveries between 83.7% and 88.6% for all analytes. The method was validated according to ANVISA (linear range: 0.1 to 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for MP and PP, 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 (%) lower than 10% in all concentrations analysed, and accuracy was evaluated, with values ranging from 93.77% to 108.13%. The QuEChERS-HPLC-DAD method was tested in real samples (moisturizing cream and lotion, cleansing gel), where the concentration values were found below the maximum limit established by ANVISA.

Keywords: parabens; phenoxyethanol; cosmetics; QuEChERS; HPLC-DAD.

### INTRODUÇÃO

Os parabenos são conservantes usados em uma grande variedade de produtos cosméticos, além de produtos alimentícios e farmacêuticos. São ésteres do ácido p-hidroxibenzóico, sendo os mais usados: metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno (BP). Os parabenos possuem baixo custo e oferecem poderosa ação antimicrobiana,<sup>1</sup> o que popularizou o seu uso como agentes conservantes.

O fenoxietanol (FE), ou 2-fenoxietanol, é um éter glicólico que possui muitas aplicações em cosméticos, vacinas e produtos farmacêuticos.<sup>2</sup> Seu uso como conservante na indústria cosmética aumentou significativamente nos últimos anos, devido principalmente ao seu baixo potencial de sensibilização dérmica.<sup>3</sup>

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 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. Para o FE o limite máximo é de 1,0% em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Visando garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos cosméticos, faz-se necessário o controle de qualidade dos produtos comercializados. Apesar do grande uso dos parabenos, ainda existem controvérsias em torno do seu uso, não apenas em razão do seu potencial alergênico, mas também em função da suspeita relação com alguns tipos de câncer.<sup>4</sup> Em 2014, a Comunidade Européia proibiu o uso de isopropil, isobutil, fenil, benzil e pentilparabeno, por meio da normativa CE 358/2014. Esse cenário abriu espaço para a utilização de outros conservantes, como o FE, que prometem ser mais seguros, mesmo na ausência de estudos sobre as consequências do seu uso prolongado. Em função de todos estes aspectos, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que auxiliem na detecção e quantificação dessas substâncias nas mais diversas matrizes cosméticas.

A complexidade e a diversidade das matrizes cosméticas, incluindo diferentes estados físicos deste tipo de produtos, fazem com que exista a necessidade de se estabelecer uma grande diversidade de métodos de análise. Assim, técnicas de extração em fase sólida,<sup>5</sup> além de outras variantes miniaturizadas,<sup>6,7</sup> associadas à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) ou a cromatografia a gás associada à espectrometria de massas (GC-MS), são métodos analíticos largamente usados na determinação de conservantes em cosméticos.<sup>5</sup>

Dentro do contexto das técnicas estabelecidas para o preparo de amostras, é relevante salientar o método QuEChERS (acrônimo para *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*), método que tem apresentado vantagens na análise de amostras complexas. Apesar do método QuEChERS ser originalmente proposto para a determinação de pesticidas em alimentos,<sup>8</sup> rapidamente surgiram estudos avaliando a aplicação desse método na análise de outras matrizes complexas, constatando-se uma grande versatilidade. Diversas modificações do método original foram propostas,<sup>9</sup> visando aumentar a recuperação e diminuir os efeitos de matriz, o que permitiu melhorar ainda mais o desempenho do método QuEChERS na análise de matrizes complexas.

Em matrizes cosméticas, algumas aplicações baseadas no método QuEChERS foram relatadas na literatura. Os dois primeiros trabalhos publicados determinaram compostos fixadores de fragrâncias em diversos tipos de cosméticos, empregando-se acetonitrila como solvente extrator e PSA (amina primária secundária) e sílica C18 como sorvente de *clean up*.<sup>10,11</sup> Outros relatos envolvem a determinação de análogos de prostaglandinas em maquiagem para os olhos,<sup>12</sup> N-nitrosodietanolamina provenientes da reação de conservantes a base de nitrito e aminas (dietanolamina e trietanolamina) em shampoos<sup>13</sup> e conservante metildibromo glutaronitrilo com atividade alergênica clinicamente comprovada em produtos para o cuidado com a pele.<sup>14</sup> A aplicação do método baseado em QuEChERS para os conservantes de interesse deste trabalho foram estudados em algumas matrizes ambientais, tais como lodo de Estação de Tratamento de Água (ETA)<sup>15</sup> e sedimentos.<sup>16</sup>

\*e-mail: zamora@ufpr.br

Em função das características positivas desse método e sua baixa exploração na extração de compostos em matrizes cosméticas, este trabalho tem a finalidade de validar uma metodologia de extração de parabens e FE em matrizes cosméticas baseada no método QuEChERS, e aplicá-lo na análise de amostras de cosméticos comerciais.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes e insumos

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). Filtros de membrana Whatman® acetato de celulose ME 25/21 ST 0,45 μm, Ø=47 mm, foram empregados na etapa final do preparo de amostras, antes da injeção delas no sistema cromatográfico. Os padrões de alta pureza (≥ 99,0%) dos conservantes utilizados são de procedência Sigma-Aldrich®, sendo eles: 2-Fenoxietanol (FE), 4-hidroxibenzoato de metilo (MP), 4-hidroxibenzoato de propilo (PP).

### Equipamentos

As análises cromatográficas em fase líquida foram realizadas em equipamento Agilent 1260 Infinity, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), coluna C18 (ZORBAX Eclipse, 50 × 4,6 mm, 5 μm), pré-coluna C18 de mesma marca e *software* OpenLAB® CDS (EZChrom edition) versão A.04.05.

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

### Preparo das soluções estoque

Foram preparadas soluções estoque de cada um dos analitos na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> em metanol grau HPLC, pesando-se 10,00 mg dos padrões em balança analítica Mettler-Toledo XS205DU, e diluindo-os em 10,00 mL de metanol grau HPLC. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração a -4 °C.

### Método de fortificação das amostras

A partir das soluções estoque foram preparadas, com auxílio de micropipetas e balões volumétricos, soluções contendo concentrações intermediárias através de diluição em metanol, que posteriormente foram utilizadas para preparar as soluções trabalho diluídas em fase móvel. A partir dessas soluções de trabalho, com auxílio de micropipetas, as amostras foram fortificadas visando atingir a concentração desejada, e posteriormente homogeneizadas durante 1 minuto em um agitador Vortex.

### Método baseado em QuEChERS

Objetivando a extração dos conservantes e o *clean up* das amostras, estabeleceu-se um método baseado em QuEChERS para o preparo de amostra.

A etapa de otimização do procedimento QuEChERS consistiu na avaliação univariada dos parâmetros solvente de extração (acetonitrila, metanol, acetona, acetonitrila/acetona e acetonitrila/

metanol) e de sorvente de *clean up* (PSA, C18, Florisil®, C18+PSA e C18+Florisil®). Os parâmetros foram avaliados pelos valores de recuperação e pelo coeficiente de variação na análise de 3 cosméticos isentos dos conservantes de interesse, sendo um gel de limpeza, um creme hidratante e um sabonete líquido, que foram fortificados com soluções padrão conforme descrito anteriormente.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico foi utilizado um gel de limpeza facial comercial isento dos analitos de interesse (amostra branco). Essa amostra foi fortificada com soluções padrão conforme descrito anteriormente. A etapa de extração consistiu em pesar 100 mg de amostra em um tubo cônico de polipropileno de 15 mL, onde então foi adicionado 4,00 mL de água ultrapura e 4,00 mL de acetona (solvente extrator), após homogeneização por agitação manual por 30 segundos, foi adicionado uma mistura de sais (0,8 g de MgSO<sub>4</sub> e 1,5 g NaCl) e seguiu-se então agitação em vortex por 1 min e centrifugação por 15 min a 4400 rpm. Na etapa de *clean up*, 1,00 mL do extrato obtido anteriormente foi transferido para outro tubo cônico de polipropileno de 15 mL contendo 100,0 mg de MgSO<sub>4</sub> e 50,0 mg de sorvente amina primária-secundária (PSA), então o tubo foi agitado em vortex por 1 min e seguiu para centrifugação por 15 min a 4400 rpm. Após a etapa de limpeza, uma alíquota de 250 μL do extrato foi transferido para um vial de 2 mL, seco sob gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), e então o extrato seco foi reconstituído em fase móvel (35% MeOH e 65% H<sub>2</sub>O) até o volume de 1,00 mL. Uma alíquota de 200 μL foi transferida para outro vial de 2,0 mL e diluída até o volume de 1,00 mL. As amostras foram filtradas em filtros de acetato de celulose de 0,45 μm, e seguiram para injeção no sistema HPLC-DAD. O procedimento está ilustrado na Figura 1.

### Análise cromatográfica

Um modo de eluição gradiente baseado no método proposto por Zgoła-Grzeskowiak e colaboradores<sup>17</sup> foi desenvolvido para a determinação simultânea de todos os analitos, empregando-se MeOH:água (v/v), com uma composição inicial de 35% de metanol, aumentando até 60% até 13 min, e retornando linearmente à condição inicial até 23 min. Foram injetados 50 μL de amostra, sob vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup> à temperatura de 25,0 °C.

### Validação do método

A validação do método foi realizada em termos de seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.<sup>18,19</sup> Todos os parâmetros foram obtidos utilizando a técnica de sobreposição de matriz, utilizando-se como amostra branco um gel limpador facial comercial isento dos analitos de interesse, que foram fortificados conforme descrito anteriormente. A composição desta amostra de acordo com o fabricante, seguiu a nomenclatura dos ingredientes normatizada pelo INCI (*International Nomenclature Cosmetic Ingredients*), sendo a seguinte: Aqua, Sodium Laureth Sulfate, PEG-8, Coco-Betaine, Hexylene Glycol, Sodium Chloride, PEG-120 Methyl Glucose Dioleate, CI19140/Yellow 5, CI42043/Green 3, Glycerin, Glycolic Acid, Triethanolamine, Salicylic Acid, Sodium Benzoate, Sodium Hydroxide, Dipotassium Glycyrrhizate, Caprylyl Glycol, Capryloyl Salicylic Acid, Citric Acid, Butylene Glycol, Parfum.

Além das informações fornecidas pelo fabricante (ingredientes e publicidade “livre de parabens”), a análise por cromatografia líquida indicou a ausência de picos cromatográficos com tempo de retenção iguais aos conservantes estudados.

### Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas dos extratos de amostras branco com os extratos das



**Figura 1.** Esquema do procedimento do método de extração e limpeza baseado em QuEChERS

amostras branco fortificadas com solução padrão de MP, PP e FE na concentração de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os parabenos e  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  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 do tempo de retenção das espécies de interesse na amostra branco em relação ao cromatograma da solução padrão do analito.

#### Linearidade

Foram avaliadas duas curvas analíticas em triplicata, uma na faixa de concentração de  $0,10$  a  $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os parabenos e outra na faixa de concentração de  $1,50$  a  $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o fenoxietanol (padrões preparados na proporção inicial da fase móvel, metanol:água 35:65 (v/v)). Os analitos foram monitorados por detecção no ultravioleta por DAD nos comprimentos de onda:  $254 \text{ nm}$  (para o MP e PP), e  $270 \text{ nm}$  (para o FE). A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação da curva analítica.<sup>17</sup>

#### Exatidão

Os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados seguindo as recomendações da ANVISA.<sup>19</sup> A exatidão do método desenvolvido foi avaliada através do cálculo do fator de recuperação fortificando-se as amostras em 3 níveis de concentração ( $n=5$ ), e utilizando-se a média das recuperações em cada concentração para o cálculo da exatidão.

#### Precisão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O estudo de precisão do método desenvolvido foi feito por ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. As amostras foram fortificadas com solução padrão dos analitos em 3 níveis de concentrações ( $n=5$ ) e a precisão foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variância (CV). 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. O LD é calculado como  $(3,3s)/S$  e o LQ como  $(10s)/S$ , sendo  $s$  o desvio do coeficiente linear da equação e  $S$  é o coeficiente angular da curva analítica.<sup>18</sup>

#### Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio do teste de Youden, empregando-se amostras fortificadas 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 1, realizando-se 8 ensaios em duplicata seguindo o planejamento fatorial

**Tabela 1.** Fatores avaliados no teste de robustez do método QuEChERS com determinação por HPLC-DAD

	Fator	Nominal	Varição
A	T coluna ( $^{\circ}\text{C}$ )	25	27
B	% MeOH inicial	35	36
C	fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	1	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 <sub>4</sub> (mg)	100	105

característico do teste de Youden,<sup>18,20</sup> utilizando-se a recuperação dos conservantes como resposta monitorada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização do método baseado em QuEChERS

Para o estabelecimento do método QuEChERS na extração dos analitos em amostras de interesse cosmético, foram avaliados parâmetros de maneira univariada, buscando otimizar o tipo de solvente usado na etapa de extração e do sorvente usado na etapa de *clean up*. As condições de tempo de agitação e centrifugação não foram alteradas durante o estudo, assim como a etapa de partição, na qual foi estabelecida a quantidade mínima de sais necessária para a partição dos solventes na etapa de extração de maneira reproduzível ( $0,8 \text{ g}$  de MgSO<sub>4</sub> e  $1,5 \text{ g}$  de NaCl). Os testes realizados com o emprego de diferentes solventes são apresentados na Tabela 2, contendo os valores de recuperação média e o coeficiente de variação para cada um dos 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 de 3 diferentes matrizes cosméticas isentas dos conservantes de interesse, 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.

Apesar do método QuEChERS original utilizar acetonitrila como solvente de extração, foi escolhido a acetona como solvente extrator com base nos resultados obtidos, pois forneceu os melhores valores de recuperação, e os menores valores de coeficiente de variação para todos os analitos. Além disso, acetona é facilmente volatilizada sob fluxo de N<sub>2</sub>, o que representa uma vantagem adicional do seu uso.

**Tabela 2.** Valores médios de recuperação (%) e CV (%) para os solventes utilizados na etapa de extração do método baseado em 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

**Tabela 3.** Valores médios de recuperação (%) e CV (%) para os sorventes utilizados na etapa de limpeza do método baseado em 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

Na Tabela 3 são mostrados os resultados em relação ao estudo para a escolha do sorvente da etapa de *clean up*. Foram avaliados os sorventes PSA, C18 e Florisil®, além da combinação binária entre os mesmos.

Para a etapa de *clean up* foi escolhido como sorvente o PSA, devido a seus valores satisfatórios de recuperação e baixos valores de CV para todos os analitos. Além disso, o uso de apenas um tipo de sorvente simplifica o procedimento experimental e diminui o custo do método empregado. Mesmo com a combinação C18+Florisil® apresentando melhores valores para a recuperação do MP e PP, o CV obtido para FE foi elevado (Figura 2) em comparação à utilização de apenas PSA, o que pode indicar que esse sorvente sofre maior influência das diferentes matrizes cosméticas utilizadas neste estudo. A C18 e o Florisil® individualmente apresentaram elevados valores de CV, indicando que esses sorventes não foram adequados para as diferentes matrizes cosméticas.

As matrizes cosméticas apresentam uma grande diversidade de compostos, incluindo compostos polares (por exemplo, ácidos orgânicos e álcoois) e apolares (como óleo mineral e outros compostos gordurosos). O PSA apresenta um efeito quelante, isso resulta em

uma boa retenção de ácidos graxos livres, além de compostos polares presentes na matriz,<sup>21</sup> fato que explica os bons resultados obtidos e demonstra sua versatilidade para a limpeza de amostras cosméticas. O PSA já foi utilizado na etapa de limpeza na análise alcaloides em cosméticos herbais e 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.<sup>22</sup>

#### Condições cromatográficas, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

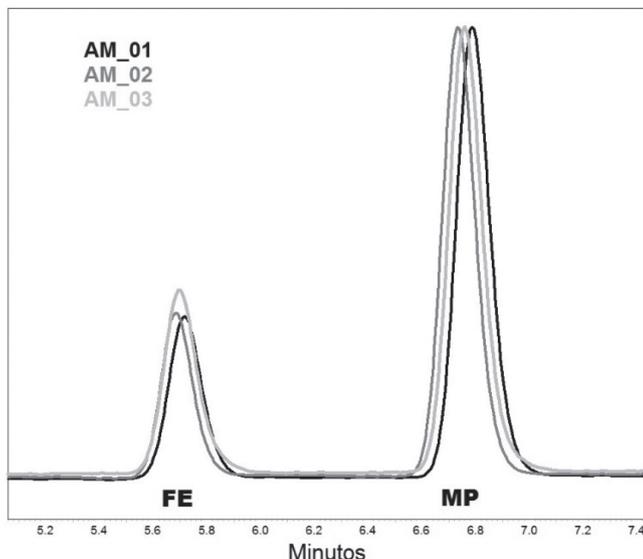
Foi estabelecido um modo de eluição por gradiente empregando-se MeOH:água, que foi otimizado de maneira obter resolução adequada para todos os analitos mantendo-se um tempo de corrida menor que 12 minutos. O tempo de retenção para cada analito foi de 3,53 minutos para o FE, 4,34 minutos para o MP e 10,80 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. A seletividade do método foi comprovada pela ausência de interferentes coeluinto com os analitos, conforme mostra a Figura 3.

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.<sup>23</sup> Os testes posteriores mostraram uma linearidade satisfatória para esse analito nos comprimentos de onda especificados.

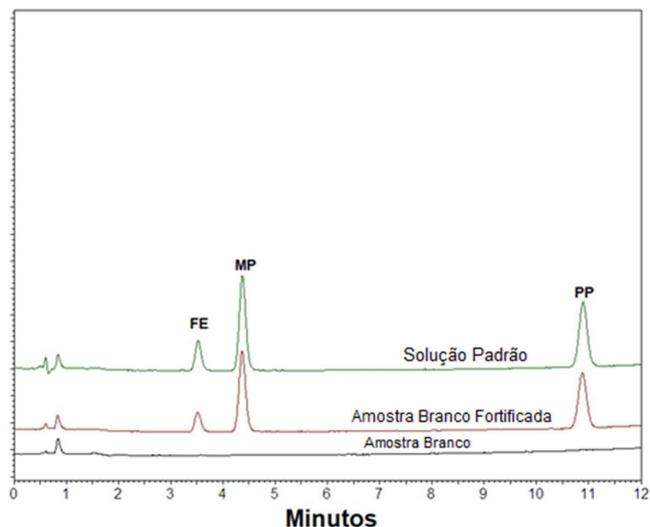
A linearidade foi avaliada para as curvas analíticas obtidas para cada composto de interesse, assim como a sensibilidade, que foi estimada a partir do coeficiente angular do ajuste linear das curvas obtidas. A faixa de concentração estudada foi de 0,10 a 2,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os parabenos e de 1,50 a 6,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o FE. Os parâmetros obtidos para as curvas de cada analito são apresentados na Tabela 4. O LD e LQ foram estabelecidos e os valores de concentração estão de acordo com a faixa linear estudada.

#### Precisão e exatidão

A repetibilidade foi avaliada a partir de cinco replicatas em três níveis de concentração, enquanto que a precisão intermediária foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade, realizados em dias



**Figura 2.** Destaque do início da corrida cromatográfica das amostras cosméticas após procedimento de extração e limpeza baseado em QuEChERS empregando-se C18+Florisil® como sorvente



**Figura 3.** 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

**Tabela 4.** 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	-0,0960	-0,139
Coefficiente angular (b)	0,475	5,756	5,170
Coefficiente de Determinação ( $R^2$ )	0,997	0,999	0,999
Coefficiente de Correlação (r)	0,998	0,999	0,999
LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,392	0,0180	0,00360
LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,188	0,0546	0,0108

distintos. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5 os coeficientes de variação obtidos foram menores que 10%, estando dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA ( $CV < 15\%$ ).

A exatidão foi avaliada em termos de fator de recuperação (Tabela 5), em ensaios envolvendo três níveis de concentração e cinco replicatas. Os valores de recuperação flutuaram entre 93,77% e 108,13%, o que se mostra concordante com o preconizado pela ANVISA (80% a 120%).

### Robustez

A robustez do método cromatográfico foi avaliada através do teste de Youden, utilizando-se o teste de comparação das variâncias (teste F). Uma vez que os valores de  $F_{\text{calculado}}$  foram maiores que os valores de  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{tabelado}} = 15,44$ ) se admite que não há diferença significativa entre as variâncias dos ensaios na condição nominal e na condição da variação (Tabela 6), o que indica boa robustez do

**Tabela 6.** Valores obtidos pelo teste F para avaliação da robustez do método QuEChERS-HPLC-DAD

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

A/a: temperatura da coluna ( $^{\circ}\text{C}$ ); B/b: concentração de MeOH inicial; C/c: fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ ); D/d: tempo de vortex (min); E/e: tempo de centrifuga (min); F/f: massa de PSA (mg); G/g: massa de  $\text{MgSO}_4$  (mg).

**Tabela 5.** Resultados da avaliação da precisão e da exatidão do método QuEChERS-HPLC-DAD

Analito	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Precisão		Exatidão (%) (n=5)
		Repetibilidade	Precisão Intermediária	
		CV(%) (n=5)	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

método. O teste de Youden também permite avaliar a significância dos efeitos provocados pelas variações deliberadamente introduzidas, observando-se, neste caso, efeitos pouco significativos.

### Análise de amostras cosméticas comerciais pelo método QuEChERS-HPLC-DAD

Após otimização do procedimento de extração (QuEChERS) e validação do método HPLC-DAD, foram analisados 9 produtos cosméticos comerciais comprados em lojas da região de Curitiba, 8 hidratantes de diferentes marcas e finalidades (cosméticos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9) e 1 gel de limpeza facial (cosmético 5), sendo quatro produtos analisados em triplicata e cinco produtos analisados em duplicata. Em todos os casos, os valores de concentração encontrados estão abaixo dos limites máximos estabelecidos pela ANVISA (Tabela 7).

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, cujo maior valor encontrado foi de 0,09%, sendo que o limite individual estabelecido é de 0,4%. Mesmo quando considerando a mistura dos parabens (limite de 0,8%), todos os cosméticos mostraram valores abaixo do limite estabelecido, sendo que o maior valor obtido foi igual a 0,25%, apresentado por uma loção hidratante (cosmético 6). No caso dos analitos não detectados (ND), os dados obtidos corroboram com informações de formulação apresentadas nos rótulos.

Embora os produtos cosméticos não tragam em sua embalagem os valores exatos de concentração de cada composto de sua formulação, os ingredientes são dispostos em ordem decrescente de concentração. Assim, comparando-se os valores obtidos pelo método desenvolvido com o rótulo desses produtos, em todos os casos, a ordem de

**Tabela 7.** Valores de concentração de conservantes  $\pm$  desvio padrão das quantificações em amostras cosméticas comerciais obtidos pelo método QuEChERS-HPLC-DAD

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 $\pm$ 0,41	0,39	1,97 $\pm$ 0,08	0,17	0,96 $\pm$ 0,02	0,08
2	3	2,80 $\pm$ 0,14	0,24	0,38 $\pm$ 0,02	0,03	<LQ	<LQ
3	3	4,78 $\pm$ 0,04	0,38	1,95 $\pm$ 0,14	0,16	1,06 $\pm$ 0,08	0,08
4	3	3,94 $\pm$ 0,28	0,33	1,97 $\pm$ 0,24	0,16	0,96 $\pm$ 0,11	0,08
5	2	ND	ND	2,26 $\pm$ 0,01	0,17	ND	ND
6	2	4,42 $\pm$ 0,99	0,37	2,05 $\pm$ 0,26	0,17	1,03 $\pm$ 0,12	0,09
7	2	ND	ND	1,19 $\pm$ 0,02	0,09	ND	ND
8	2	5,39 $\pm$ 0,60	0,40	0,82 $\pm$ 0,03	0,06	0,13 $\pm$ 0,01	0,009
9	2	ND	ND	1,45 $\pm$ 0,01	0,11	0,53 $\pm$ 0,07	0,04

\*ND = não detectado. Cosmético 1, 3, 4, 6, 7, 8 e 9: loção desodorante hidratante de diversas marcas e finalidades; Cosmético 2: hidratante infantil, Cosmético 5: gel de limpeza facial.

concentração obtida estava de acordo com o descrito no rótulo do produto comercial.

## CONCLUSÃO

O método de preparo de amostra baseado em QuEChERS se mostrou adequado, apresentando grande potencialidade de aplicação na extração e *clean up* de amostras cosméticas. 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), assim como uma precisão (repetibilidade e precisão intermediária) compatível com as normas nacionais ( $CV\% < 10\%$ ) em todas as concentrações avaliadas. As taxas de recuperação foram de 93,77% a 108,13%, indicando uma boa exatidão. A aplicação do teste de Youden indicou uma boa robustez do método proposto para a determinação dos conservantes. O método QuEChERS-HPLC-DAD foi testado em amostras cosméticas comerciais, encontrando-se concentrações inferiores ao limite máximo estabelecido pela ANVISA, em todos os casos. Além disso, o método proposto corrobora com as informações prestadas nos rótulos dos produtos, em relação a quantidade relativa (quando presentes) e a ausência dos conservantes estudados nas amostras.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Informações adicionais sobre os ingredientes majoritários dos cosméticos analisados neste trabalho, de acordo com o fabricante, estão disponibilizadas em <http://quimicanova.sbq.org.br/>, em formato PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Ao PPGQ/UFPR, ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Ocaña-Gonzalez, J. A.; Villar-Navarro, M.; Ramos-Payán, M.; Fernández-Torres, R.; Bello-López, M. A.; *Anal. Chim. Acta* **2015**, 858, 1.

- Troutman, J. A.; Rick, D. L.; Stuard, S. B.; Fisher, J.; Bartels, M. J.; *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, 73, 530.
- Kim, T. H.; Kim, M. G.; Kim, M. G.; Shin, B. S.; Kim, K. B.; Lee, J. B.; Paik, S. H.; Yoo, S. D.; *Talanta* **2015**, 144, 29.
- Sasseville, D.; Alfalah, M.; Lacroix, J. P.; *Dermatitis* **2015**, 26, 254.
- Cabaleiro, N.; De La Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I.; *Trends in Analytical Chemistry* **2014**, 57, 34.
- Cabaleiro, N.; De La Calle, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I.; *Anal. Methods* **2013**, 5, 323.
- Jain, R.; Mudiam, M. K.; Chauhan, A.; Ch, R.; Murthy, R. C.; Khan, H. A.; *Food Chem.* **2013**, 141, 436.
- Anastassiades M.; Lehotay S. J.; Stajnbaher D.; Schenck F. J.; *JAOC Int.* **2003**, 86, 412.
- Socas-Rodríguez, B.; González-Sálamo, J.; Herrera-Herrera, A. V.; Rodríguez-Delgado, M. A.; *Compr. Anal. Chem.* **2017**, 319.
- Homem, V.; Silva, J. A.; Cunha, C.; Alves, A.; Santos, L.; *J. Sep. Sci.* **2013**, 36, 2176.
- Correia, P.; Cruz, A.; Santos, L.; Alves, A.; *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, 35, 299.
- Wittenberg, J. B.; Zhou, W.; Wang, P. G.; Krynitsky, A. J.; *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1359, 140.
- Abedi, G.; Talebpour, Z.; *Anal. Methods* **2017**, 9, 5165.
- Faré, F.; Cas, M. D.; Arnoldi, S.; Casagni, E.; Visconti, G. L.; Parnisari, G.; Bolchi, C.; Pallavicini, M.; Gambaro, V.; Roda, G.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2018**, 120, 1700525.
- Cerqueira, M. B. R.; Guilherme, J. R.; Caldas, S. S.; Martins, M. L.; Zanella, R.; Primel, E. G.; *Chemosphere* **2014**, 107, 74.
- Carmona, E.; Andreu, V.; Pico, Y.; *Sci. Total Environ.* **2014**, 484, 53.
- Zgoła-Grzeźkowiak, A.; Werner, J.; Jeszka-Skowrona, A. M.; Czarczyńska-Goślińska, B.; *Anal. Methods* **2016**, 8, 3903.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
- Karageorgou, E.; Samanidou, V.; *J. Chromatogr. A* **2014**, 1353, 131.
- Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaipe, M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 1620.
- Xun Z.; Liu D.; Huang R.; He S.; Hu D.; Guo X.; Xian Y.; *J. Sep. Sci.* **2017**, 40, 1966.
- Borremans, M.; Van Looc, J.; Roos, P.; Goeyens, L.; *Chromatographia* **2004**, 59, 47.

