



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
Departamento de Química Analítica**

# **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM  
ANTITRANSPIRANTES EMPREGANDO VOLTAMETRIA  
SOB ELETRODO DE DIAMANTE E CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

**Aluna: Francieli Cristiani Carreira  
Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath**

**Campinas**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP**

C232d	<p>Carreira, Francieli Cristiani . Determinação de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia líquida de alta eficiência / Francieli Cristiane Carreira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p style="text-align: center;">Orientadora: Susanne Rath.</p> <p style="text-align: center;">Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Parabenos. 2. Voltametria. 3. Eletrodo de diamante dopado com boro. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

**Título em inglês:** Determination of parabens in antiperspirants using voltammetry on boron-doped diamond electrodes and high-performance liquid chromatography

**Palavras-chaves em inglês:** Parabens, Voltammetry, Boron-doped diamond electrodes, High-performance liquid chromatography

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:** Susanne Rath (orientadora), Lúcia Codognoto de Oliveira (UNIVAP-IPD), Jarbas José Rodrigues Rhohwedder (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 29/02/2008

*À minha família:  
pai, mãe, irmãos e vózinha....  
Muito obrigada por mesmo de tão longe,  
estarem sempre tão perto....  
Amo muitooooooooo todos vocês !!!!!!!*

## AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida;
- ❖ À Santa Rita de Cássia, por iluminar e proteger os meus caminhos;
- ❖ À minha “Vó Rosa”, pelo seu sorriso e pelos seus “cabelos brancos”.....
- ❖ À UNICAMP, pela tradição, oportunidade e pelo aprendizado;
- ❖ À minha orientadora Dra. Susanne Rath, por sempre ser mais que uma orientadora, pela amizade, compreensão, dedicação e entusiasmo. “...*Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só; sonho que se sonha junto, é realidade...*”. Obrigada por tudo!
- ❖ Ao Grupo de Toxicologia de Alimentos e Fármacos (GTAF), amigos e colegas de trabalho: Mônica, Jonas, Eduardo, Ricardo, Leandro, Gustavo, Keity, Camila, Marili, Socorro, Lucia, Dani...pelos momentos vividos e até por aqueles que os nossos compromissos tiraram de nós. Em especial, à Larissa, pela dedicação e por ter um pouco de você neste trabalho tão especial.
- ❖ A empresa T&E Analítica, sou grata pela oportunidade, pelo aprendizado e espaço físico concedido para que parte deste trabalho acontecesse. À equipe T&E, por aqueles que jamais serão esquecidos e até pelos que simplesmente serão lembrados. Em especial, agradeço ao *Flávio Leite* pela confiança, amizade, apoio, aprendizado e compreensão. “...assim, tudo fica mais fácil e com aquele quindim, hummm....melhor ainda...”
- ❖ À minha segunda “Famiglia”, por este jeito italiano de ser tão especial, pelos almoços de domingo e, acima de tudo, pela alegria contagiante de sempre...Em especial, às “nenéns” mais lindas que já conheci: Carol, Sofia, Bruna e Maria Luiza (...obrigado por ser a minha “afilhada preferida”!!!!!!!!!!!!!!).
- ❖ Às amigas de ontem, hoje e sempre Gláucia, Carolina, Cristiane, Talita, Patrícia e Mariana. Vocês são eternas!
- ❖ E a todos que não foram citados, por terem sido tão importantes quanto às pessoas “mais” lembradas.

*Ao meu amor, Marco:*

*“De tudo na vida,  
ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que precisamos continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...”*

*Portanto, devemos:  
Fazer da interrupção um novo caminho...  
Da queda um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...”*

Fernando Pessoa

*Amo amar você !!!!!*

*29 de fevereiro do ano bissexto (2008)*

## **CURRICULUM VITAE**

### **Francieli Cristiani Carreira**

Rua João Miguel Alves, 69 - Barão Geraldo - 13084-781 – Campinas - SP  
(19) 9214-4386 / 3203-8687 *e-mail: fccarreira@gmail.com*

### **Formação**

#### **Graduação**

Bacharelado em Química

*Universidade Estadual Paulista (UNESP)*

Araraquara – SP (2000 – 2003)

#### **Pós-Graduação**

*Mestrado em Química Analítica*

*Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)*

*Campinas – SP (2004 – 2008)*

### **Experiência profissional**

**Agosto/2000 - Dezembro/2003**

*Instituto de Química – UNESP*

*Laboratório de Materiais Fotônicos (LMF)*

**Fevereiro/2004- fevereiro /2008**

*Instituto de Química - UNICAMP*

*Grupo de Toxicologia de Alimentos e Fármacos  
(GTAF)*

**Abril/2004 - Janeiro/2005**

*Elken Química Ltda*

*Laboratório de Controle de Qualidade e  
Desenvolvimento*

**Janeiro/2005 – junho/2008**

*T&E Analítica – Centro Analítico e Científico*

*Laboratório de Desenvolvimento e Validação  
Analítica*

## **Resumo da experiência profissional**

- Desenvolvimento de projeto de iniciação científica envolvendo síntese e caracterização de sistemas vítreos e vitrocerâmicos condutores com aplicações tecnológicas;
- Utilização das técnicas: Difração de Raios-X, Análise Térmica, Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear e Impedância Complexa para caracterização dos materiais estudados;
- Desenvolvimento de produtos e aperfeiçoamento de processos relacionados à obtenção de resinas para a indústria de tintas, com caracterização dos intermediários e subprodutos das sínteses por HRGC;
- Desenvolvimento de projeto de mestrado relacionado à “Determinação de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)”.
- Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas envolvendo Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (HRGC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

## **Congressos e Eventos Científicos**

- XII Encontro Regional de Química da Sociedade Brasileira de Química  
Araraquara /SP – maio/2001
- XIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP  
Bauru/SP – out/2001
- XIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química  
Araraquara/SP – out/2002
- XIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP  
Presidente Prudente/SP – set/2002
- XV Congresso de Iniciação Científica da UNESP  
Marília/SP – out/2003
- XIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química  
São Carlos/SP – nov/2003
- 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química
- XXVI Congresso Latinoamericano de Química  
Salvador/BA – maio/2004

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM ANTITRANSPIRANTES EMPREGANDO VOLTAMETRIA SOB ELETRODO DE DIAMANTE E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Ésteres do ácido *p*-hidróxibenzóico, tais como metilparabeno (MePa), etilparabeno (EtPa) e propilparabeno (PrPa) são conservantes químicos amplamente empregados em cosméticos, fármacos e alimentos. Uma vez que estes compostos estão associados a alergias, dermatites e propriedades estrogênicas, faz-se necessário avaliar a concentração destas substâncias nas diferentes matrizes. A ANVISA estabelece para cosméticos uma concentração máxima de parabenos totais de 0,8 % m/m.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento eletroquímico dos parabenos no eletrodo de diamante dopado com boro e o desenvolvimento de um método voltamétrico para a determinação de MePa, EtPa e PrPa em antitranspirantes tipo *roll on*. As condições otimizadas do método voltamétrico foram: técnica voltametria cíclica; eletrólito suporte, tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; velocidade de varredura, 50 mV s<sup>-1</sup>. Nestas condições, os parabenos sofrem oxidação em 0,85 V versus Ag/AgCl, KCl sat. O processo é irreversível e controlado por difusão. Para a quantificação dos parabenos totais, as amostras foram preparadas usando a extração em fase sólida e na quantificação foi usada a hidroquinona como padrão interno. Para avaliar a exatidão do método proposto, os resultados obtidos na análise de amostras de antitranspirantes pelo método voltamétrico proposto foram comparados com aqueles obtido por cromatografia líquida de alta eficiência.

Todas as amostras analisadas (12 amostras de fabricantes diferentes) apresentaram um teor de parabenos totais menores do que 0,38 % m/m. Destas, 6 amostras não especificaram corretamente a presença dos parabenos nos rótulos.

**PALAVRAS CHAVE:** *Parabenos, voltametria, eletrodo de diamante dopado com boro (DDB), antitranspirantes.*

**ABSTRACT****DETERMINATION OF PARABENS IN ANTIPERSPIRANTS BY  
VOLTAMMETRY WITH DIAMOND ELECTRODE AND HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Esters of *p*-hydroxybenzoic acid, as methylparaben (MePa), ethylparaben (EtPa) and propylparaben (PrPa) have been widely used as chemical preservatives in cosmetics, drugs, foods, and others. As these compounds are linked with allergies, dermatitis and estrogenic properties, it is necessary to control the concentration of these substances in the different matrices. The ANVISA establish a maximum concentration of 0.8 % w/w of total parabens in cosmetics.

The aims of this work were the study of the electrochemical behavior of parabens on the boron-doped diamond electrode and the development of a voltammetric method for the determination of parabens in antiperspirants (roll-on). The optimized voltammetric conditions established were: cyclic voltammetry; supporting electrolyte, phosphate buffer 0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.0; scan rate, 50 mV s<sup>-1</sup>. At these conditions, the parabens undergo oxidation at 0.85 V versus Ag/AgCl, KCl sat. The process is irreversible and diffusion controlled. The sample preparation was carried out using solid phase extraction and the total paraben quantitation was done using hydroquinone as internal standard. The accuracy of the method was evaluated through comparison of results obtained from analyses of antiperspirants by the proposed voltammetric method with those obtained by high performance liquid chromatography.

All samples analyzed (12 samples of different manufactures) presented a content of total parabens lower than 0.38 % w/w. The presence of parabens in six samples was not correctly specified at the label.

**KEY WORDS:** *Parabens, voltammetry, boron-doped diamond (BDD) electrode, antiperspirants.*

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
PREFÁCIO	xxvii

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1. Antitranspirantes	3
I.2 Conservantes	4
I.2.1 Toxicologia	8
I.3 Aspectos de Legislação	11
I.4 Métodos analíticos para determinação de parabenos	12
I.4.1 Técnicas Voltamétricas	13
I.4.1.1 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD)	14
I.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	18
I.4.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)	24

## CAPÍTULO II – OBJETIVOS

### CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM ANTITRANSPIRANTES USANDO TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

III.1 Objetivos	31
III.2 Procedimento Experimental	31
III.2.1 Equipamentos	31
III.2.2 Reagentes	33
III.2.3 Padrões Analíticos	33
III.2.4 Preparo de soluções	33
III.2.5 Procedimentos	34
III.2.5.1 Otimização das condições eletroquímicas	34

III.2.5.1.1 Voltametria Cíclica (CV)	35
III.2.5.1.2 Estudos preliminares usando o eletrodo de diamante em uma cela em fluxo	35
III.2.5.2. Determinação de parabenos por voltametria cíclica	36
III.2.5.2.1 Curvas analíticas – Padronização interna	36
III.2.5.2.2 Preparo de amostras de antitranspirantes tipo <i>roll on</i> para determinação de parabenos por voltametria	37
III.3 Resultados e Discussão	38
III.3.1 Estudo do comportamento voltamétrico dos parabenos sobre o eletrodo de diamante dopado com boro usando voltametria cíclica	38
III.3.1.1 Estudo da influência do pH do meio	40
III.3.1.2 Estudo da influência da composição do eletrólito suporte	46
III.3.2 Desenvolvimento de método para a determinação de parabenos em antitranspirantes usando a voltametria cíclica	48
III.3.2.1 Efeito do padrão interno	49
III.3.2.2 Determinação de parabenos totais em amostras de antitranspirantes <i>roll on</i> por voltametria cíclica	56
III.3.3 Estudos preliminares usando o eletrodo de diamante em uma célula em fluxo	63

## **CAPÍTULO IV – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM ANTITRANSPIRANTES USANDO HPLC**

IV.1 Objetivos	71
IV.2 Parte Experimental	71
IV.2.1 Equipamentos	71
IV.2.2 Colunas Cromatográficas	72
IV.2.3 Cartuchos para Extração em Fase Sólida (SPE)	72
IV.2.4 Reagentes	73
IV.2.5 Padrões Analíticos	73
IV.2.6 Preparo das soluções estoque e de trabalho	73
IV.2.7 Procedimentos	74

---

IV.2.7.1 Otimização das condições cromatográficas	74
IV.2.7.1.1 Fase Móvel	74
IV.2.7.2 Determinação dos parabenos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	75
IV.2.7.2 Determinação dos parabenos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	75
IV.2.7.2.1 Curvas analíticas - Padronização interna	75
IV.2.7.2.2 Preparo de amostras de antitranspirantes tipo “roll on” para determinação de parabenos por cromatografia	76
IV.2.8 Validação do método para a determinação dos conservantes MePa, EtPa e PrPa em amostras de antitranspirantes tipo <i>roll on</i>	76
IV.2.8.1 Seletividade	76
IV.2.8.2 Linearidade	77
IV.2.8.3 Exatidão	77
IV.2.8.4 Precisão	78
IV.2.8.5 Limite de detecção e quantificação	78
IV.3 Resultados e Discussão	79
IV.3.1 Desenvolvimento do Método Cromatográfico	79
IV.3.1.1 Eficiência de extração dos parabenos nos cartuchos octadecil	82
IV.3.1.2 Validação de metodologia analítica	84

## **CAPÍTULO V - CONCLUSÕES**

V.1 Voltametria	93
V.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	95

## **CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS**

VI. REFERÊNCIAS	99
-----------------	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I.1</b> Aplicações do uso do eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) em compostos orgânicos.	17
<b>Tabela I.2a</b> Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em cosméticos.	19
<b>Tabela I.2.b</b> Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em cosméticos.	20
<b>Tabela I.2.c</b> Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em cosméticos.	21
<b>Tabela I.2.d</b> Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em cosméticos.	22
<b>Tabela I.2.e</b> Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em cosméticos	23
<b>Tabela III.1</b> Valores de pKa obtidos para os parabenos em estudo.	45
<b>Tabela III.2</b> Figuras de mérito obtidas para os parabenos utilizando CV	54
<b>Tabela III.3</b> Figuras de mérito obtidas para o metilparabeno por CV usando Hidroquinona como padrão interno.	55
<b>Tabela III.4</b> Composição química das amostras de antitranspirantes tipo <i>roll on</i> analisadas.	57
<b>Tabela III.5</b> Determinação de parabenos totais em amostras de antitranspirantes tipo <i>roll on</i> por HPLC e voltametria cíclica.	62
<b>Tabela IV.1</b> Descrição das condições cromatográficas avaliadas em relação a fase estacionária e composição da fase móvel.	74
<b>Tabela IV.2</b> Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos com as condições cromatográficas (A a G) descritas na Tabela IV.1.	80
<b>Tabela IV.3</b> Figuras de mérito obtidas para os parabenos utilizando HPLC.	87
<b>Tabela IV.4</b> Teores de parabenos nas amostras de antitranspirantes do tipo <i>roll on</i> .	88

## LISTA DE FIGURAS

- Figura I.1** Estrutura molecular dos parabenos mais utilizados em cosméticos. 6
- Figura III.1** Célula em fluxo em acrílico, usando o eletrodo de diamante como eletrodo de trabalho. 36
- Figura III.2** Voltamograma cíclico obtido para metilparabeno  $50 \text{ mg L}^{-1}$  sobre o eletrodo DDB. Eletrólito: tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 39
- Figura III.3** Dependência da corrente de pico com a variação da raiz quadrada da velocidade de varredura para metilparabeno ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ . 40
- Figura III.4** Voltamogramas cíclicos obtidos para o metilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 41
- Figura III.5** Voltamogramas cíclicos obtidos para o etilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 41
- Figura III.6** Voltamogramas cíclicos obtidos para o propilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 42
- Figura III.7** Voltamogramas cíclicos obtidos para o benzilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 42
- Figura III.8** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do metilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 43
- Figura III.9** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do etilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 44
- Figura III.10** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do propilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 44
- Figura III.11** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do benzilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq$  45

pH  $\leq$  12;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura III.12** Voltamogramas cíclicos (primeiro ciclo) obtidos para o Benzilparabeno ( $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), nos seguintes eletrólitos suporte, pH 7,0: (A) tampão fosfato  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ ; (B) tampão BR  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ ; (C) tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ; (D) tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 47

**Figura III.13** Voltamogramas cíclicos obtidos para o benzilparabeno ( $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, após sucessivas adições de  $100 \mu\text{L}$  de acetonitrila na cela eletroquímica. 48

**Figura III.14** Voltamograma cíclico obtido para a benzofenona ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo BDD, tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 50

**Figura III.15** Voltamograma cíclico obtido para a hidroquinona ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo BDD, tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . 51

**Figura III.16** Voltamograma cíclico da hidroquinona ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) na presença de metilparabeno ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 51

**Figura III.17** Correntes de pico MePa (padronização externa) e correntes de pico do MePa/hidroquinona (padronização interna) em função do número de varreduras. Voltamogramas registrados em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Concentração de metilparabeno:  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e hidroquinona:  $6 \text{ mg L}^{-1}$ . 52

**Figura III.18** Curva analítica para o metilparabeno, usando a hidroquinona ( $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) como padrão interno. Voltametria Cíclica, tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 53

**Figura III.19** Curva analítica para o metilparabeno sem padrão interno. Voltametria Cíclica, tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 54

**Figura III.20** Voltamogramas obtidos para o metilparabeno por voltametria cíclica, utilizando hidroquinona como padrão interno. Eletrólito suporte tampão fosfato, pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Concentrações de metilparabeno: (A) 2,0; (B) 4,0; (C) 6,0; (D) 8,0; (E) 10,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Concentração da hidroquinona:  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ . 56

**Figura III.21** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT 12. Eletrólito suporte: 5 mL tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); (2) Amostra + hidroquinona 6,0 mg L<sup>-1</sup>; (3) Amostra + hidroquinona + Metilparabeno (125  $\mu\text{L MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). 59

**Figura III.22** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT1, usando hidroquinona (6,0 mg L<sup>-1</sup>) como padrão interno. Eletrólito suporte: tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); Metilparabeno: (2) (3) e (4) alíquotas de 125  $\mu\text{L MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ . 60

**Figura III.23** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT 2, usando hidroquinona (6,0 mg L<sup>-1</sup>) como padrão interno. Eletrólito suporte: tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); Metilparabeno: (2) Metilparabeno: (2), (3) e (4) alíquotas de 125  $\mu\text{L MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ . 61

**Figura III.24** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT 3, usando hidroquinona (6,0 mg L<sup>-1</sup>) como padrão interno. Eletrólito suporte: tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); Metilparabeno: (2), (3) e (4) alíquotas de 125  $\mu\text{L MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ . 61

**Figura III.25** Fiagrama característico obtido para o propilparabeno em tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Potencial aplicado: 1,2 V. Propilparabeno: (1) 10 mg L<sup>-1</sup>. Vazão: 1,5 mL min<sup>-1</sup>. 64

**Figura III.26** (A) Fiagrama característico obtido para o propilparabeno (10 mg L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Potencial aplicado: 1,8 e 2,0 V. Propilparabeno: (1) 10 mg L<sup>-1</sup>. Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>. (A1): curva corrente versus número de injeções no potencial de 1,8 V e (A2) curva corrente versus número de injeções no potencial de 2,0 V. 65

**Figura III.27** Fiagrama característico obtido para o propilparabeno em tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Potencial aplicado: 1,2 V. Propilparabeno: (1) 5 mg L<sup>-1</sup>; (2) 10 mg L<sup>-1</sup>; (3) 15 mg L<sup>-1</sup>; (4) 20 mg L<sup>-1</sup>; (5) 25 mg L<sup>-1</sup>; (6) 20 mg L<sup>-1</sup>; (7) 15 mg L<sup>-1</sup>; (8) 10 mg L<sup>-1</sup>; (9) 5 mg L<sup>-1</sup>. Vazão: 1,5 mL min<sup>-1</sup>. 66

**Figura III.28** Curvas analíticas referentes ao fiagrama da Figura III.27. 67

**Figura III.29** Cromatograma característico para o metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e benzilparabeno, todos na concentração de 15

mg L<sup>-1</sup>. Detetor eletroquímico: eletrodo DDB. Coluna analítica: octadecil, fase móvel: tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 + acetonitrila (45:55 v/v). Vazão: 1,2 mL min<sup>-1</sup>; potencial: 1,2 V.

68

**Figura IV.1** Cromatograma obtido para os parabenos na concentração de 20,0 mg L<sup>-1</sup>, usando BePa 6,0 mg L<sup>-1</sup> como padrão interno. Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, v/v); vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ = 254 nm. Tempos de retenção (t<sub>r</sub>): MePa: t<sub>r</sub> = 5,9 min; EtPa: t<sub>r</sub> = 7,9 min; PrPa: t<sub>r</sub> = 11,4min ; BePa: t<sub>r</sub> = 17,1 min.

81

**Figura IV.2** Cromatograma obtido para os parabenos na concentração de 20,0 mg L<sup>-1</sup>, após extração em fase sólida, usando BePa 6,0 mg L<sup>-1</sup>. Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, v/v); vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ = 254 nm. Tempos de retenção (t<sub>r</sub>): MePa: t<sub>r</sub> = 5,8; MePa: t<sub>r</sub> = 7,7; PrPa: t<sub>r</sub> = 11,1; BePa: t<sub>r</sub> = 16,9.

83

**Figura IV.3** Cromatograma obtido para a amostra AT 4 após extração em fase sólida, usando BePa 6,0 mg L<sup>-1</sup>. Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, v/v); vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ = 254 nm. Tempos de retenção (t<sub>r</sub>): MePa: t<sub>r</sub> = 5,7; PrPa: t<sub>r</sub> = 11,2; BePa: t<sub>r</sub> = 17,1.

84

**Figura IV.4** Cromatogramas obtidos para (A) fenoxietanol e (B) 4-HBA, na concentração de 30,0 mg L<sup>-1</sup>. Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, v/v); vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; λ = 254 nm. Tempos de retenção (t<sub>r</sub>): (A) t<sub>r</sub> = 2,1 min; (B) t<sub>r</sub> = 1,3 min.

86

---

---

## PREFÁCIO

---

---

**A** dissertação versa sobre o estudo do comportamento eletroquímico de parabenos no eletrodo de diamante dopado com boro e desenvolvimento e a validação de um método voltamétrico para a determinação de parabenos em cosméticos, em particular, antitranspirantes do tipo *roll on*. Ainda, é apresentada a validação de um método de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de parabenos em antitranspirantes.

O que motivou o presente trabalho é a carência de informações sobre o controle de qualidade de produtos cosméticos no Brasil, assim como estudos publicados na literatura científica. Em adição, verifica-se uma tendência crescente na busca de novos materiais de eletrodos para aplicação eletroanalítica. Neste sentido tem se destacado o eletrodo de diamante, que por apresentar, entre outras características, uma larga janela eletroquímica de potencial em meio aquoso e não aquoso, baixa corrente de fundo, estabilidade em meios agressivos e baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido, tem despertado o interesse de eletroquímicos para seu uso em aplicações diversas.

Para facilitar a compreensão dos resultados e discussões desta dissertação, a mesma está apresentada em seis capítulos. O **Capítulo I** apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto. O **Capítulo II** discorre os objetivos propostos. O **Capítulo III** apresenta o desenvolvimento e validação do método voltamétrico para a determinação de parabenos em antitranspirantes, o **Capítulo IV** descreve a implantação e validação de um método de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de parabenos em antitranspirantes. Os dois últimos capítulos (**V** e **VI**) apresentam as conclusões obtidas e as referências bibliográficas que deram suporte ao trabalho desenvolvido.

# **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO**

# **I. INTRODUÇÃO**

## **I.1. Antitranspirantes**

No Brasil, a classificação de cosméticos, produtos de higiene, perfumes e outros de natureza e finalidade idênticas, está baseada nos artigos 3º e 26º da Lei 6.360/76 e artigos 3º, 49º e 50º, do Decreto 79094/77. Os grupos de produtos estão enquadrados em quatro categorias: produtos de higiene, cosmético, perfume e produto de uso infantil e classificados quanto ao grau de risco a que oferecem: grau 1 – produtos com risco mínimo e grau 2 – produtos com risco potencial. Os critérios para essa classificação foram definidos em função da finalidade de uso do produto, áreas do corpo abrangidas, modo de usar e cuidados a serem observados, quando de sua utilização (ANVISA, 2008).

De acordo com a definição conferida pela Legislação vigente, os Cosméticos, Produtos de Higiene e Perfumes (também chamados de produtos cosméticos) são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Os antitranspirantes são classificados na categoria de produtos de higiene, destinados a inibir ou diminuir a transpiração, podendo ou não conter corantes e perfumes, apresentadas em formas e veículos apropriados, bem como associados aos desodorantes. Os diferentes ativos preconizados para uso

como antitranspirantes e suas recomendações de uso são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério de Saúde do Brasil através da Resolução RDC nº 79, de 28 de agosto de 2000 (ANVISA, 2000).

Todos os produtos referidos como antitranspirantes são classificados como produtos de grau de risco 2, passíveis de registro, obedecendo as formalidades legais. A respeito da fisiologia da transpiração e mecanismos de ação dos antitranspirantes, COVINGTON (1996) acrescenta que o mecanismo de absorção através da pele está sujeito a fatores distintos, tais como: solubilidade do ativo, formulação, concentração, tempo de exposição, condições fisiopatológicas da pele, entre outros. A transpiração assume importante ação no mecanismo fisiológico relativo aos processos de regulação da temperatura corpórea (homeostase). Além disso, no suor foram encontradas elevadas concentrações de substâncias, tais como ácido láctico, uréia, aminoácidos e cloreto de sódio, às quais tem sido atribuídas propriedades no processo de hidratação natural. PAPA, 1967 propôs que, dentre as substâncias químicas mais utilizadas nos antitranspirantes estão a água, os sais de alumínio e seus complexos, fragrância, álcool etílico, silicone, EDTA, triclosano, butilidroxitolueno (BHT), álcool cetosteárico, glicerina, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno.

## **I.2 Conservantes**

Em uma formulação, cosmética ou produto de higiene, uma das maiores preocupações é a manutenção da estabilidade do produto em questão. Cada componente, ativo ou não, pode afetar a estabilidade do produto assim como

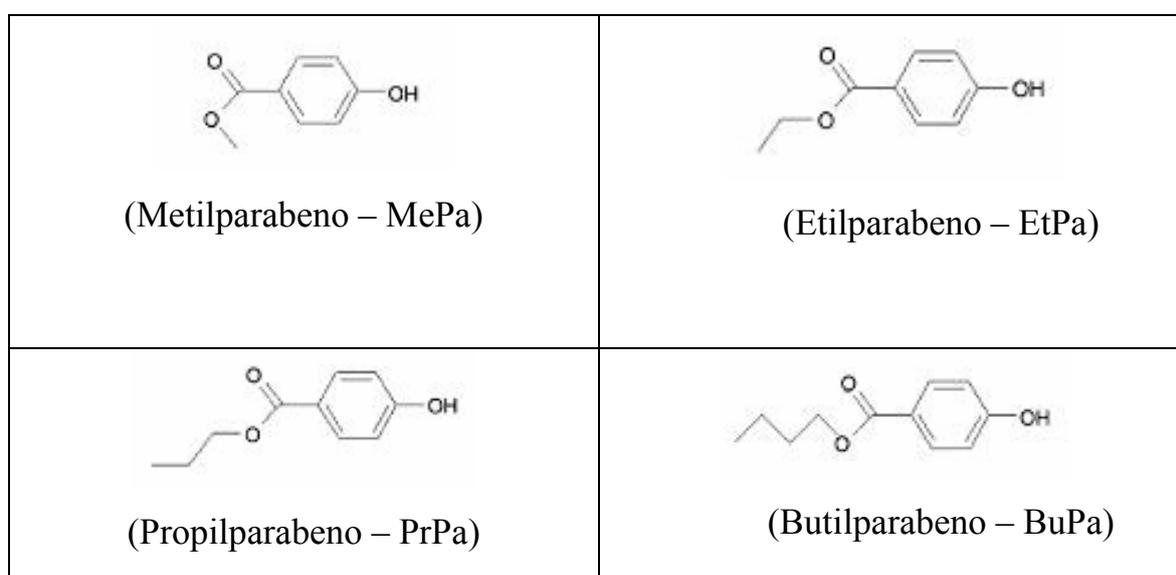
os processos relacionados à formulação, fabricação, acondicionamento, condições ambientais e transporte.

Nas formulações devem-se garantir três tipos de estabilidade: física – onde se prioriza a conservação das propriedades físicas originais do produto; química – relação com a integridade da estrutura química (teor de ingredientes utilizados) e a microbiológica, onde se prioriza conservar as características microbiológicas, conforme requisitos especificados. Os produtos cosméticos mais susceptíveis a contaminação são os que apresentam água em sua formulação (emulsões, géis, suspensões e soluções). A utilização de sistemas conservantes adequados e validados, assim como o cumprimento das boas práticas de fabricação (BPF), é necessária para a conservação adequada das formulações. Como o cumprimento das BPF atualmente é algo bastante comum na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos, o que pode sofrer grande variação é o tipo de sistema conservante utilizado (ANVISA, 2000).

Os conservantes químicos são substâncias que impedem, previnem ou retardam a deterioração de cosméticos, fármacos e alimentos por ação de microorganismos. A eficiência de um agente antimicrobiano, ou conservante, está relacionada a três fatores: efeito do pH, efeito do grau de dissociação do ácido ( $pK_a$ ) e ação específica do agente antimicrobiano. O nível inicial de contaminação microbiológica também é de grande relevância, uma vez que alguns conservantes, quando utilizados em baixas concentrações, podem ser metabolizados pelos microorganismos que eles deveriam inibir (ANTUNES & CANHOS, 1983).

Dentre os conservantes permitidos pela legislação brasileira e mais utilizados em produtos cosméticos, fármacos e alimentos, estão os ésteres do ácido *p*-hidróxibenzóico (parabenos, Figura I.1), tais como metilparabeno

(MePa), etilparabeno (EtPa), propilparabeno (PrPa) e butilparabeno (BuPa). Nos produtos cosméticos, podem ser encontrados em antitranspirantes, protetores solares, xampus, entre outros; nos fármacos, desde pomadas antifúngicas a comprimidos que regulam a pressão arterial e, nos alimentos, são encontrados em refrescos, enlatados de frutas e vegetais, geléias, frutas secas, molhos e outros.



**Figura 1.1.** Estrutura molecular dos parabenos mais utilizados em cosméticos.

Os parabenos possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, baixa toxicidade, baixa reatividade, são resistentes à hidrólises em aquecimento e resfriamento de água (autoclave), não-voláteis, têm baixa tendência de absorção em embalagens, não descolorem nem endurecem formulações, são incolores, inodoros, estáveis em mudanças de pH, biodegradáveis e tem custo reduzido (HANDA e cols, 2006). Os parabenos possuem um elevado coeficiente de partição óleo/água e a solubilidade em água diminui com o aumento do comprimento da cadeia no grupo éster

(DARBRE e cols, 2004). O potencial de absorção percutânea destes conservantes é influenciado pela distribuição de fases óleo/água das formulações e este potencial é frequentemente alterado pela adição de surfactante (OISHI, 2004).

Como ocorre com o ácido benzóico, os parabenos parecem apresentar maior atividade antimicrobiana na forma não-dissociada. A redução de pH de um produto cosmético, por exemplo, acarreta um aumento na proporção de moléculas não-dissociadas do ácido orgânico, que é responsável pela ação antimicrobiana dos conservantes. A não-dissociação destes compostos lipofílicos facilita a penetração das membranas celulares dos microorganismos, sobre os quais vai ser exercida ação inibitória do agente conservante. Sugere-se que estes ácidos lipofílicos inibam ou levam a morte os microorganismos, tanto pela alteração da permeabilidade das membranas celulares, quanto pela interferência em reações metabólicas essenciais para o crescimento e atividade celular (ANTUNES & CANHOS, 1983). Sua atividade antimicrobiana é diretamente proporcional ao comprimento da cadeia lateral e não aumenta com o abaixamento do pH na mesma intensidade que ocorre com os benzoatos. O pKa desses compostos situam-se em torno de 8 (JAY, 1992; SIMÃO, 1989; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Segundo RASTOGI e cols, 1995, em um estudo realizado com cremes comercializados na Suécia, foi observado que 10 % não possuíam alguns dos conservantes que estavam descritos nas embalagens e, em 17 % dos produtos avaliados, pelo menos um de nove conservantes não estavam declarados no rótulo. Em outro estudo, a Agência de Proteção Ambiental Dinamarquesa, iniciou um estudo semelhante ao citado anteriormente e, dentre os conservantes estudados, todos estavam presentes nas concentrações permitidas em cremes para a pele. De forma geral, 45 % dos cremes para a pele

investigados, possuíam alguma diferença entre o conteúdo e/ou tipo de conservantes na amostra e os descritos no rótulo.

Os métodos reportados para a determinação de parabenos em cosméticos, alimentos e fármacos são baseados, principalmente em Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (HRGC), Eletroforese Capilar (EC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), porém variações entre esses métodos são bastante comuns, principalmente quando consideramos diferentes formulações.

### ***1.2.1 Toxicologia***

Estudos realizados com animais têm mostrado que os parabenos são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e pelo sangue, hidrolisados a ácido  $\rho$ -hidroxibenzóico, conjugado e, finalmente, excretados pela urina (DARBRE e cols, 2004). Eles também podem permanecer intactos no organismo sendo, assim, acumulados nos tecidos do corpo de maneira similar aos outros poluentes lipofílicos que são bioacumulativos (BORREMANS e cols, 2004). A Associação Européia de Cosméticos e Perfumaria, COLIPA (*The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*), enfatizou que os parabenos são hidrolisados na pele e não atingem a corrente sanguínea.

OISHI, 2002 estudou diferentes concentrações (0 a 1 %) de PrPa em animais e concluiu que este conservante altera a função reprodutiva em ratos machos, incluindo redução da quantidade de esperma, diminuição da cauda do espermatozóide e dos níveis de testosterona e que a sua atividade estrogênica é semelhante a do composto 4-nonilfenol. Aos conservantes EtPa, PrPa e BuPa atribuiu atividade estrogênica 150.000, 30.000 e 10.000 vezes, respectivamente, inferior ao composto 17 $\beta$ -estradiol. GOLDEN e cols, 2005

avaliaram os efeitos da exposição do útero (humano e animal) a quantidades suficientes de parabenos e potentes compostos estrogênicos, tais como 17 $\beta$ -estradiol e concluíram que, devido aos diferentes potenciais estrogênicos destes compostos, não há base científica para afirmar que os parabenos podem causar efeitos adversos no desenvolvimento fetal.

Para avaliar o BePa como receptor estrogênico, Darbre e colaboradores (DARBRE e cols, 2003), estudaram linhagens de células humanas de câncer de mama, denominadas MCF7. O parâmetro avaliado foi o peso uterino de ratos imaturos. Doses de, no máximo, 100 ng de 17 $\beta$ -estradiol e quantidades de 3,3; 10; 33 e 100 mg de BePa foram consideradas em dois experimentos, avaliados durante três dias. Os resultados obtidos evidenciaram a atividade estrogênica do BePa (aumento do peso uterino de 33 mg), mas ressaltam que o aumento do peso uterino é significativamente maior na presença do estradiol.

Em 2004, Dabre e colaboradores mostraram que os parabenos não são mutagênicos, porém alguns estudos relatam que estes conservantes podem causar alterações cromossômicas, particularmente na presença de bifenilas policloradas (PCB). SHABIR (2004) atribuiu ao MePa a formação de adenocarcinomas (câncer de célula epitelial que tem origem na região de glândula) em ratos; o BuPa e PrPa (0,01 – 1,0 %, numa dieta de quatro semanas) são capazes de alterar a função reprodutiva em ratos; o EtPa foi considerado não teratogênico em concentrações acima de 10 % e o BePa (7,5 g/kg) por três dias proporcionou aumento do peso uterino.

Recentes descobertas destacam a atividade hormonal, mais especificamente a atividade estrogênica (atividade hormonal feminina) relacionada com o aumento de gene de expressão receptor de progesterona dos parabenos e questionam a sua toxicidade, uma vez o estrogênio é o maior fator de crescimento e desenvolvimento dos casos de câncer em seres humanos

(MASTEN, 2004). Estes conservantes têm sido encontrados em amostras de células humanas de câncer de mama, entretanto não há evidências que os cosméticos contendo estes conservantes sejam sinônimos de risco à saúde, uma vez que a penetração e acúmulo destes agentes antimicrobianos nos tecidos é pouco provável e, a concentração dos mesmos nos produtos em questão, está abaixo da concentração máxima permitida. A atividade estrogênica dos parabenos aumenta com o aumento do comprimento da cadeia lateral com ramificações no grupo alquil ester e a ordem de atividade do receptor estrogênico é a seguinte: benzil > butil > propil = etil > metil. O aumento da cadeia lateral diminui a solubilidade dos parabenos em água e, por isso, alguns destes conservantes podem ser acumulados nos tecidos do corpo de maneira similar a outros contaminantes lipofílicos que são considerados bioacumulativos (DARBRE e cols, 2004).

Os parabenos são usados como conservantes em desodorantes e antitranspirantes aplicados nas axilas e podem contribuir com o aumento da incidência de câncer de mama, uma vez que possuem atividade estrogênica e que contribuem com o aumento do gene de expressão receptor de progesterona (HARVEY & EVERETT, 2004).

Handa e colaboradores (2006) realizaram estudos *in vitro* com o MePa e concluíram que este conservante pode ser considerado seguro, mas pode provocar efeitos prejudiciais à pele humana quando exposta à luz do sol.

### I.3 Aspectos de Legislação

Para garantir a segurança dos consumidores, níveis de tolerância têm sido estabelecidos quanto à presença de antimicrobianos em diversas matrizes, tais como cosméticos, alimentos, fármacos, entre outros. Assim, para proteger a saúde humana dos efeitos adversos de antimicrobianos, agências reguladoras de cada país têm estabelecido limites para as substâncias autorizadas e utilizadas nas matrizes em questão.

No Brasil, a Lista de Conservantes Permitidos para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, é regulada pela ANVISA através da Resolução RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001, republicada no D.O. de 02/10/2001, que estabelece uma concentração máxima permitida para o ácido 4-hidroxibenzoico, seus sais e ésteres (parabenos) de 0,4 % (expresso como ácido) individual para um éster e 0,8 % (expresso como ácido) para misturas dos sais ou ésteres (ANVISA, 2001). Essa resolução é baseada na diretiva 76/768/EEC, anexo VI, parte 1, referência 12 da Comunidade Européia (European Communities, 1976).

A submissão às normas dessa resolução é de grande importância, já que há algum tempo sabe-se que os conservantes são substâncias biologicamente reativas (SCHNUCH, 1998).

Em 1984, foi estimado que os parabenos eram usados em 13200 formulações cosméticas e em 1995, de 215 produtos avaliados, 99 % continham parabenos em sua formulação (DARBRE e cols, 2004).

Entre os conservantes permitidos para cosméticos destacam-se o ácido benzoico, formaldeído, paraformaldeído, sulfitos e bissulfitos inorgânicos, clorobutanol, ácido fórmico, imidazolidinil uréia, 2-fenoxietanol, parabenos (sais e ésteres) e bronopol (BERGFELD e cols, 2005).

## **I.4 Métodos analíticos para determinação de parabenos**

A determinação quantitativa dos conservantes é do interesse e proteção do consumidor, uma vez que estudos atribuíram propriedades estrogênicas aos parabenos e que os mesmos estão entre os maiores causadores de alergias e dermatites de contato. Para garantir a qualidade de produtos cosméticos, alimentícios, fármacos, e outros, e assegurar a saúde do consumidor, é necessário que seja realizado o controle de qualidade dos produtos disponíveis no mercado. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar a presença de conservantes nas diferentes matrizes.

Embora as técnicas cromatográficas são as mais empregadas na determinação de parabenos, requerem um investimento inicial considerável e, em função disto, poucas indústrias no Brasil controlam seus produtos quanto aos limites de conservantes aceitos para produtos de higiene pessoal. Desta forma, novos métodos de análises para a determinação de parabenos são de grande interesse, principalmente se o custo for reduzido, envolverem menos etapas de preparo de amostra, e menor consumo de solventes, assim como também pouca manipulação das amostras.

Assim, as técnicas eletroanalíticas surgem com uma alternativa para a determinação destes conservantes, pois além de simples e de baixo custo, elas oferecem a possibilidade de se determinar a concentração do composto de interesse diretamente na amostra, sem pré-tratamentos ou separações prévias.

### ***1.4.1 Técnicas Voltamétricas***

As técnicas eletroanalíticas estão sendo cada vez mais utilizadas nas mais diversas áreas do conhecimento, com o objetivo de se obter informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, exemplificam algumas das aplicações das técnicas eletroanalíticas. Elas oferecem uma série de vantagens, tais como: seletividade das determinações resultantes do processo redox das espécies analíticas de interesse em função do potencial aplicado; seletividade decorrente dos processos redox do analito em eletrodo de trabalho feito com material específico; grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultante das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal que proporciona ambiente com baixo sinal de fundo (SKOOG e cols, 1998).

Considerando que processos redox totalmente irreversíveis são muito comuns em diversos tipos de compostos orgânicos contendo anéis aromáticos homocíclicos ou heterocíclicos com grupos ligantes, vale ressaltar as vantagens da voltametria de onda quadrada (SWV), tais como: elevada sensibilidade com limites de detecção que, para alguns sistemas, atinge valores de  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$  mol L<sup>-1</sup> (comparado às técnicas cromatográficas e espectroscópicas); ausência de restrições quanto aos sistemas irreversíveis, dispensa etapas prévias de tratamento ou preparação de amostras, tempo de análise e custos reduzidos.

Os parabenos são compostos fenólicos e a determinação eletroquímica de compostos fenólicos empregando eletrodos sólidos como platina, carbono vítreo, ouro e DDB apresentam problemas devido à perda de atividade da superfície ativa do eletrodo durante o processo de oxidação interferindo,

assim, nas análises eletroquímicas (GATTRELL & KIRK, 1993). Quando a oxidação de compostos fenólicos ocorre em eletrodos sólidos, é possível observar a formação de um filme polimérico impermeável e não reativo sobre a superfície do eletrodo (passivação). Este fenômeno representa um sério problema em análises eletroquímicas de fenóis, uma vez que bloqueia a transferência de elétrons comprometendo, assim, a precisão do método. No que diz respeito às aminas aromáticas, a polimerização eletroquímica dos filmes é considerada vantagem, uma vez que protege o eletrodo contra a corrosão e produz um filme polimérico eletroativo (GUENBOUR e cols, 2000). Além do emprego de eletrodos modificados para reduzir o fenômeno de envenenamento, foi verificado que o EDTA pode inibir processos de polimerização durante a determinação voltamétrica de catecolaminas (CARVALHO e cols, 2003; WINTER, 2007).

#### 1.4.1.1 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB)

O diamante é conhecido desde o ano 3.000 a.C. como um cristal misterioso, indestrutível e de brilho atraente, que sempre esteve associado à sorte, fidelidade, riqueza, ostentação, entre outras. Em 1772, o químico Lavoisier foi o primeiro a desvendar a sua composição e concluiu que o diamante era um composto unicamente de carbono (TEÓFILO, 2007).

O diamante é o melhor isolante natural, mas quando dopado com boro este material apresenta características de um semicondutor com boa condutividade ou filme quase metálico dependendo da concentração de dopagem utilizada (PREECHAWORAPUN e cols, 2006). A concentração do boro determina a resistência específica do filme de diamante (GANDINI e cols, 1999).

Desta forma, o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) tem despertado o interesse de eletroquímicos de todo o mundo, devido à superioridade de suas propriedades eletroquímicas em relação aos outros alótropos do carbono, como o carbono vítreo e o pirolítico (RAO & FUJISHIMA, 2000; FUJISHIMA & RAO, 2001). Este material apresenta várias propriedades atrativas, que incluem uma extensa janela eletroquímica de potencial em meio aquoso e não aquoso, alta estabilidade em meios agressivos, baixa corrente de fundo, estabilidade para algumas espécies redox sem pré-tratamentos, baixa adsorção de moléculas orgânicas polares e baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido (PREECHAWORAPUN *e cols*, 2006). SALAZAR-BANDA *e cols*, 2006 confirmam que pré-tratamentos catódicos asseguram alta condutividade na superfície do eletrodo que facilita a interação e adsorção de espécies eletroquímicas com esta superfície. Além disso, ressalta que um pré-tratamento de -3 V por 30 minutos leva a uma resposta eletroquímica totalmente reversível associada a um H-terminal na superfície e, portanto, que o H-terminal desempenha um importante papel na resposta eletroquímica do eletrodo. A grande janela eletroquímica, compreendida entre -2,5 V a +2,5 V *vs* Ag/AgCl, se deve ao fato deste eletrodo possuir altos sobrepotenciais para as reações de desprendimento de hidrogênio e oxigênio. Eletrodos de diamante oferecem vantagens sobre os eletrodos convencionais usados na eletroanalítica em termos de faixa linear, limite de detecção, tempo de resposta, precisão e estabilidade da resposta. Além disso, uma grande vantagem deste material frente aos eletrodos sólidos convencionais em eletroanalítica está em poder analisar compostos que apresentam alto potencial de bloqueio eletroquímico. Entre os diversos compostos analisados estão as determinações realizadas em dinucleotídeo nicotinamida adenina (NADH); análises diretas e simultâneas de ácido úrico, ácido ascórbico e dopamina; de

guaiacol e cloroguaiacol; análise direta de ácido úrico na presença de ácido ascórbico; determinação de histamina e serotonina e citocromo C e L-cisteína em meio alcalino (TEÓFILO, 2007).

A respeito do mecanismo de oxidação eletroquímica dos parabenos no eletrodo DDB, não há registro na literatura para maiores informações. OLIVEIRA e cols, 2007 discutem o mecanismo eletroquímico do benzeno no eletrodo DDB. Os autores verificaram que o benzeno sofre oxidação em meio ácido em 2,0 V *vs* Ag/AgCl e, como produtos formados foram identificados hidroquinona, benzoquinona e catecol.

Algumas aplicações do eletrodo DDB estão sumarizadas na Tabela I.1.

**Tabela 1.1** Aplicações do uso do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) em compostos orgânicos.

<i>Analito</i>	<i>Matriz</i>	<i>Técnica</i>	<i>Referência</i>
<i>Benzeno</i>	Benzeno	HPLC – UV (produtos de degradação); CV – DDB	OLIVEIRA e cols, 2007
<i>Sulfonamidas</i>	Ovo	HPLC-FIA (DDB)	PREECHAWORAPUN e cols, 2006
<i>Anilina</i>	Anilina	CV – DDB	SPATARU e cols, 2007
<i>Pentaclorofenol</i>	Solo	SWV (DDB ou Au-UME) HPLC (comparativo)	CODOGNOTO e cols, 2004
<i>Azida de Sódio</i>	Solução fisiológica	DDB	SUZUKI e cols, 2007
<i>Purina Pirimidina</i>	Salmão	HPLC com detecção amperométrica (CV – DDB)	IVANDINI e cols, 2007
<i>4 – nitrofenol</i>	Água	SWV – (DDB E HMDE)	PEDROSA e cols, 2004
<i>4 – clorofenol</i>	Água	SWV – (DDB)	PEDROSA e cols, 2003

### ***1.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)***

Como as formulações farmacêuticas são misturas complexas, muitos pesquisadores associaram a determinação de parabenos com outros compostos de interesse. De um modo geral, tão importante quanto à técnica escolhida, é o preparo de amostras desenvolvido para cada formulação estudada, que tem como fundamento eliminar interferentes e determinar a concentração dos analitos de interesse com exatidão e precisão satisfatórios.

Uma técnica ideal de preparo de amostra, que inclui extração, limpeza e concentração, deve apresentar facilidade no manuseio, baixo custo, ser compatível com a faixa de detecção do instrumento de análise e apresentar boa performance analítica, incluindo eficiência, seletividade e aplicabilidade para determinações simultâneas (PAWLISZYN, 1997).

A literatura preconiza alguns trabalhos empregando cromatografia líquida com detecção eletroquímica usando o eletrodo de diamante dopado com boro, tais como a análise de sulfas (sulfadiazina, sulfamerazina e sulfametazina), de clorofenóis em amostras ambientais e de pesticidas carbamatos (carbaril, carbofuram, metil 2-benzimidazolcarbamato, bendiocarbo) (TEÓFILO, 2007).

Nas Tabelas I.2a, I.2b, I.2c, I.2d e I.2e estão resumidos alguns métodos reportados na literatura para a determinação de parabenos e multicomponentes em cosméticos.

**Tabela I.2a** Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em produtos cosméticos.

<i>Analitos</i>	<i>Preparo de amostra</i>	<i>Método</i>	<i>FE</i>	<i>Fase Móvel ou eletrólito</i>	<i>Faixa Linear (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Referência</i>
2-fenoxietanol 1-fenoxipropan-2-ol MePa, EtPa, PrPa, BuPa, BePa	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 mol L <sup>-1</sup> ) LLE – Etanol:H <sub>2</sub> O (90:10, v/v) Isopropanol	HPLC- UV (254 nm)	C <sub>18</sub> Waters	H <sub>2</sub> O-ACN MeOH-THF (65:25:10:5 v/v/v)	5 – 200	BORREMANS e cols, 2004
MePa, EtPa, PrPa, BuPa	LLE – (éter: HAc 1%), ultrassom, evaporar fase orgânica, MeOH: fase móvel (1:4 v/v)	HPLC- UV (260 nm) e CE	C <sub>18</sub> Capilar 70 cm, 75 µm)	MeOH:(H <sub>2</sub> O-HAc 1%); Eletrólito: tampão tetraborato (15 mM, pH 9,2):MeOH (85:15, v/v)	1 – 40 5 – 200	LABAT e cols, 2000
MePa, PrPa	Extração: MeOH (2 -4 mL) Cartucho SCX Diluição: H <sub>2</sub> O	HPLC- UV (254 nm)	Fenil	Fase móvel A: tampão fosfato (0,025 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,8): ACN (80:20 v/v); Fase móvel B: tampão fosfato: ACN (20:80 v/v) gradiente	MePa: 130 – 240 PrPa: 150 – 270	REBBECK e cols, 2006

*LLE: Extração líquido-líquido; THF: tetraidrofurano; HAc: ácido acético; CE: eletroforese capilar.*

**Tabela I.2b** Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em produtos cosméticos.

<i>Analitos</i>	<i>Preparo de amostra</i>	<i>Método</i>	<i>FE</i>	<i>Fase Móvel ou eletrólito</i>	<i>Faixa Linear (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Referência</i>
MePa, EtPa, PrPa, BuPa, BePa	ACN ultrassom filtrar extrato com H <sub>2</sub> O (1:5 v/v)	CE (UV/DAD)	Capilar (31 cm, 75 µm)	Eletrólito: fosfato de amônio 5 mM, pH 3- 65 % ACN	5 – 50	ROSSI e cols, 2002
MePa, EtPa, PrPa, BuPa, BHA, BHT*, Acetato α-tocoferol α-tocoferol	Resfriar-4°C LLE – MeOH Evaporação com N <sub>2</sub>	SFE-LC-MS	C <sub>18</sub>	MeOH: H <sub>2</sub> O gradiente	10 – 2000	LEE e cols, 2006
MePa, EtPa, PrPa, BuPa	LLE -MeOH (triplicata) Ultrassom	CE (MEKC) (210 nm)	Capilar sílica fundida 58,5 cm	Tampão fosfato com 100 mM SDS e 1 % MeOH (pH 2,28) Temperatura capilar:35 °C	0,15-7,60	HE e cols, 2006

*LLE: Extração líquido-líquido; CE: eletroforese capilar; SFE: extração por fluido supercrítico; SDS – dodecil sulfato de sódio; LC: cromatografia líquida; MS: espectrometria de massas.*

**Tabela I.2c** Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em produtos cosméticos.

<i>Analitos</i>	<i>Preparo de amostra</i>	<i>Método</i>	<i>FE</i>	<i>Fase Móvel ou eletrólito</i>	<i>Faixa Linear (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Referência</i>
Vitaminas MePa PrPa	2 mL CHCl <sub>3</sub> Δ (75 °C, 20 min) ketoprofen (PI), filtrar	HPLC-UV (214 nm)	C <sub>18</sub>	MeOH : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,5) (65:35, v/v)	MePa:20 – 80 PrPa: 5 – 20	HAVLÍKOVÁ e cols, 2006
Guaiifenesina MePa PrPa	H <sub>2</sub> O:ACN (75:25, v/v) vortex; diluir (1:5 v/v); filtrar	HPLC- DAD (254 nm)	Synergi Polar-RP, Phenomenex	tampão fostato (pH 3,0): ACN (25:75 v/v) Eluente B: (MeOH): tampão fostato: MeOH (85:15 v/v)	MePa:20 – 60 PrPa: 5 – 15	GROSA e cols, 2006
Domperidona MePa PrPa	LLE – DMF HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> vortex; MeOH Centrífuga	HPLC-UV (280 nm)	C <sub>8</sub>	tampão acetato amônio (0,5 %): MeOH (40:60, v/v)	10 – 150	ALI e cols, 2006
Ácido Benzóico; MePa; PrPa	LLE – MeOH US (50 °C) Vortex; Filtrar	HPLC-UV (254 nm)	C <sub>18</sub>	MeOH: tampão acetato (pH 4,4) (50:50, v/v)	MePa:3 – 100 PrPa: 1 – 75	SAAD e cols, 2005

*PI: Padrão Interno. LLE: Extração Líquido-Líquido; CE: eletroforese capilar; SFE: extração por fluido supercrítico; SDS – docecil sulfato de sódio; DMF: Dimetilformamida; US: Ultrassom.*

**Tabela I.2d.** Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em produtos cosméticos.

<i>Analitos</i>	<i>Preparo de amostra</i>	<i>Método</i>	<i>FE</i>	<i>Fase Móvel ou eletrólito</i>	<i>Faixa Linear (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Referência</i>
Ftalatos MePa, EtPa, PrPa, BuPa	LLE – MeOH <i>Clean up</i> cartuchos C18 (SPE)	HPLC-DAD (230 nm)  GC-MS	C <sub>8</sub>  HP-5MS	MeOH: H <sub>2</sub> O  Hélio	Ftalatos: 10 – 100 Parabenos: 20 – 200	SHEN e cols, 2007
MePa, EtPa, PrPa, BuPa, BePa	LLE -Acetona PI: iso- propil parabeno	HPLC	-	-	100 – 8700	RASTOGI e cols, 1995
MePa, EtPa, PrPa, BuPa Multi componentes	LLE - THF: tampão fosfato (0,025 mol L <sup>-1</sup> , pH 3,5);vortex	HPLC-UV (220/240nm)	Hypersil BDS cyano- propyl	MeOH: fosfato de sódio monobásico (pH 3,5; 0,025 mol L <sup>-1</sup> ) (40:60, v/v)	0,9 – 160	SOTTOFATTORI e cols, 1998
MePa, EtPa, PrPa	LLE – fase móvel Filtrar	HPLC-UV (254 nm)	C <sub>18</sub>	tampão fosfato (pH 7,05): MeOH (47,5:52,5, v/v)	MePa: 2 – 14 EtPa, PrPa: 0,4 – 2,8	SHABIR e cols, 2004
MePa, PrPa Ácido Fenilfórmico Ácido 2,4 hexadienóico	LLE – fase móvel	HPLC-UV (254 nm)	C <sub>8</sub>	tampão acetato (pH 4,2): MeOH (65:35, v/v)	0,026 – 4,9	SHABIR e cols, 2006

*LLE: Extração Líquido-Líquido; SPE: extração em fase sólida.*

**Tabela I.2e** Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de conservantes em cosméticos.

<i>Analitos</i>	<i>Preparo de amostra</i>	<i>Método</i>	<i>FE</i>	<i>Fase Móvel ou eletrólito</i>	<i>Faixa Linear (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Referência</i>
MePa, PrPa Ranitidina	LLE – ACN em H <sub>2</sub> O, 10 % <i>Clean up</i> cartuchos Oasis HLB 3cc (SPE)	HPLC-UV (254 nm)	C <sub>18</sub>	Acetato de amônio (0,5 mol L <sup>-1</sup> ): ACN: MeOH (50:15:35, v/v/v)	MePa: 500 – 1300 PrPa: 125 – 325	KOKOLETSI e cols, 2005
MePa, EtPa, PrPa, BuPa	LLE – MeOH Ultrassom filtrar	HPLC-CL (254 nm)	C <sub>8</sub>	MeOH: H <sub>2</sub> O (60:40, v/v)	1,0 – 40,0	ZHANG e cols, 2005
MePa, PrPa Cloridrato Clorpromazine	Amostras são diluídas na fase móvel (20-200 vezes)	HPLC-UV (230 nm)	C <sub>18</sub>	tampão acetato (pH 4,5): MeOH: ACN (75:22,5:27,5 v/v/v)	MePa: 375 – 2250 PrPa: 50 – 300	KOLLMORGEN e cols, 1998
MePa, PrPa,	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> LLE -MeOH SPE: MeOH-H <sub>2</sub> O	HPLC	Fenil	A - 80 tampão fosfato (0,025 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,8):20 ACN v/v)	MePa: 1300 – 2400 EtPa: 150 – 270	YE e cols, 2006

*LLE: Extração Líquido-Líquido; SPE: extração em fase sólida.*

### ***1.4.3 Análises por Injeção em Fluxo (FIA)***

Sistemas de análise em fluxo, particularmente os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) têm sido utilizados principalmente para a mecanização/automação de análises químicas. Empregando estes sistemas é possível a implementação de todas as etapas envolvidas no processo de análise química (amostragem, separações, diluições, pré-concentrações, etc.). Entretanto, embora pouco explorados neste sentido os sistemas também apresentam grande potencialidade para a determinação de parâmetros físico-químicos, tais como coeficiente de difusão, viscosidade, capacidade complexante de ligantes, parâmetros cinéticos e estequiometria de reações (ROCHA e cols, 2000).

PREECHAWORAPUN e cols, 2006 propõe a determinação de sulfonamidas em ovo por sistema de injeção em fluxo acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com detecção amperométrica usando eletrodo de diamante dopado com boro.

Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a potencialidade do eletrodo de diamante em uma célula em fluxo, para verificar a possibilidade do uso do eletrodo de diamante em um detector eletroquímico (amperométrico) a ser acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

## **CAPÍTULO II – OBJETIVOS**

O objetivo geral do projeto foi estudar o comportamento eletroquímico de parabenos no eletrodo diamante dopado com boro e desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de parabenos em antitranspirantes tipo *roll on*.

Os objetivos específicos do projeto foram:

- Estudar o comportamento eletroquímico dos parabenos MePa, EtPa e PrPa no eletrodo de diamante, usando para tanto a voltametria;
- Avaliar a potencialidade do eletrodo de diamante em uma célula em fluxo, para verificar a possibilidade do uso do eletrodo de diamante em um detector eletroquímico (amperométrico) a ser acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.
- Desenvolver uma metodologia eletroanalítica para determinação dos parabenos totais em cosméticos (antitranspirantes tipo *roll on*);
- Otimizar e validar método usando HPLC para determinação dos parabenos MePa, EtPa e PrPa em antitranspirantes tipo *roll on*.
- Comparar os métodos HPLC e voltametria na determinação de parabenos em amostras de antitranspirantes tipo *roll on*;
- Analisar amostras de antitranspirantes e avaliar se os produtos estão em conformidade com a legislação vigente.

## **CAPÍTULO III**

### **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM ANTITRANSPIRANTES USANDO TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)**

### **III.1 Objetivo**

Este capítulo tem como objetivo estudar o comportamento eletroquímico dos parabenos MePa, EtPa e PrPa no eletrodo de diamante dopado com boro (BDD), usando para tanto a voltametria; desenvolver uma metodologia eletroanalítica para determinação dos parabenos em antitranspirantes tipo *roll on* e aplicar o método na determinação dos parabenos encontrados nas amostras comercializadas no Brasil.

### **III.2 Procedimento Experimental**

#### ***III.2.1 Equipamentos***

Para os estudos eletroquímicos foi utilizado o Potenciostato – Galvanostato AUTOLAB<sup>®</sup> PGSTAT 30 (ECO CHEMIE – Holanda) com sistema de 3 eletrodos: eletrodo de trabalho: DDB 8000 ppm; eletrodo de referência: Ag/AgCl, KCl<sub>sat</sub> e eletrodo auxiliar: platina. O eletrodo de diamante dopado com boro (8000 ppm) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis A. Avaca do Instituto de Química de São Carlos, IQSC / USP.

A aquisição dos dados e o gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador e mediante programa computacional GPES (Holanda). Para a realização dos experimentos foi utilizada uma cela de vidro Pyrex<sup>®</sup>, com capacidade de 10 mL, equipada com uma tampa em Teflon<sup>®</sup> contendo orifícios, para desoxigenação da solução com nitrogênio, e para posicionamento dos eletrodos.

Todas as soluções tiveram seus valores de pH ajustados com auxílio de um pH-metro da Digimed DM-20 e um eletrodo combinado de vidro também da Digimed – Instrumentação Analítica (Brasil). O sistema de eletrodo de vidro do pH-metro era diariamente calibrado com tampões comerciais de pH 4,0 e 7,0.

O banho de ultra-som USC 700 Unique Thorton (Brasil) foi utilizado no preparo de amostras e na degaseificação da fase móvel.

Para preparo de amostra foi utilizada uma centrífuga Excelsius II da Fanem (Brasil).

A extração em fase sólida (SPE) empregada no preparo de amostras foi realizada utilizando um sistema de vácuo da Alltech (EUA) com capacidade para 12 cartuchos.

Para as análises em fluxo foi empregada: uma bomba peristáltica Ismatec de quatro canais (EUA), um injetor proporcional em acrílico com uma alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$  e uma célula eletroquímica contendo o eletrodo de diamante como eletrodo de trabalho, fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência (esquema da célula apresentada na Figura III.1, pág. 31).

As determinações cromatográficas foram realizadas em um equipamento Waters (EUA), constituído de um sistema de bombas binárias (modelo 1525), detector de arranjo de diodos Waters 2996, injetor manual Rheodyne (modelo 7725) e alça de amostragem de 50  $\mu\text{L}$ . A aquisição dos dados foi realizada pelo programa computacional Millenium (Waters, EUA). Como fase estacionária foi empregada uma coluna X Terra RP 18 Microsorb-MV, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Waters, EUA) e coluna de guarda X Terra RP 18 Microsorb-MV, 20 x 3,9 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Waters, EUA).

### ***III.2.2 Reagentes***

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e no preparo de soluções utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (resistência 18,2 MΩ cm) (Millipore, EUA).

Foram utilizados: fosfato de sódio dibásico, ácido acético glacial, hidróxido de sódio, acetonitrila (ACN) e ácido sulfúrico da Merck (Alemanha). O ácido bórico foi da ACS (EUA), o acetato de sódio e o metanol (MeOH) da J. T. Baker (EUA) e o cloreto de potássio da Mallinckrodt (EUA).

### ***III.2.3 Padrões Analíticos***

Os padrões analíticos utilizados foram metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e benzilparabeno 99%, da Sigma (EUA) e a hidroquinona, da Merck (Alemanha).

### ***III.2.4 Preparo de soluções***

As soluções estoque dos conservantes de concentração 1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas separadamente e dissolvidas em acetonitrila. A hidroquinona (HQ) foi utilizada como padrão interno e a solução estoque de concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada em água. As soluções de trabalho na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> foram diluídas com água Milli Q e as soluções de concentração abaixo desta foram diluídas diretamente no eletrólito suporte.

Para as medidas eletroquímicas, foram testados os seguintes eletrólitos:

- tampão Britton-Robinson (BR), 0,10 mol L<sup>-1</sup>, 2 ≤ pH ≤ 12;

- tampão fostato, 0,010 e 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0;

Os valores de pH dos eletrólitos foram ajustados com NaOH ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>.

### ***III.2.5 Procedimentos***

#### ***III.2.5.1 Otimização das condições eletroquímicas***

Para a realização dos experimentos os eletrodos de DDB novos (sem uso) foram inicialmente submetidos a um tratamento anódico (polarização à +3,0 V vs Ag/AgCl por 10 min) para a remoção do filme hidrofóbico que recobria sua superfície. Após a retirada do filme hidrofóbico o eletrodo foi submetido a uma nova polarização por 10 minutos com potencial de -3,0 V vs Ag/AgCl (tratamento catódico), para a ativação e condicionamento da superfície. Adicionalmente, após o tratamento inicial, sempre que necessário para a recuperação da superfície eletródica, o eletrodo era submetido somente ao tratamento catódico (-3,0 V) por um período de 30 segundos em ácido sulfúrico 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Após isso, o eletrodo foi lavado com água. Deste modo, sempre que necessário para a recuperação da superfície eletródica, o eletrodo era submetido a este tratamento garantindo, assim, a repetibilidade das análises.

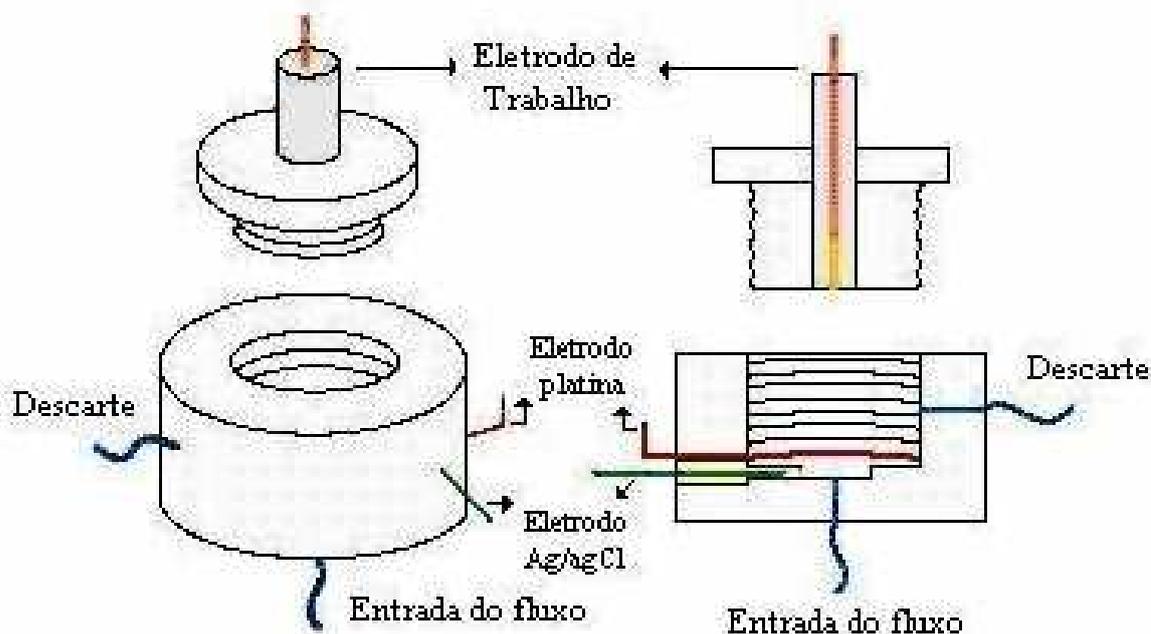
Em uma etapa prévia foram usadas diferentes técnicas voltamétricas (voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada) para avaliar qual seria a mais adequada para fins analíticos.

### *III.2.5.1.1 Voltametria Cíclica (CV)*

Os voltamogramas foram obtidos num intervalo de potencial de 0,0 a 1,5 V. Foram avaliados diferentes composições do eletrólito suporte (tampão BR e tampão fosfato), pH (2 a 12 para o BR; 7 para o tampão fosfato), concentração do tampão fosfato (0,010 e 0,10 mol L<sup>-1</sup>) e velocidade de varredura no intervalo de 10 a 400 mV s<sup>-1</sup>. As curvas analíticas foram construídas no intervalo de 2 a 10 mg L<sup>-1</sup> para cada parabenol.

### *III.2.5.1.2 Estudos preliminares usando o eletrodo de diamante em uma cela em fluxo*

A célula utilizada para os estudos usando análise por injeção em fluxo e detecção eletroquímica foi construída no laboratório e está apresentada na Figura III.1. Os eletrodos utilizados foram: eletrodo de trabalho: eletrodo de diamante: (área: 2,5 mm<sup>2</sup>), eletrodo de referência: Ag/AgCl, KCl 3 mol L<sup>-1</sup> e eletrodo auxiliar: platina. A detecção eletroquímica foi realizada no potencial de 1,2 V.



**Figura III.1** Célula em fluxo em acrílico, usando o eletrodo de diamante como eletrodo de trabalho.

### III.2.5.2 Determinação de parabenos por voltametria cíclica

#### *III.2.5.2.1 Curvas analíticas – Padronização interna*

As curvas analíticas para cada parabeno foram construídas usando hidroquinona como padrão interno. As soluções de trabalho dos padrões analíticos dos parabenos foram obtidas a partir das soluções estoque de concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , mediante diluição das mesmas no eletrólito suporte para as concentrações finais de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . A concentração do padrão interno na cela voltamétrica foi fixada em  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

### *III.2.5.2.2 Preparo de amostras de antitranspirantes tipo roll on para determinação de parabenos por voltametria cíclica*

Foram pesados em torno de 1,0 g de amostra para balão volumétrico de 10 mL e adicionados 5 mL de água. A mistura foi levada ao banho de ultrassom por 10 minutos e o balão avolumado com água. A solução foi transferida para um tubo de centrífuga e a solução centrifugada a 986 g por 20 minutos. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi aplicado em um cartucho de extração em fase sólida C<sub>18</sub> (Bond Elut, 500 mg, 3mL da Varian, EUA). previamente condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de água. O cartucho foi lavado com 2 mL de água e eluído com 3 mL de ACN. O eluato foi transferido para balão volumétrico de 5,0 mL.

Para as medidas voltamétricas, o balão foi avolumado com água e alíquotas de 0,3 – 1,5 mL, foram adicionadas na cela eletroquímica contendo 5 mL de eletrólito suporte e 300 µL de padrão interno na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, purgou-se a solução por 2 minutos com nitrogênio e um voltamograma no intervalo de 0,0 a 1,5 V e velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup> foi registrado. Após isso, foram adicionadas alíquotas da solução padrão de MePa e os respectivos voltamogramas registrados. A quantificação foi realizada pelo método de adição de padrão, usando a hidroquinona como padrão interno. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### III.3 Resultados e Discussão

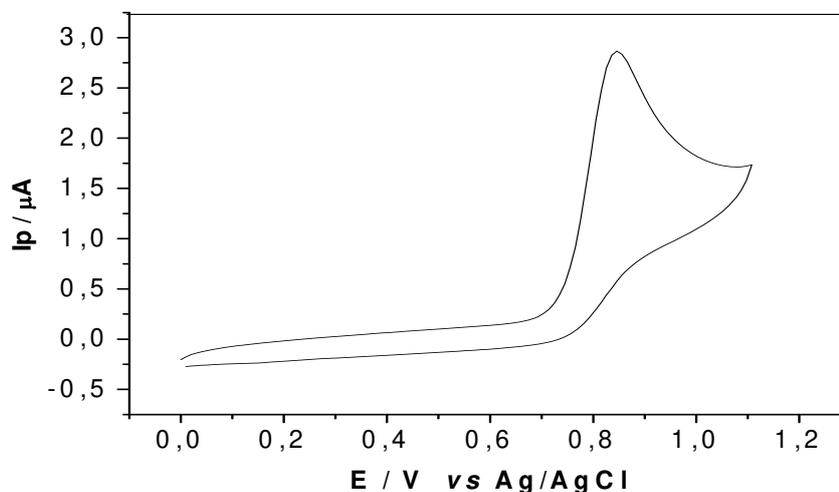
Para possibilitar o desenvolvimento de um método voltamétrico para a determinação de parabenos em formulações cosméticas fez-se necessário, em uma primeira etapa, avaliar o comportamento eletroquímico dos parabenos no eletrodo escolhido: o eletrodo de diamante dopado com boro. Ainda, não existem relatos na literatura que empregam o eletrodo de diamante para a determinação de parabenos.

Para tanto, diferentes técnicas, entre essas, a voltametria de onda quadrada e a voltametria cíclica foram empregadas. Os estudos iniciais objetivaram estudar a influência de alguns parâmetros como composição do eletrólito suporte, pH, concentração do eletrólito suporte, adição de solventes orgânicos sobre a intensidade da corrente de pico e o perfil dos voltamogramas durante o processo redox.

#### ***III.3.1 Estudo do comportamento voltamétrico dos parabenos sobre o eletrodo de diamante dopado com boro usando voltametria cíclica***

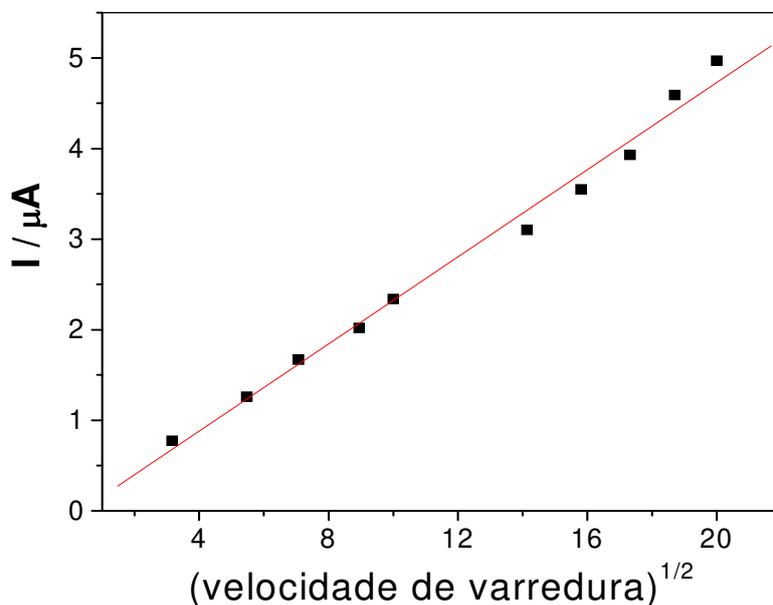
Os parabenos (MePa, EtPa, PrPa e BePa) no DDB apresentam um pico anódico em torno de 0,85 V vs Ag/AgCl, com características de processo irreversível, uma vez que o voltamograma não apresenta pico catódico na varredura reversa. Um voltamograma característico para o MePa está apresentado na Figura III.2. Os voltamogramas para os demais parabenos podem ser visualizados nas Figuras III.5 a III.7.

Os resultados indicam que não é viável a separação dos parabenos por voltametria cíclica, uma vez que todos sofrem oxidação no mesmo potencial.



**Figura III.2** Voltamograma cíclico obtido para metilparabeno  $50 \text{ mg L}^{-1}$  sobre o eletrodo DDB. Eletrólito: tampão BR  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

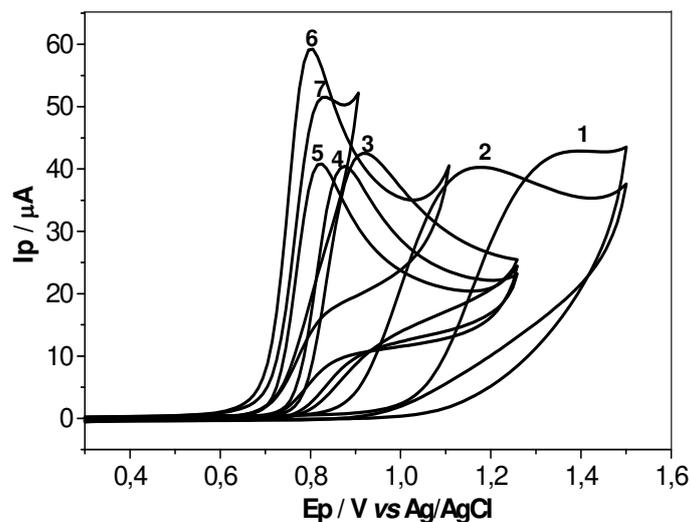
A avaliação da corrente de pico anódica em função da velocidade de varredura indicou que a oxidação dos parabenos sobre o eletrodo de DDB é controlada pela difusão das espécies na superfície eletródica, uma vez que estes compostos apresentam dependência linear da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Este comportamento foi observado para todos os conservantes estudados, nos eletrólitos suporte analisados. O gráfico para o MePa está apresentado na Figura III.3.



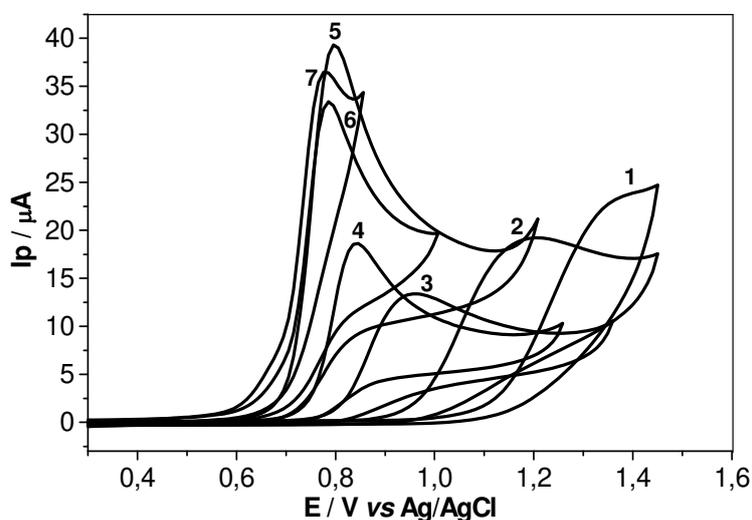
**Figura III.3** Dependência da corrente de pico com a variação da raiz quadrada da velocidade de varredura para metilparabeno ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ .

### *III.3.1.1 Estudo da influência do pH do meio*

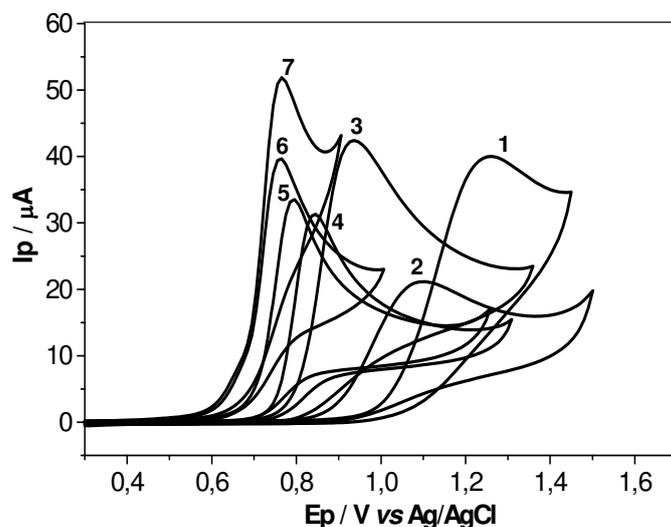
Para estudo da influência do pH do meio na resposta eletroquímica foi utilizado como eletrólito suporte o tampão BR  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ , na concentração de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Os voltamogramas obtidos para os conservantes MePa, EtPa, PrPa e BePa nos diferentes pH encontram-se nas Figuras III.4 a III.7. A partir dos voltamogramas pode-se observar que tanto a corrente como o potencial de pico, são influenciados pelo pH do meio.



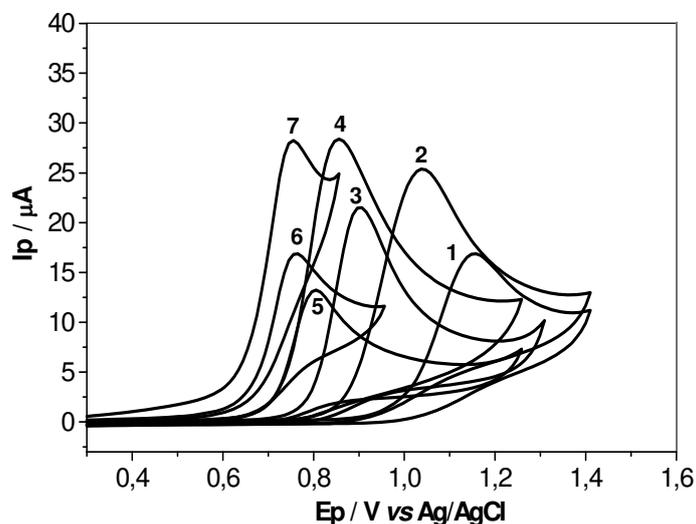
**Figura III.4** Voltamogramas cíclicos obtidos para o metilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ . pH (1) 2,0; (2) 4,0; (3) 6,0; (4) 7,0; (5) 8,0; (6) 10,0; (7) 12,0.



**Figura III.5** Voltamogramas cíclicos obtidos para o etilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ . pH (1) 2,0; (2) 4,0; (3) 6,0; (4) 7,0; (5) 8,0; (6) 10,0; (7) 12,0.



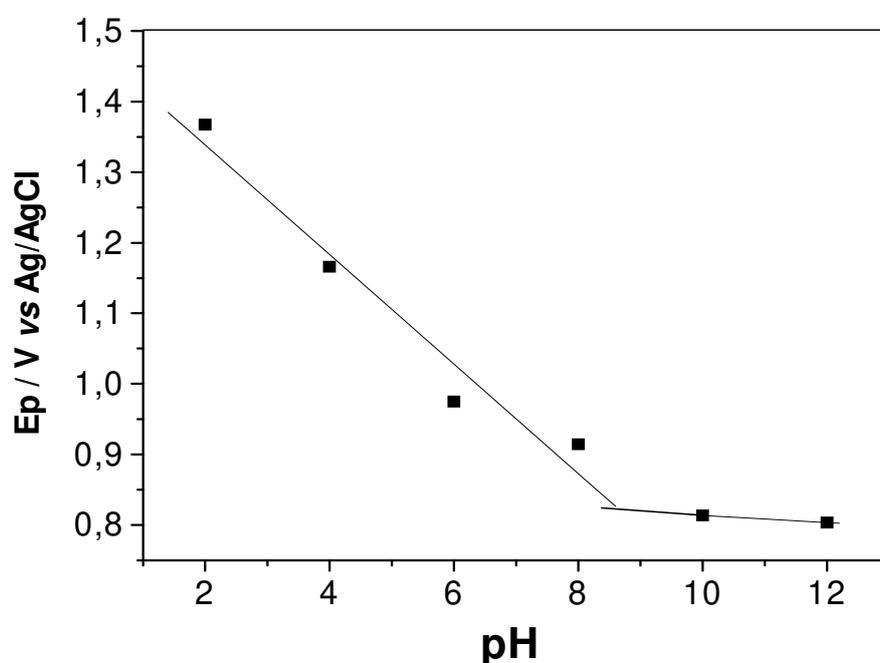
**Figura III.6** Voltamogramas cíclicos obtidos para o propilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ . pH (1) 2,0; (2) 4,0; (3) 6,0; (4) 7,0; (5) 8,0; (6) 10,0; (7) 12,0.



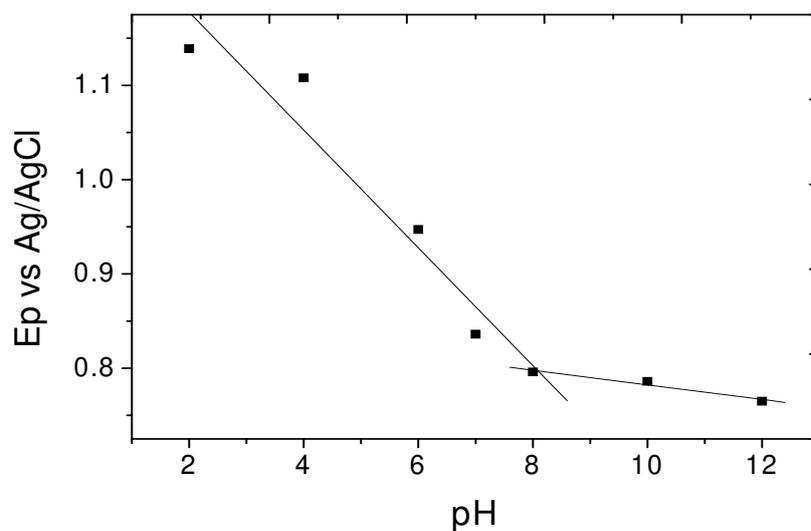
**Figura III.7** Voltamogramas cíclicos obtidos para o benzilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB em função do pH, eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ . pH (1) 2,0; (2) 4,0; (3) 6,0; (4) 7,0; (5) 8,0; (6) 10,0; (7) 12,0.

Através dos voltamogramas verifica-se que o potencial de pico é deslocado para valores mais anódicos em função da diminuição do pH do meio, ou seja, a oxidação é dificultada. Cabe destacar, que os parabenos hidrolisam a ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA) em meio alcalino, o que torna a determinação destes compostos em  $\text{pH} > 7$  não adequada.

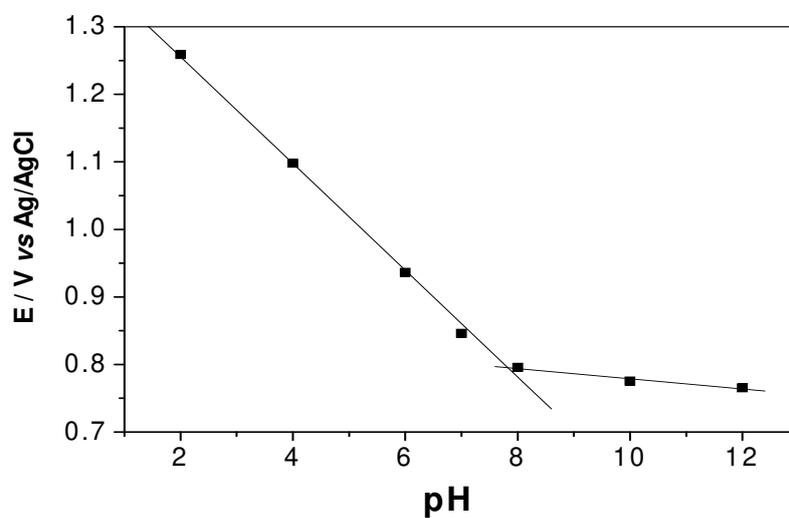
Os gráficos de potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH são observados nas Figuras III.8, III.9, III.10 e III.11 e permitiram estabelecer os valores dos  $\text{pK}_a$  aparentes para os parabenos estudados (Tabela III.1).



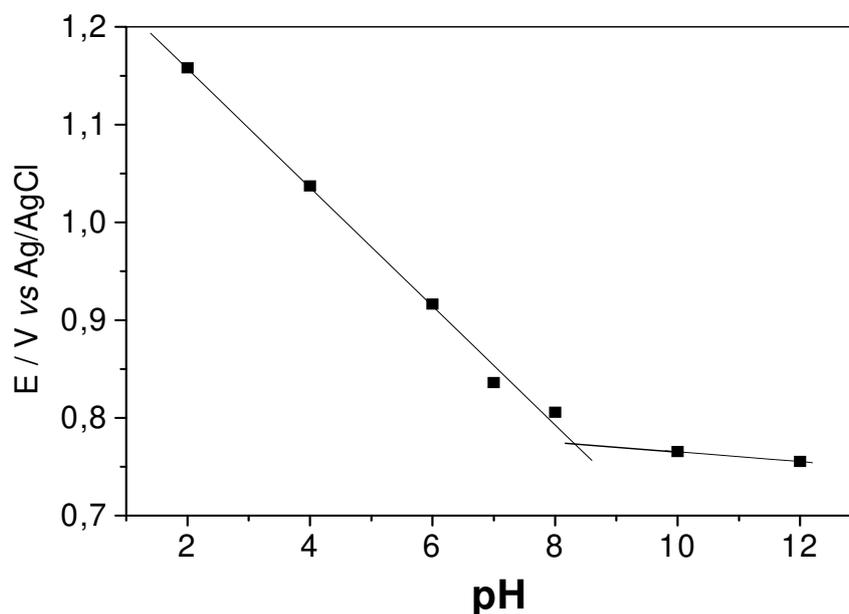
**Figura III.8** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do metilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura III.9** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do etilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura III.10** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do propilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura III.11** Variação do potencial de pico ( $E_p$ ) em função do pH do benzilparabeno ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), eletrólito suporte tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $2 \leq \text{pH} \leq 12$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Tabela III.1** Valores de  $pK_a$  obtidos para os parabenos em estudo.

Parabenos	$pK_a$ obtido	$pK_a^*$
MePa	8,7	8,47*
EtPa	8,1	
PrPa	7,8	
BePa	8,3	

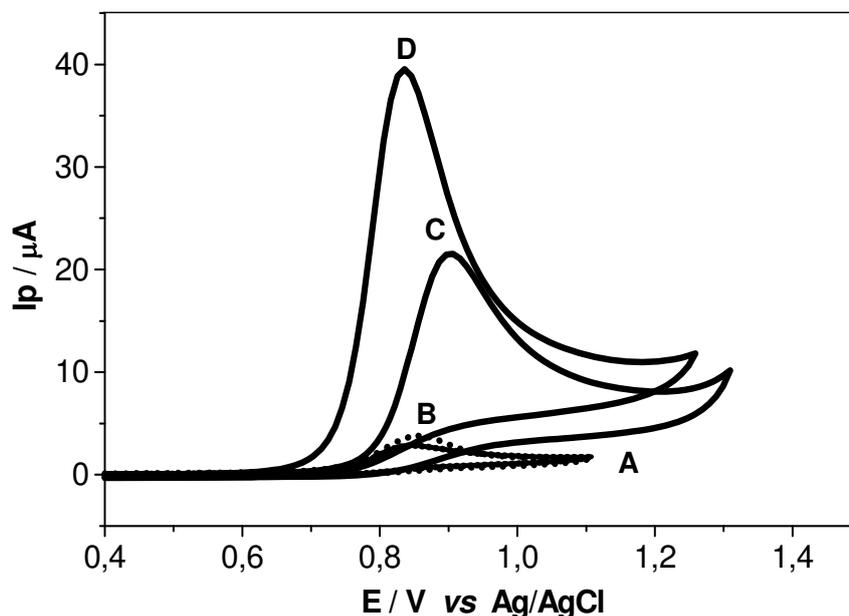
\**ICMSF: Internation Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980).*

Os valores de  $pK_a$  aparentes, determinados a partir dos voltamogramas, variaram de 7,8 a 8,7. O  $pK_a$  citado na literatura é de 8,47. Uma vez que o  $pK_a$  aparente é muito próximo do  $pK_a$  da literatura conclui-se que o equilíbrio ácido-base não é perturbado na dupla camada elétrica.

### III.3.1.2 Estudo da influência da composição do eletrólito suporte

Para avaliar a influência da composição do eletrólito suporte sobre o processo redox dos parabenos foram realizados testes com o tampão BR e fosfato, em diferentes concentrações (0,01 de 0,1 mol L<sup>-1</sup>), no pH 7. O tampão fosfato foi escolhido, uma vez que tinha-se como objetivo usar o eletrodo de diamante em uma célula em fluxo para ser acoplada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência. Neste sentido o tampão fosfato seria compatível com a coluna analítica de fase reversa.

Na Figura III.12 estão apresentados os voltamogramas obtidos para o BePa nos diferentes meios. Observa-se que o processo redox é pouco influenciado pela composição do eletrólito suporte, quando esse se encontra em uma concentração de 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Para uma concentração de uma ordem de magnitude maior, tanto a corrente de pico como o potencial de pico são fortemente influenciados pela concentração do eletrólito suporte. Pode se verificar que a corrente aumenta com a concentração do eletrólito suporte e o potencial de pico é deslocado para potenciais menores, indicando que a oxidação é facilitada. Embora tenha se obtido uma maior sinal analítico com o tampão BR 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 do que com o tampão fosfato na mesma concentração, o último foi escolhido para os estudos subseqüentes, uma vez que esse tampão seria mais adequado para ser usado como componente da fase móvel na cromatografia líquida de alta eficiência.

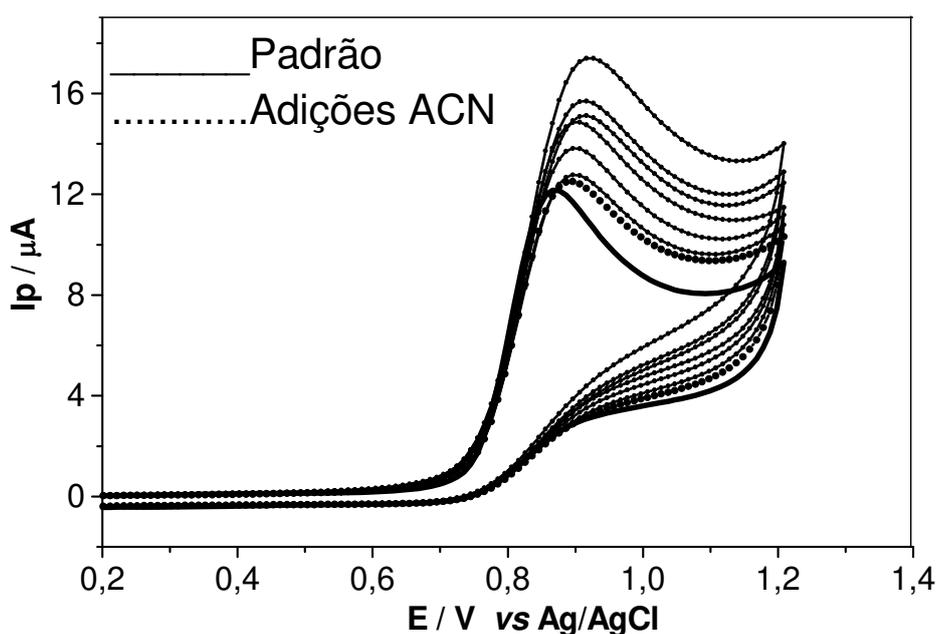


**Figura III.12** Voltamogramas cíclicos (primeiro ciclo) obtidos para o Benzilparabeno ( $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), nos seguintes eletrólitos suporte, pH 7,0: (A) tampão fosfato  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ ; (B) tampão BR  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ ; (C) tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ; (D) tampão BR  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Considerando que os parabenos são compostos consideravelmente apolares e que não seria viável separar os mesmos em uma coluna octadecil sem uso de um solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) na fase móvel foi realizado um estudo para avaliar o efeito do solvente sobre o comportamento redox dos parabenos. Para tanto, sucessivas adições de acetonitrila ao tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7, contendo BePa foram feitas e os voltamogramas registrados (Figura III.13). A partir dos voltamogramas verifica-se que a acetonitrila leva a um aumento da intensidade da corrente de pico para o BePa, sem contudo modificar o perfil voltamétrico, ou seja sem deslocar o potencial

de pico. Esses resultados sugerem que a acetonitrila aumente a difusão das espécies eletroativas do seio da solução para a superfície eletródica.

Sendo assim, fica evidenciado que a acetonitrila com tampão fosfato podem ser empregados em medidas em fluxo, usando o eletrodo de diamante na célula eletroquímica do sistema de detecção (detector eletroquímico).



**Figura III.13** Voltamogramas cíclicos obtidos para o benzilparabeno ( $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , eletrólito suporte:  $5,0 \text{ mL}$  de tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7,0$ , após sucessivas adições de  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de acetonitrila na cela eletroquímica.

### ***III.3.2 Desenvolvimento de método para a determinação de parabenos em antitranspirantes usando a voltametria cíclica***

Nos estudos preliminares realizados com a voltametria cíclica estabeleceram-se as seguintes condições de análise: eletrólito suporte: tampão

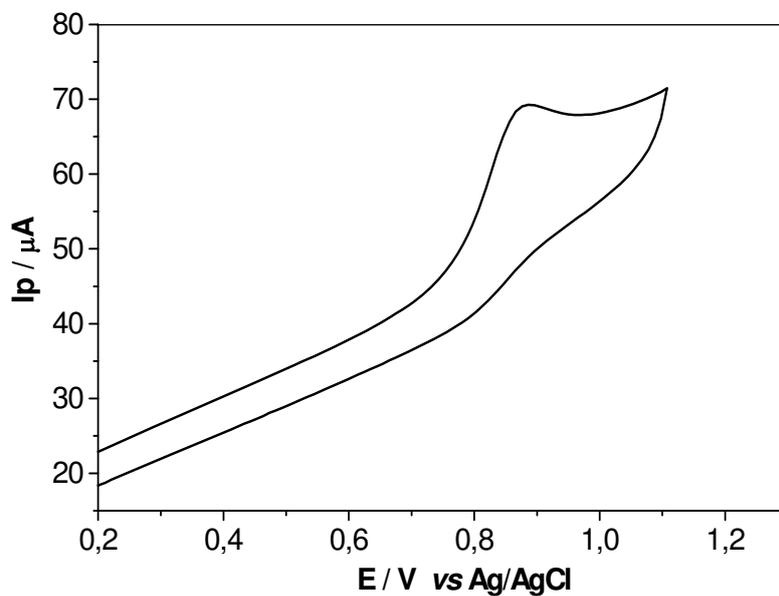
fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; potencial inicial: 0,0 V; potencial de inversão 1,5 V e potencial final: 0,0 v; velocidade de varredura:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . No entanto, foi verificado que também nesta técnica ocorreria, em menor extensão, a passivação da superfície eletródica. No sentido de corrigir a perda da corrente entre medidas sucessivas foi avaliado o uso de um padrão interno.

### *III.3.2.1 Efeito do padrão interno*

O método de padronização interna, de modo geral, relaciona a razão sinal analítico do analito / sinal do padrão interno pela concentração do analito. Esse procedimento visa melhorar a repetibilidade dos resultados. Embora o método de padronização interna não seja tradicionalmente empregado na voltametria, pode apresentar vantagens frente à padronização externa. As características básicas que o padrão interno deve ter para poder ser empregado na voltametria são: sofrer o processo redox em potencial diferente do analito (separado por uma diferença de potencial maior que 200 mV), não adsorver na superfície do eletrodo, apresentar resposta no mesmo meio de análise e não estar presente na amostra.

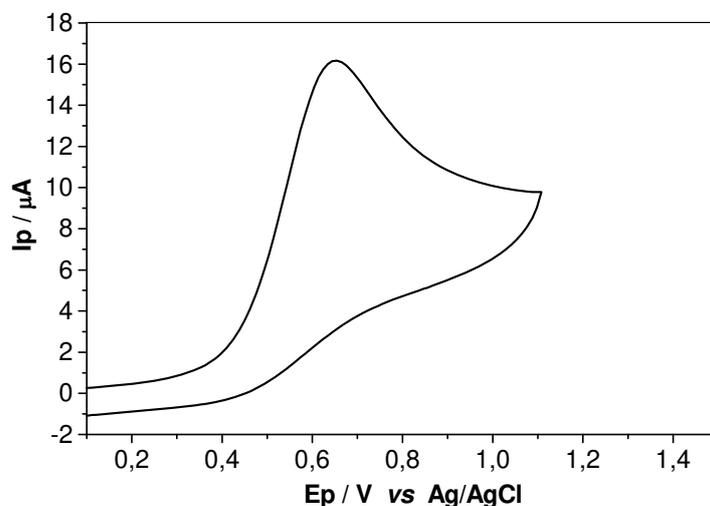
Levando em consideração esses parâmetros e a composição dos antitranspirantes, foram selecionados dois compostos para serem avaliados: a benzofenona e a hidroquinona. Ambos compostos podem ser oxidados no eletrodo de diamante no eletrólito empregado.

A Figura III.14 mostra o voltamograma obtido para a benzofenona, que apresenta um único pico anódico irreversível em 0,89 V vs Ag/AgCl. Uma vez que a benzofenona sofre redução em potencial próximo ao dos parabenos, esse composto não pode ser usado como padrão interno.



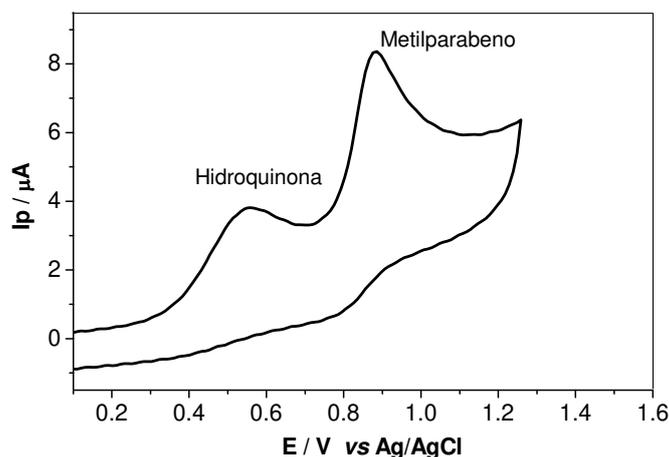
**Figura III.14** Voltamograma cíclico obtido para a benzofenona ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB, tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

O segundo composto avaliado foi a hidroquinona, que apresenta um pico anódico irreversível em  $0,65 \text{ V vs Ag/AgCl}$  (Figura III.15).



**Figura III.15** Voltamograma cíclico obtido para a hidroquinona ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre o eletrodo DDB, tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

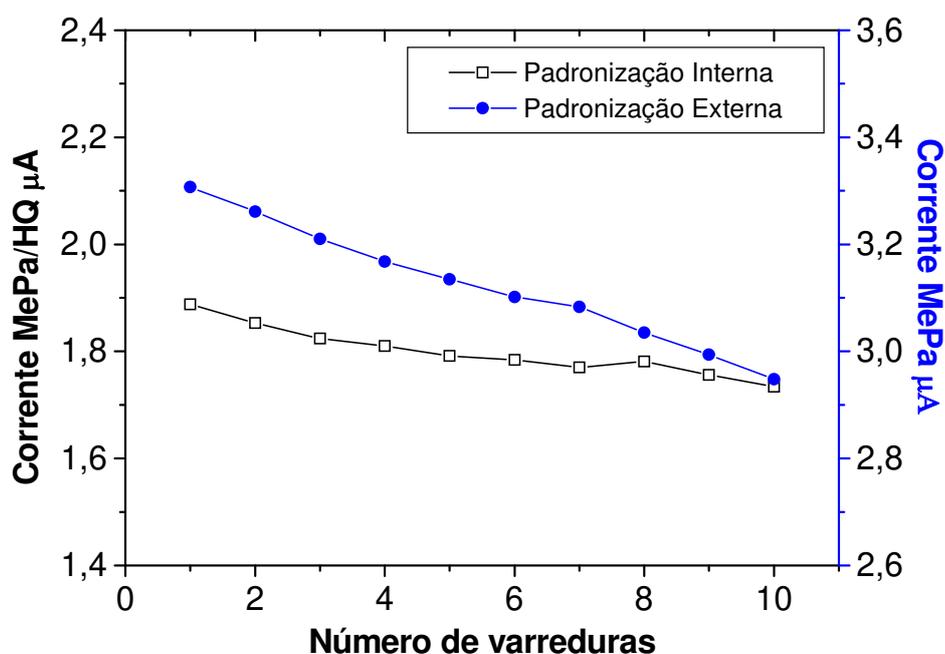
O comportamento eletroquímico da hidroquinona na presença de metilparabeno está apresentado na Figura III.16.



**Figura III.16** Voltamograma cíclico da hidroquinona ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) na presença de metilparabeno ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A diferença entre o potencial de pico da hidroquinona e do MePa é de 320 mV (Figura III.16), o que confere a hidroquinona potencialidade para ser empregada como padrão interno. O mesmo comportamento é observado na presença dos outros parabenos em estudo (resultados não apresentados).

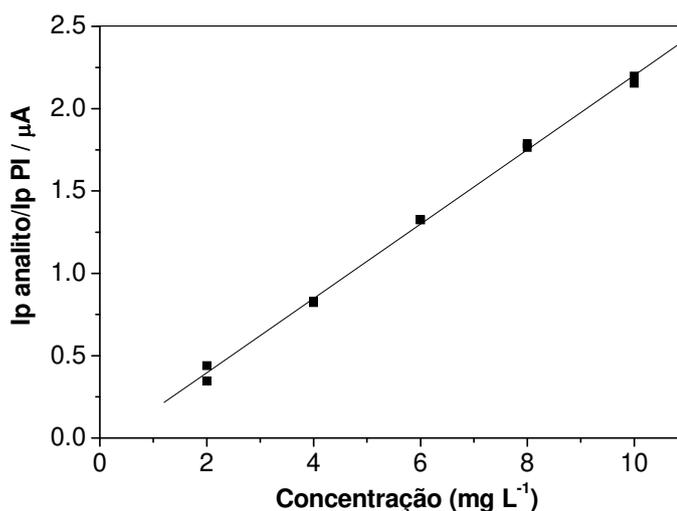
Após a seleção do possível padrão interno foi avaliado se a presença deste no eletrólito suporte poderia vir a corrigir a perda na intensidade de corrente do MePa durante medidas sucessivas. Os resultados obtidos na análise de uma solução contendo a hidroquinona e MePa durante 10 varreduras sucessivas está apresentado na Figura III.17.



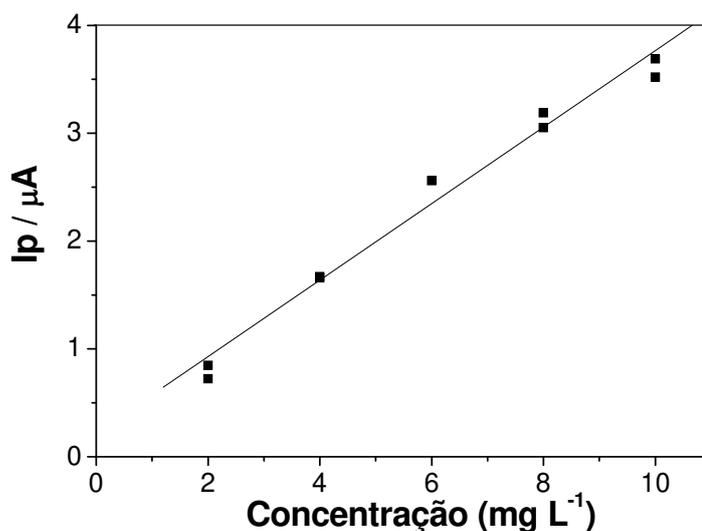
**Figura III.17** Correntes de pico MePa (padronização externa) e correntes de pico do MePa/hidroquinona (padronização interna) em função do número de varreduras. Voltamogramas registrados em tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Concentração de metilparabeno: 10 mg L<sup>-1</sup> e hidroquinona: 6 mg L<sup>-1</sup>.

Na Figura III.17 observa-se que tanto a corrente sem correção e com correção sofrem uma diminuição em função do número de varreduras, sendo, no entanto, menor quando se usa a padronização interna. No entanto, outro parâmetro importante a ser avaliado é a curva analítica e, em particular, o coeficiente angular.

Curvas analíticas com e sem padronização interna estão apresentadas nas Figuras III.18 e III.19. As Figuras de mérito (coeficiente angular, coeficiente linear e linearidade) para os conservantes MePa, EtPa e PrPa estão apresentados na Tabela III.2; os valores de exatidão e precisão intra-ensaio ( $n = 5$ ) avaliados para o MePa estão relacionados na Tabela III. 3.



**Figura III.18** Curva analítica para o metilparabeno, usando a hidroquinona ( $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) como padrão interno. Voltametria Cíclica, tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura III.19** Curva analítica para o metilparabeno sem padrão interno. Voltametria Cíclica, tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

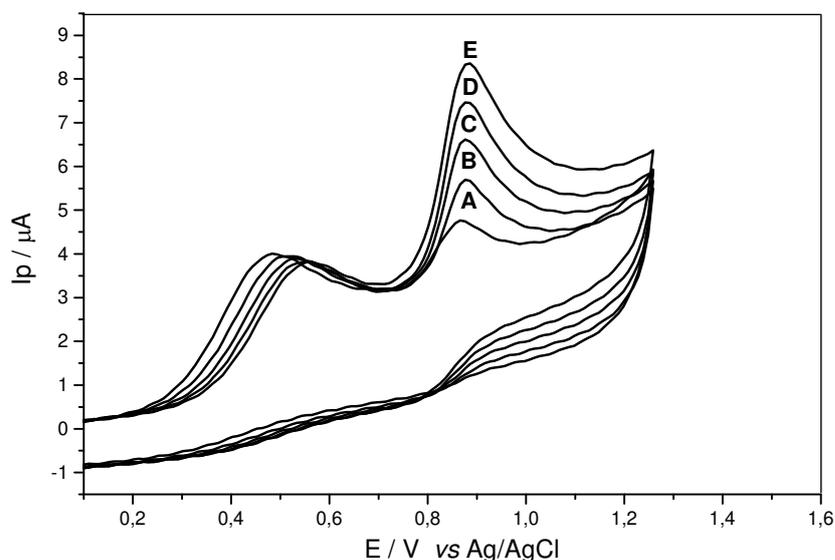
**Tabela III.2** Figuras de mérito obtidas para os parabenos utilizando CV.

<b>Figuras de Mérito</b>	<b>MePa</b>	<b>EtPa</b>	<b>PrPa</b>
<i>Equação da Reta</i>	$I_p = -0,0095 + 0,188 C$	$I_p = 0,133 + 0,181 C$	$I_p = 0,00382 + 0,197 C$
<i>Faixa linear de trabalho (mg L<sup>-1</sup>)</i>	2,0 – 10,0	2,0 – 10,0	2,0 – 10,0
<i>Linearidade (r)</i>	0,9994	0,9989	0,9990
<i>Sensibilidade <math>\mu\text{A} / \text{mg L}^{-1}</math></i>	0,188	0,181	0,197

**Tabela III.3** Figuras de mérito obtidas para o metilparabeno por CV usando Hidroquinona como padrão interno.

<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Exatidão (% recuperação)</b>	<b>Precisão intra-ensaio (% CV) n =5</b>
<b>2,0</b>	99,3	4,94
<b>4,0</b>	100,2	2,87
<b>6,0</b>	99,0	4,86

Os resultados obtidos pelas curvas analíticas demonstram que o eletrodo de diamante dopado com boro juntamente com a técnica de voltametria cíclica são promissores para a determinação de parabenos totais, uma vez que as sensibilidades (coeficientes angulares) dos parabenos são semelhantes. Os voltamogramas estão apresentados na Figura III.20.



**Figura III.20** Voltamogramas obtidos para o metilparabeno por voltametria cíclica, utilizando hidroquinona como padrão interno. Eletrólito suporte tampão fosfato, pH 7,0;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Concentrações de metilparabeno: (A) 2,0; (B) 4,0; (C) 6,0; (D) 8,0; (E) 10,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Concentração da hidroquinona: 6,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

### III.3.2.2 Determinação de parabenos totais em amostras de antitranspirantes roll on por voltametria cíclica

Para avaliar a potencialidade do método voltamétrico na determinação de parabenos totais em amostras de antitranspirantes *roll on* foram selecionadas aleatoriamente quatro amostras de fabricantes diferentes do mercado, denominadas neste trabalho de AT1, AT2, AT3 e AT12. A composição das amostras informadas no rótulo estão apresentadas na Tabela III.4. Todas as amostras apresentam na sua composição, além das substâncias listadas na Tabela III.5, água, fragrância e cloridrato de alumínio.

**Tabela III.4.** Composição química rotulada das amostras de antitranspirantes tipo *roll on* analisadas:

<b>Amostra</b>	<b>Composição química</b>
<b>AT 1</b>	estearato de glicerila, silicato de alumínio-magnésio, conservante
<b>AT 2</b>	álcool cetosteárico, Glicerina, MePa, PrPa, EDTA, Cloreto de Benzalcônio, Polisorbato, Miristato de Isopropila
<b>AT 3</b>	álcool cetosteárico, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), MePa, PrPa, EDTA, Cloreto de Benzalcônio, Polisorbato, Miristato de Isopropila
<b>AT 4</b>	ciclometicona, glicerina, butilhidroxitolueno (BHT), MePa, PrPa, EDTA, silicato de alumínio-magnésio, alantoína
<b>AT 5</b>	dimeticona, álcool cetosteárico, MePa, triclosano, EDTA
<b>AT 6</b>	MePa, EDTA, cloreto de benzalcônio, tetracloridrato de alumínio e zircônio, lanolina, hidroxietilcelulose, farmesol e álcool etílico
<b>AT 7</b>	butilhidroxitolueno (BHT), triclosano, EDTA, silicato de alumínio-magnésio, palmitato de octila, dipropileno, parabenos, silicone
<b>AT 8</b>	ciclometicona, estearato de glicerila, estearato de polietilenoglicol (PEG) 100, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), MePa, triclosano, PrPa, EDTA, alantoína, álcool cetílico, propilenoglicol.
<b>AT 9</b>	ciclometicona, estearato de glicerila, estearato de PEG 100, dimeticona, álcool cetosteárico, glicerina, HPMC, BHT, MePa, triclosano, PrPa, EDTA, silicato de alumínio-magnésio, alantoína, conservante, cloreto de benzalcônio, álcool cetílico, álcool estearílico, polisorbato, miristato de isopropila.
<b>AT 10</b>	ciclometicona, glicerina, BHT, MePa, PrPa, EDTA, silicato de alumínio-magnésio, alantoína
<b>AT 11</b>	HPMC, BHT, MePa, triclosano, PrPa, EDTA, álcool estearílico, metilcloroisotiazolinona
<b>AT 12</b>	EDTA
<b>AT 13</b>	EDTA, PEG

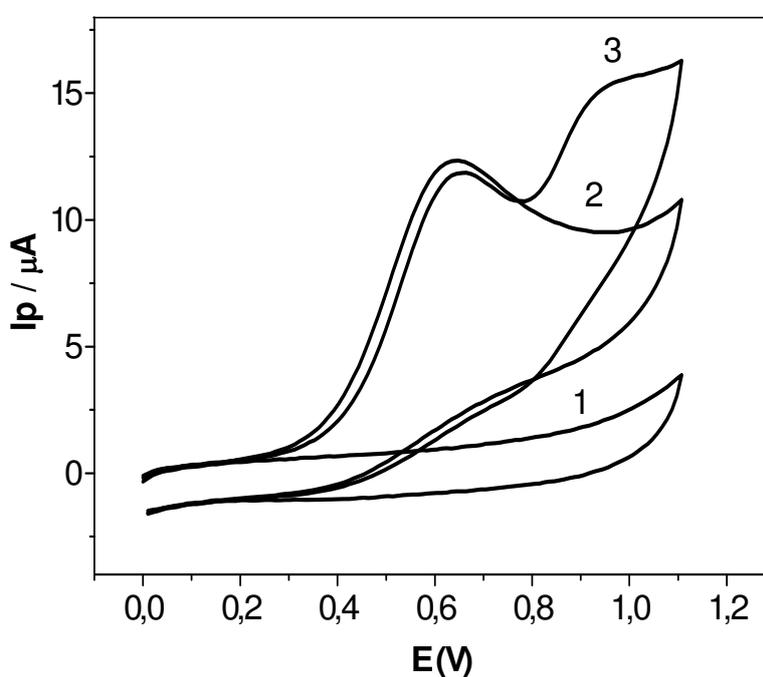
Para avaliar a possível interferência de substâncias da formulação ou efeito matriz na determinação dos parabenos por CV, amostras de antitranspirantes foram analisadas por voltametria cíclica: (1) após simples diluição em água e (2) usando a extração em fase sólida em cartuchos octadecil.

Foi verificado que apenas diluindo as amostras em água não seria viável realizar a quantificação, uma vez que dependendo da procedência da amostra, havia uma perda total da atividade da superfície eletródica, indicando que determinadas substâncias concomitantes adsorviam irreversivelmente na superfície do diamante. Sendo assim, foi avaliado o uso de um preparo de amostra mais elaborado, empregando a extração em fase sólida. O procedimento de preparo de amostra usando a SPE está apresentado no item III.2.5.2.2 e compreende basicamente a aplicação da amostra em um cartucho octadecil previamente condicionado com metanol e água e eluição dos parabenos com acetonitrila. A eficiência de extração foi calculada pela recuperação de uma amostra de antitranspirante branco (sem a presença de parabenos) fortificada com  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Esses resultados estão apresentados no Capítulo IV, Figuras IV.1 e IV.2.

Nas Figuras III.21, III.22, III.23 e III.24 estão apresentados os voltamogramas obtidos para quatro amostras, usando o método de padronização interna em conjunto com o método de adição de padrão. O preparo de amostras foi realizado usando a SPE. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A quantificação foi realizada como parabenos totais, expressos como metilparabeno.

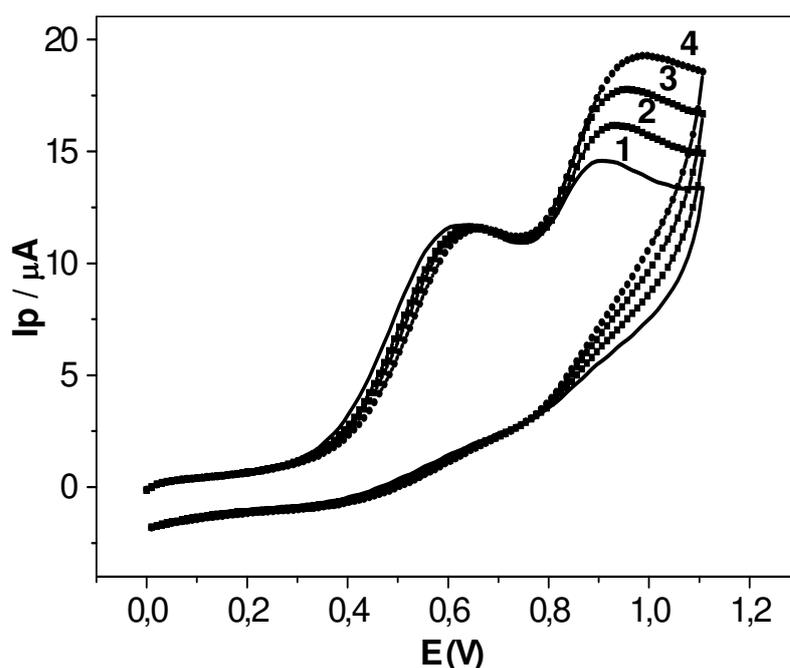
A amostra AT 12 não apresenta pico de oxidação em torno de  $0,9 \text{ V vs Ag/AgCl}$  o que indica a ausência de parabenos na matriz (Figura III.21). A

adição de padrão evidencia a ausência de efeito matriz, uma vez que não houve alteração da sensibilidade quando o MePa foi adicionada à amostra contida na cela voltamétrica em relação a uma curva obtida sem a matriz. Em outras palavras, as intensidades das correntes de pico da hidroquinona e do metilparabeno na presença e na ausência de amostra no eletrólito suporte, não foram alteradas e os valores obtidos foram de, aproximadamente,  $2,5 \times 10^{-6}$  e  $2,0 \times 10^{-6}$  A, respectivamente.

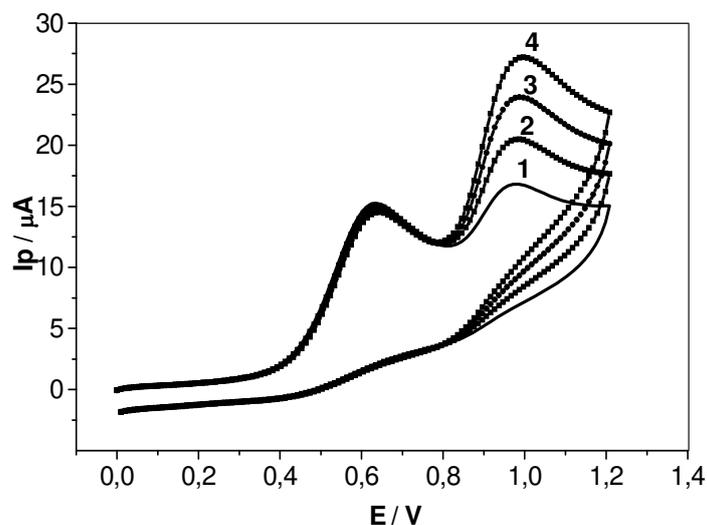


**Figura III.21** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT 12. Eletrólito suporte: 5 mL tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); (2) Amostra + hidroquinona  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; (3) Amostra + hidroquinona + Metilparabeno ( $125 \text{ } \mu\text{L MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

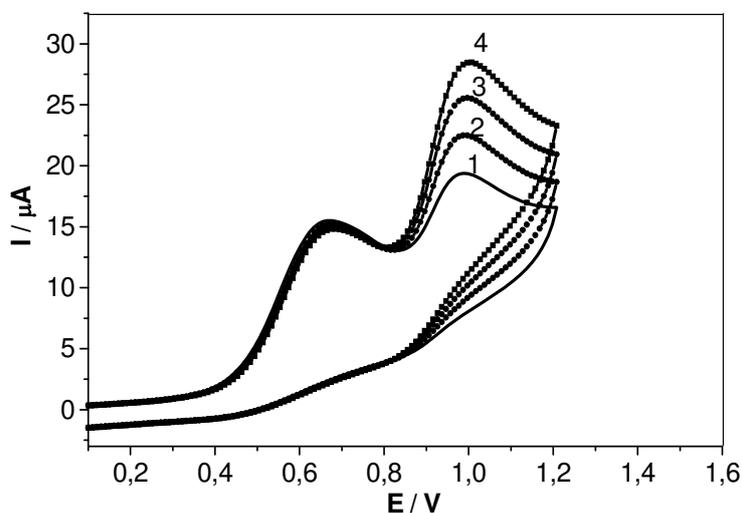
Nas amostras AT1 (Figura III.22), AT2 (Figura III.23) e AT3 (Figura III.24) observam-se picos anódicos em torno de 0,9 V vs Ag/AgCl o que confirma a presença de parabenos nas mesmas. A concentração de parabenos totais na célula eletroquímica foi determinada pelo método de adição de padrão, usando a hidroquinona como padrão interno.



**Figura III.22** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT1, usando hidroquinona ( $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) como padrão interno. Eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); Metilparabeno: (2) (3) e (4) alíquotas de  $125 \text{ } \mu\text{L MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura III.23** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT 2, usando hidroquinona ( $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) como padrão interno. Eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); Metilparabeno: (2) Metilparabeno: (2), (3) e (4) alíquotas de  $125 \text{ μL MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura III.24** Voltamogramas cíclicos para a amostra AT 3, usando hidroquinona ( $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) como padrão interno. Eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Amostra (1); Metilparabeno: (2), (3) e (4) alíquotas de  $125 \text{ μL MePa } 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

A Tabela III.5 apresenta a quantidade (%) de parabenos totais encontradas nas amostras de antitranspirantes analisadas por CV e pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência previamente implementado (tabela IV.4). As concentrações foram apresentadas como parabenos totais, expressas no método voltamétrico como metilparabeno.

**Tabela III.5** Determinação de parabenos totais em amostras de antitranspirantes tipo *roll on* por HPLC e voltametria cíclica.

Amostras	HPLC		Voltametria	
	Parabenos* (%)	RSD** (%)	Parabenos* (%)	CV** (%)
AT 1	0,025	4,9	0,024	2,3
AT 2	0,35	2,5	0,34	1,0
AT 3	0,25	1,9	0,25	0,3
AT 12	N.D	-	N.D	-

(\*): Média da concentração de parabenos totais ( $n=3$ ), expresso como metilparabeno;      \*\* Estimativa do desvio padrão relativo,  $n=3$ .

N.D: Não detectado.

A partir dos resultados obtidos verifica-se que não há diferença significativa (teste t) entre as concentrações de parabenos determinados nas amostras pelo método HPLC e CV ( $P<0,05$ ), o que indica a exatidão do método voltamétrico desenvolvido.

A precisão do método tem como critério de aceitação um desvio padrão relativo (% CV)  $< 5,0\%$  . Considerando que os valores obtidos foram menores que este percentual, o método é preciso para a determinação de parabenos nas amostras estudadas.

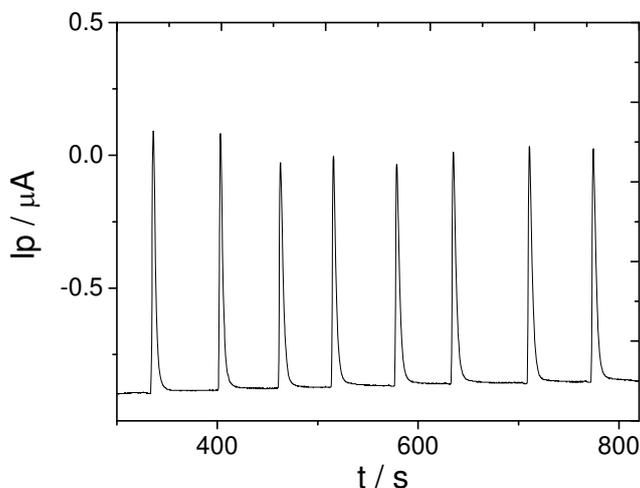
Embora os resultados obtidos tenham sido satisfatórios para essas quatro amostras, é importante ressaltar que para algumas amostras não foi possível se fazer à determinação dos parabenos pela perda completa da atividade do eletrodo de diamante durante a aquisição de dados. Como as amostras de antitranspirantes são amostras complexas e não se tem uma matriz padronizada é importante que o método seja validado para cada matriz diferente.

### ***III.3.3 Estudos preliminares usando o eletrodo de diamante em uma célula em fluxo***

Uma vez que não seria viável realizar a determinação individual de cada parabeno por voltametria, desde que não existe diferença entre os potenciais de picos dos mesmos durante a varredura de potencial, seria importante avaliar a potencialidade do eletrodo de diamante em uma célula em fluxo, para verificar a possibilidade do uso do eletrodo de diamante em um detector eletroquímico (amperométrico) a ser acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

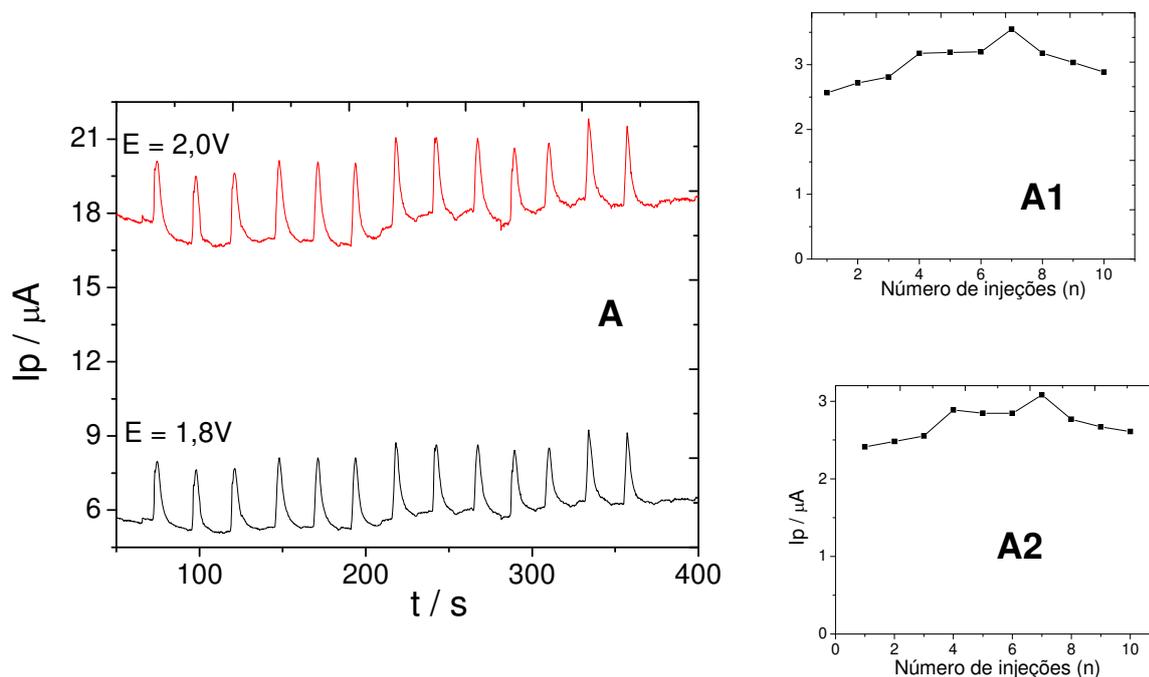
Os primeiros estudos foram realizados com uma célula de acrílico construída no laboratório (Figura III.1), onde o eletrodo de diamante foi usado como eletrodo de trabalho e um fio de prata, cloreto de prata e um fio de platina como referência e auxiliar, respectivamente. Os primeiros estudos foram realizados para o PrPa em um sistema convencional de análise por injeção em fluxo, ou seja, sem o uso de uma coluna cromatográfica.

Um fiograma característico obtido para o PrPa na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (injeções sucessivas da mesma concentração) está apresentado na Figura III.25. Como carregador foi usado tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0.

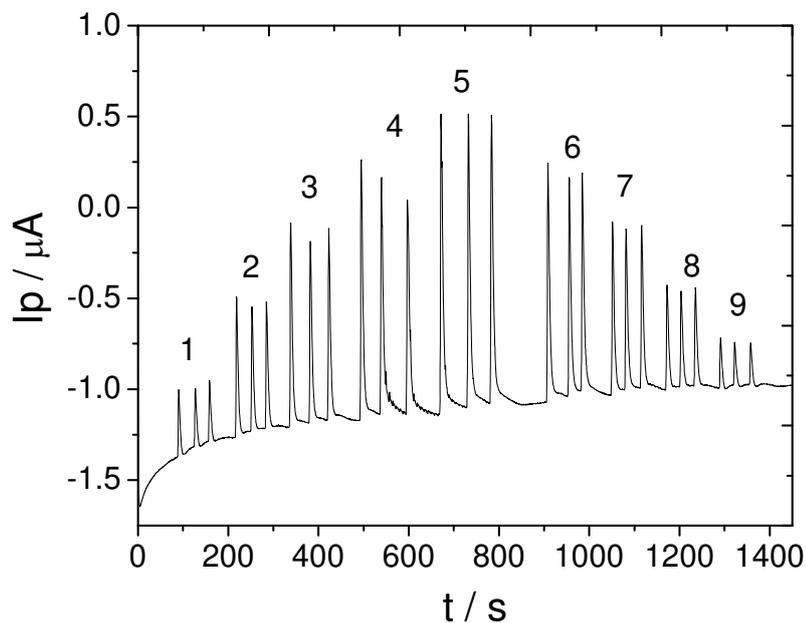


**Figura III.25** Diagrama característico obtido para o propilparabeno em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial aplicado: 1,2 V. Propilparabeno: (1)  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Vazão:  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

Para avaliar se o potencial aplicado leva a uma maior corrente ou estabilização da mesma, foram avaliados também outros dois potenciais: 1,8 e 2,0 V (Figura III.26 A). Os respectivos gráficos de corrente em função do número da injeção (determinações sucessivas) estão apresentados nas Figuras III.26 A1 e III.26 A2. Pode-se observar nestes gráficos que existe uma variação considerável entre as replicatas de injeções. Vale ressaltar que a aplicação de um potencial elevado leva a uma perda de seletividade da análise. Sendo assim, foi construída uma curva analítica para o PrPa, usando um potencial de 1,2 V. Um diagrama característico está apresentado na Figura III.27.

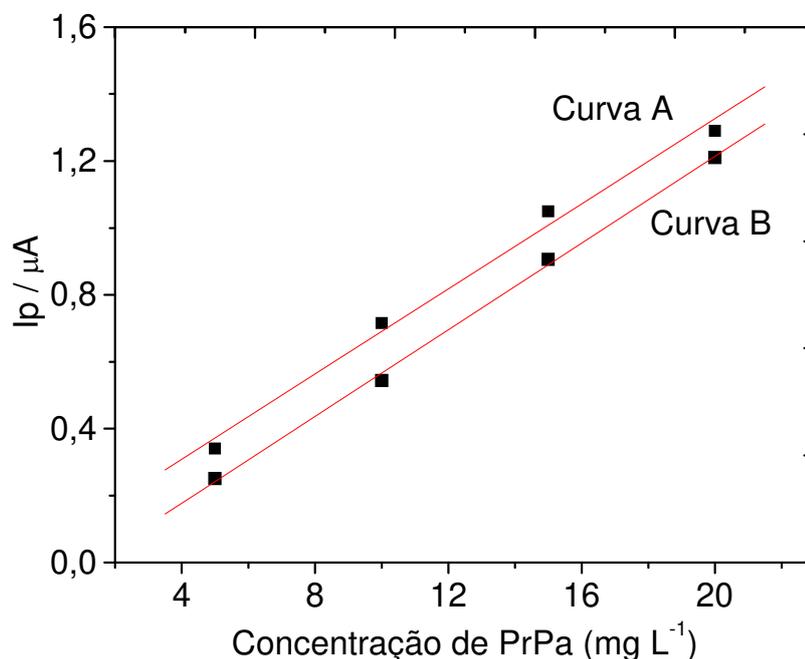


**Figura III.26** (A) Diagrama característico obtido para o propilparabeno ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial aplicado: 1,8 e 2,0 V. Propilparabeno: (1)  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . (A1): curva corrente versus número de injeções no potencial de 1,8 V e (A2) curva corrente versus número de injeções no potencial de 2,0 V.



**Figura III.27** Diagrama característico obtido para o propilparabeno em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial aplicado: 1,2 V. Propilparabeno: (1)  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ; (2)  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; (3)  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ; (4)  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ; (5)  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ; (6)  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ; (7)  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ; (8)  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ; (9)  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Vazão:  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

As curvas analíticas obtidas a partir do diagrama da Figura III.27 (corrente versus concentração de PrPa) estão apresentadas na Figura III.28.

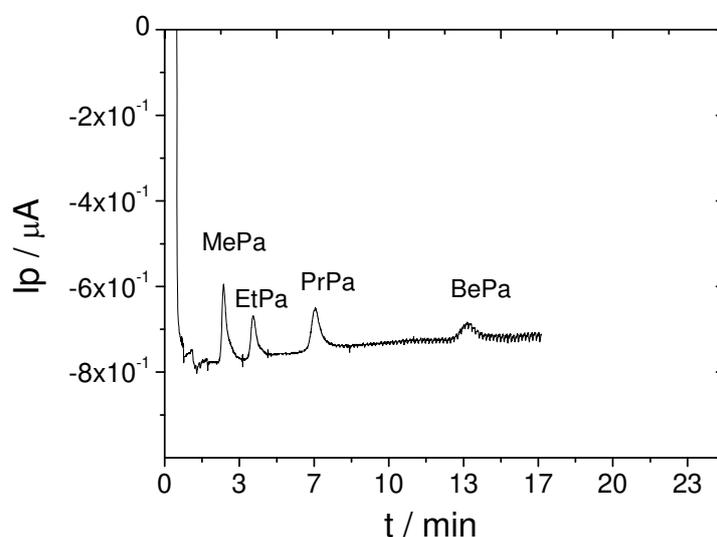


**Figura III.28** Curvas analíticas referentes ao fiograma da Figura III.27.

Conforme a Figura III.28 pode-se verificar que ocorre uma diminuição nas correntes para uma mesma concentração do parabeno na primeira curva (representada como curva A na Figura III.28) em relação à segunda curva (representada como curva B na Figura III.28). Como as medidas foram realizadas sucessivamente e sem limpeza do eletrodo, pode-se afirmar que com o sistema operando em fluxo também ocorre uma perda da superfície ativa do eletrodo. Esses resultados sugerem que é necessário realizar etapas de limpeza do eletrodo durante as medidas.

Uma vez que o objetivo seria acoplar a célula eletroquímica no HPLC e que seria usada uma fase móvel com solvente orgânico (acetonitrila), foi verificado o comportamento do eletrodo durante a separação dos parabenos na coluna cromatográfica. Um cromatograma característico está apresentado na

Figura III.29. Os parabenos tiveram separação adequada nas condições previamente estabelecidas, no entanto, verifica-se uma razão sinal-ruído elevada. Em adição, houve problema com a célula confeccionada em acrílico, uma vez que a mesma não é resistente ao solvente. Sendo assim, seria necessário confeccionar uma nova célula em um material inerte como teflon, o que não foi possível de ser realizado durante o desenvolvimento deste trabalho.



**Figura III.29** Cromatograma característico para o metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e benzilparabeno, todos na concentração de  $15 \text{ mg L}^{-1}$ . Detector eletroquímico: eletrodo DDB. Coluna analítica: octadecil, fase móvel: tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 + acetonitrila (45:55 v/v). Vazão:  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ ; potencial: 1,2 V.

Embora os resultados obtidos são muito incipientes e muitos estudos ainda teriam que ser realizados, fica evidenciada a potencialidade do eletrodo de diamante em um detector eletroquímico para a cromatografia líquida de alta eficiência.

## **CAPÍTULO IV**

### **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM ANTITRANSPIRANTES USANDO HPLC**

## **IV.1 Objetivos**

O objetivo geral do trabalho apresentado neste capítulo foi otimizar e validar um método usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de metilparabeno, etilparabeno e propilparabeno em antitranspirantes tipo *roll on*.

Os objetivos específicos compreenderam:

Analisar amostras de antitranspirantes e comparar os resultados obtidos pelo método voltamétrico descrito no capítulo III com os obtidos pelo método cromatográfico;

Analisar amostras para avaliar se os antitranspirantes comercializados na região de Campinas estão em conformidade com a legislação vigente.

## **IV.2 Procedimento Experimental**

### ***IV.2.1 Equipamentos***

As análises cromatográficas foram realizadas empregando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Varian, EUA), modelo ProStar composto por uma bomba de duplo pistão, injetor (Varian, EUA), modelo 210 com amostrador de 20  $\mu\text{L}$ ; detector UV-VIS (Varian, EUA), modelo ProStar. A aquisição de dados foi realizada mediante interface Star. Alguns estudos foram realizados em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, EUA), composto por uma bomba de duplo pistão (Waters, EUA), modelo 510, injetor 7725 (Rheodyne, EUA), com amostrador de volume 20  $\mu\text{L}$ ; detector UV-VIS 486 (Waters,

EUA) e integrador (Waters, EUA) ou equipamento Waters (EUA), constituído de um sistema de bombas binárias (modelo 1525), detector de arranjo de diodos Waters 2996, injetor manual Rheodyne (modelo 7725) e alça de amostragem de 50  $\mu$ L. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa computacional Millennium (Waters, EUA).

O banho de ultra-som USC 700 (Unique Thorton, Brasil) foi utilizado no preparo de amostras e na degaseificação da fase móvel.

Para preparo de amostra foi utilizada uma centrífuga Excelsius II (Fanem, Brasil).

A extração em fase sólida (SPE) empregada no preparo de amostras foi realizada utilizando um sistema de vácuo (Alltech, EUA) com capacidade para 12 cartuchos.

#### ***IV.2.2 Colunas Cromatográficas***

A coluna empregada no estudo em questão foi a coluna analítica octadecil híbrida X Terra RP 18 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m (Waters, EUA) e coluna de guarda X Terra RP 18 20 x 3,9 mm, 5  $\mu$ m (Waters, EUA). Alguns estudos foram realizados utilizando a coluna de fase reversa C<sub>18</sub> LiChroCART® (125 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m (Merck, Alemanha).

#### ***IV.2.3 Cartuchos para Extração em Fase Sólida (SPE)***

No preparo das amostras de antitranspirantes foram empregados cartuchos de extração em fase sólida C<sub>18</sub> Bond Elut, 500 mg, 3 mL (Varian, EUA).

#### ***IV.2.4 Reagentes***

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e no preparo de soluções utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (resistência 18,2 MΩ cm) (Millipore, EUA).

Foram utilizados acetonitrila (ACN), (Merck, Alemanha) e metanol (MeOH) (J. T. Baker, EUA).

#### ***IV.2.5 Padrões Analíticos***

Os padrões analíticos utilizados foram metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e benzilparabeno, todos com uma pureza de 99% (Sigma, EUA).

#### ***IV.2.6 Preparo das soluções estoque e de trabalho***

A solução estoque dos conservantes MePa, EtPa e PrPa, de concentração 1000 mg L<sup>-1</sup>, foi preparada mediante diluição de quantidades exatamente pesadas dos padrões analíticos em acetonitrila. O benzilparabeno (BePa) foi utilizado como padrão interno e a solução estoque de concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada mediante dissolução do padrão analítico em acetonitrila. A solução de trabalho de parabenos e a solução de padrão interno, na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, foram preparadas mediante diluição das soluções estoques com água Milli Q. As soluções de trabalho em concentrações de 2 a 10 mg L<sup>-1</sup> empregadas na construção das curvas analíticas foram preparadas diariamente, mediante diluição das soluções estoque com água Milli Q.

## ***IV.2.7 Procedimentos***

### ***IV.2.7.1 – Otimização das condições cromatográficas***

#### ***IV.2.7.1.1 – Fase Móvel***

Para a separação dos parabenos por HPLC foram avaliadas duas fases estacionárias e diferentes composições de fase móvel conforme apresentado na Tabela IV.1.

***Tabela IV.1*** Descrição das condições cromatográficas avaliadas em relação a fase estacionária e composição da fase móvel.

CONDIÇÃO CROMATOGRÁFICA	FASE ESTACIONÁRIA	COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL
A	C <sub>18</sub> LiChroCART®	H <sub>2</sub> O: ACN (65:35 v/v)
B	C <sub>18</sub> LiChroCART®	tampão fosfato 0,010 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0: ACN (65:35 v/v)
C	C <sub>18</sub> LiChroCART®	H <sub>2</sub> O: ACN (60:40 v/v)
D	C <sub>18</sub> XTerra	H <sub>2</sub> O: ACN (55:45 v/v)
E	C <sub>18</sub> XTerra	tampão fosfato 0,010 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0: ACN (55:45 v/v)
F	C <sub>18</sub> XTerra	H <sub>2</sub> O: ACN (65:35 v/v)
G	C <sub>18</sub> XTerra	H <sub>2</sub> O: ACN (60:40 v/v)

Como critério de seleção das condições otimizadas, quanto à composição de fase móvel, foram avaliados os seguintes parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico: número de pratos (N), fator de retenção (k) e fator de assimetria (As). Após estabelecimento das condições adequadas para separação dos parabenos foram construídas curvas analíticas, empregando o BePa como padrão interno, uma vez que esse parabeno não é empregado neste tipo de formulação.

#### *IV.2.7.2 – Determinação dos parabenos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)*

##### *IV.2.7.2.1 Curvas analíticas - Padronização interna*

As curvas analíticas para o MePa, EtPa, PrPa foram construídas usando cinco níveis de concentração: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>. A concentração do padrão interno foi fixada em 6,0 mg L<sup>-1</sup>. A condição cromatográfica estabelecida considera como fase estacionária, coluna analítica octadecil híbrida X-Terra; fase móvel, ACN : H<sub>2</sub>O (60:40, v/v); Vazão: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detector: UV-Vis ( $\lambda=254$  nm); volume de injeção, 20  $\mu$ L; temperatura, ambiente e eluição isocrática.

A partir das curvas analíticas foram obtidos os parâmetros: faixa linear, linearidade e sensibilidade.

#### *IV.2.7.2.2 Preparo de amostras de antitranspirantes tipo “roll on” para determinação de parabenos por cromatografia*

Etapa descrita no item III.2.5.2.2, do capítulo III, p. 32-33.

Para as medidas cromatográficas, antes de avolumar o balão com água após a extração em fase sólida, foi adicionado BePa na concentração de 6,0 mg L<sup>-1</sup> (padrão interno). A quantificação dos parabenos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, usando uma coluna octadecil, conforme procedimento descrito no Capítulo IV.

#### *IV.2.8 Validação do método para a determinação dos conservantes MePa, EtPa e PrPa em amostras de antitranspirantes tipo roll on*

Após desenvolvimento do método cromatográfico, ele foi validado mediante avaliação das seguintes figuras de mérito: seletividade, sensibilidade, linearidade, faixa linear, precisão e exatidão. Os critérios de aceitação estão de acordo com os valores preconizados pela ANVISA, Resolução N° 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003).

##### *IV.2.8.1 Seletividade*

A seletividade foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos para uma amostra isenta de parabenos (AT12) e para a mesma amostra fortificada com MePa, EtPa e PrPa e o padrão interno (BePa), nas concentrações de 6 mg L<sup>-1</sup> com o objetivo de avaliar a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem comprometer a determinação de cada

um dos parabenos. Além disso, avaliou-se possíveis produtos de degradação dos conservantes submetidos a condições de estresse (luz – lâmpada fluorescente por 24 horas; calor – estufa 60°C por 24 horas; meio ácido (solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>); meio básico (solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>); oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5%, v/v)) e a presença de possíveis interferentes, tais como fenoxietanol e ácido- 4 hidroxibenzóico (4-HBA).

Como critério de aceitação foi estabelecido que as repostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos deveriam ser inferiores a 2 % das repostas dos respectivos analitos. Possíveis interferentes como fenoxietanol e 4-HBA foram avaliados.

#### *IV.2.8.2 Linearidade*

A linearidade foi determinada através do coeficiente de correlação (r) entre as repostas dos analitos nas soluções de trabalho e as concentrações correspondentes destes compostos nas curvas analíticas. Para a determinação deste parâmetro foram utilizados cinco níveis de concentração numa faixa de 2,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup>. O padrão interno foi adicionado às soluções na concentração de 6,0 mg L<sup>-1</sup>. O critério de aceitação foi uma linearidade de 0,99.

#### *IV.2.8.3 Exatidão*

A exatidão foi avaliada mediante teste de recuperação, avaliado a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações distintas (ANVISA): limite inferior (2 mg L<sup>-1</sup>), limite superior (10 mg L<sup>-1</sup>), e ponto médio (6 mg L<sup>-1</sup>), da curva analítica. As

amostras correspondentes às três níveis de fortificação foram preparadas em triplicata e o método foi considerado exato quando o resultado médio obtido para a recuperação esteve compreendido entre 90 % e 110 % do valor teórico, em cada um dos três níveis de concentração.

#### *IV.2.8.4 Precisão*

A repetibilidade foi avaliada através de análises realizadas em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, considerando 6 determinações ( $n = 6$ ) sobre as amostras na diluição correspondente a concentração de 100 % da curva analítica. O critério de aceitação foi que o coeficiente de variação (CV %) fosse inferior ou igual a 5 %.

#### *IV.2.8.5 Limite de detecção e quantificação*

O limite de quantificação não foi estabelecido uma vez que os parabenos se encontram em elevada concentração na amostra do cosmético (na ordem de  $\text{mg g}^{-1}$ ). No entanto, foi avaliado o limite de detecção, mediante análise de concentrações decrescentes dos parabenos para permitir reportar um valor estimado, quando no cromatograma na análise de amostras não fosse verificada a presença dos parabenos.

## **IV.3 Resultados e Discussão**

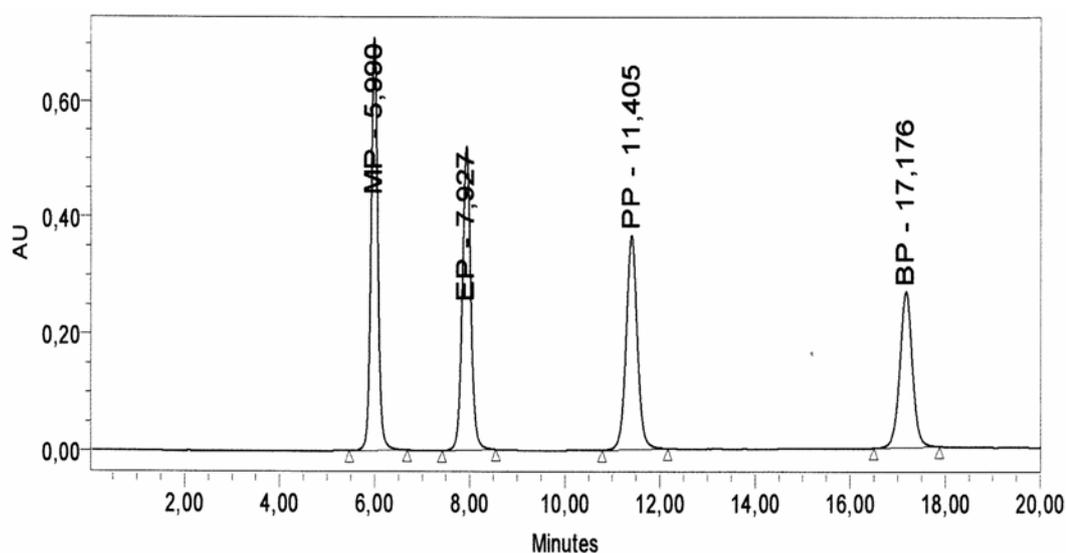
### ***IV.3.1 Desenvolvimento do Método Cromatográfico***

Como critério de seleção das condições otimizadas, quanto à composição da fase móvel, foram avaliados os seguintes parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico: fator de retenção ( $k$ ), eficiência ( $N$ ) e fator de assimetria ( $A_s$ ). Como critérios de aceitação foram considerados os seguintes valores:  $1 < k < 10$ ;  $N > 2000$ ;  $0,8 < A_s < 2,0$ , recomendados por SHABIR e colaboradores (2004) e os valores encontrados para estes parâmetros estão relacionados na Tabela IV.2.

**Tabela IV.2** Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos com as condições cromatográficas (A a G) descritas na Tabela IV.1.

<b>Condição A</b>					<b>Condição B</b>			
<i>Conservantes</i>	<i>MePa</i>	<i>EtPa</i>	<i>PrPa</i>	<i>BePa</i>	<i>MePa</i>	<i>EtPa</i>	<i>PrPa</i>	<i>BePa</i>
<i>N</i>	6638	17389	14764	18285	1048	1361	3943	-
<i>As</i>	1,0	2,0	0,5	0,7	1,8	1,0	3,5	-
<i>k</i>	1,3	3,3	6,2	13,6	1,6	3,5	6,7	-
<b>Condição C</b>					<b>Condição D</b>			
<i>N</i>	5947	11055	24595	33161	6949	16744	44120	61600
<i>As</i>	1,2	1,3	1,3	1,0	1,0	1,3	1,3	1,2
<i>k</i>	1,3	2,1	3,7	7,1	1,0	1,6	2,6	4,7
<b>Condição E</b>					<b>Condição F</b>			
<i>N</i>	1166	6793	3000	18550	1253	1207	1717	1556
<i>As</i>	2,0	1,6	1,2	1,3	0,7	0,6	0,9	1,0
<i>k</i>	1,4	3,3	6,2	13,6	0,6	0,8	1,1	1,6
<b>Condição G</b>								
<i>N</i>	8233	20950	56939	64485	⇒ CONDIÇÃO ÓTIMA DE TRABALHO: <b>CONDIÇÃO G</b>			
<i>As</i>	1,1	1,1	1,1	1,1				
<i>k</i>	1,4	2,3	3,7	6,1				

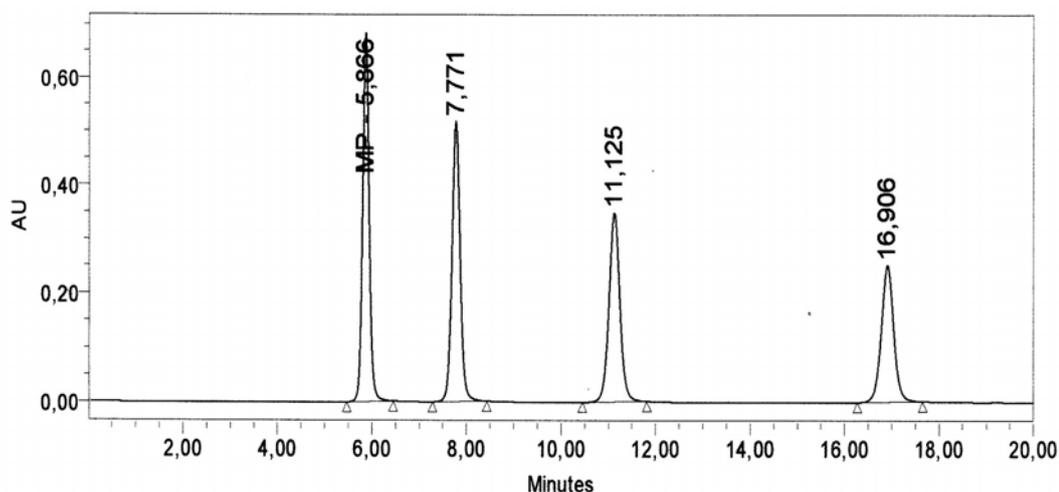
Os valores encontrados na tabela IV.2 indicam como condição ótima de trabalho: fase estacionária, coluna analítica octadecil híbrida X-Terra; fase móvel, ACN : H<sub>2</sub>O (60:40, v/v); Vazão: 1 mL min<sup>-1</sup>; Detector: UV-Vis ( $\lambda=254$  nm); volume de injeção, 20  $\mu$ L; temperatura, ambiente; eluição, isocrática. Um cromatograma característico obtido para os parabenos, nas condições descritas acima, está representado na Figura IV.1.



**Figura IV.1** Cromatograma obtido para os parabenos na concentração de 20,0 mg L<sup>-1</sup>, usando BePa 6,0 mg L<sup>-1</sup> como padrão interno. Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, v/v); vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda = 254$  nm. Tempos de retenção ( $t_r$ ): MePa:  $t_r = 5,9$  min; EtPa:  $t_r = 7,9$  min; PrPa:  $t_r = 11,4$ min ; BePa:  $t_r = 17,1$  min.

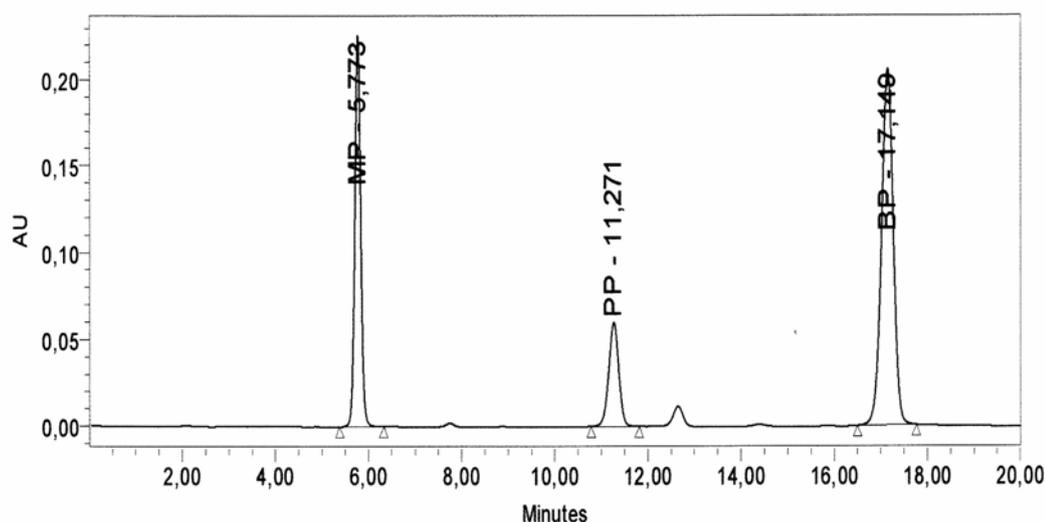
#### IV.3.1.1 Eficiência de extração dos parabenos nos cartuchos octadecil

Inicialmente foram realizados alguns estudos verificando a possibilidade de apenas diluir a amostra com a fase móvel antes da análise cromatográfica. Mas dependendo da amostra, foi verificada a presença de interferentes no tempo de retenção dos analitos e também esse procedimento levaria a comprometer o tempo de vida útil da coluna cromatográfica. Sendo assim, esse procedimento foi abandonado. Como alternativa, foi avaliado o emprego da extração em fase sólida, usando cartuchos octadecil. Tendo em vista o caráter apolar das moléculas dos parabenos foi adotado o seguinte procedimento de extração em fase sólida: condicionamento do cartucho com metanol e água, aplicação dos parabenos em água, lavagem dos cartuchos com água e eluição com acetonitrila. Empregando apenas uma solução padrão contendo os parabenos em estudo e o padrão interno foram obtidas as seguintes eficiências de extração: MePa 100,3 %, EtPa 97,0 %, PrPa 101,0 % e BePa 97,0 %, que estão representadas pelos cromatogramas apresentados nas Figuras IV.1 (parabenos sem passar pelo cartucho) e Figura IV.2 (parabenos passando pelo cartucho). Esse resultado indica que os parabenos têm uma afinidade adequada pelo sorvente extrator.



**Figura IV.2** Cromatograma obtido para os parabenos na concentração de 20,0 mg L<sup>-1</sup>, após extração em fase sólida, usando BePa 6,0 mg L<sup>-1</sup>. Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, v/v); vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda = 254$  nm. Tempos de retenção ( $t_r$ ): MePa:  $t_r = 5,8$ ; MePa:  $t_r = 7,7$ ; PrPa:  $t_r = 11,1$ ; BePa:  $t_r = 16,9$ .

Considerando os valores da eficiência de extração foi verificado que não haveria necessidade de construir a curva analítica sobre a matriz isenta de parabenos, o que de qualquer forma seria um problema uma vez que as matrizes são diferentes em função do fabricante do produto cosmético. A Figura IV.3 apresenta o cromatograma característico obtido para a amostra AT 4 após passar pelo preparo de amostra descrito no III.2.5.2.2.



**Figura IV.3** Cromatograma obtido para a amostra AT 4 após extração em fase sólida, usando BePa 6,0 mg L<sup>-1</sup>. Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel: H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, v/v); vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda = 254$  nm. Tempos de retenção ( $t_r$ ): MePa:  $t_r = 5,7$ ; PrPa:  $t_r = 11,2$ ; BePa:  $t_r = 17,1$ .

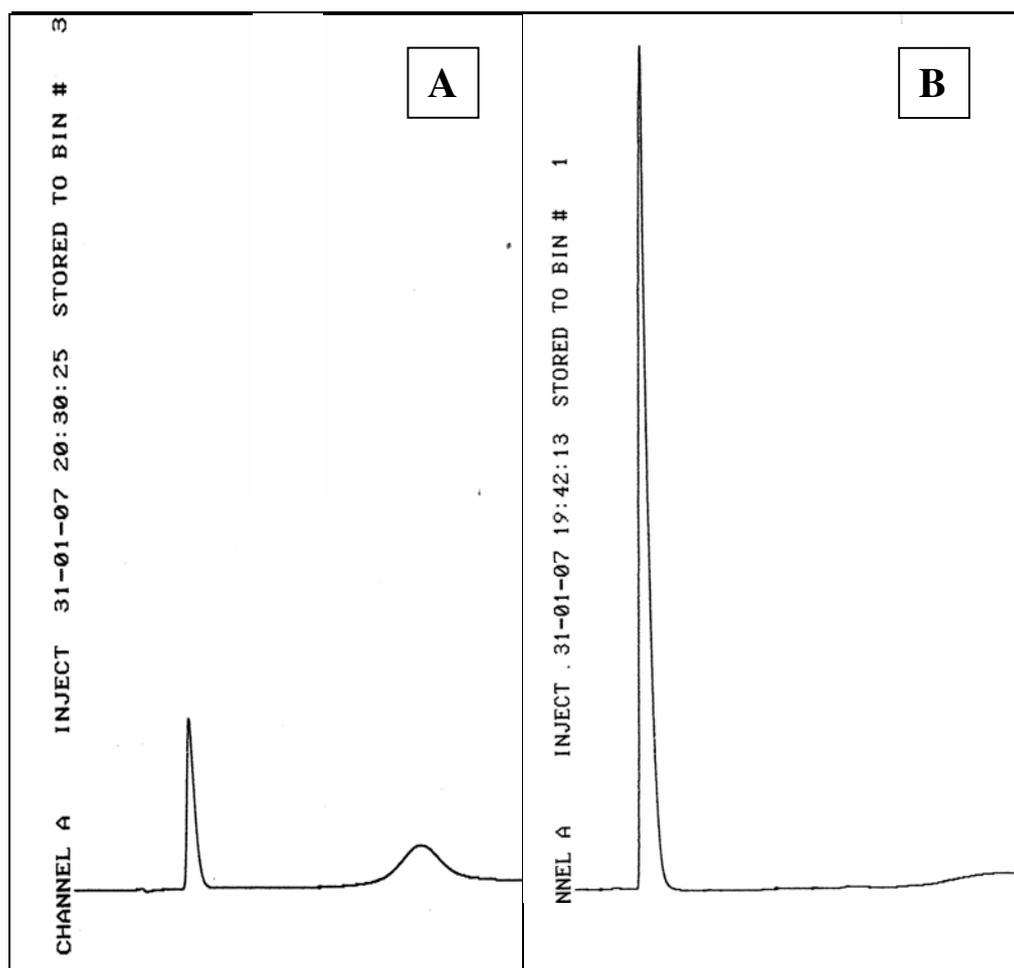
Conforme o cromatograma, verifica-se na amostra AT4 a presença de MePa e PrPa. O último pico é referente ao BePa, que foi usado como padrão interno. Ainda, não são verificados interferentes presentes no cromatograma no comprimento de onda avaliado (254 nm). Esses resultados estão de acordo com o declarado pelo fabricante, onde consta no rótulo da embalagem a presença de MePa e PrPa (pág. 60).

#### IV.3.1.2 Validação de metodologia analítica

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Conforme a classificação proposta pela IUPAC (THOMPSON e

cols, 2002), os procedimentos de validação podem ser divididos entre (1) validação completa (*full validation*) e (2) validação do método em um único laboratório (*single-laboratory validation*). O procedimento envolvido no presente trabalho teve como foco a validação do método analítico para um laboratório. Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) usados para avaliar o método cromatográfico desenvolvido no presente trabalho foram: linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão intra-ensaio e exatidão. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela IV.3.

A Figura IV.4 apresenta os cromatogramas obtidos para os possíveis interferentes, (A) fenoxietanol e (b) 4-HBA, que têm como tempos de retenção ( $t_r$ ) 2,1 min e 1,2 min, respectivamente. Assim sendo, estes compostos não afetam a seletividade do método porque não eluem no mesmo tempo de retenção que os analitos de interesse. Os resultados obtidos após exposição à condição de estresse, não apresentaram produtos de degradação que afetassem a seletividade do método. Portanto, o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para determinação de parabenos em antitranspirantes.



**Figura IV.4** Cromatogramas obtidos para (A) fenoxietanol e (B) 4-HBA, na concentração de  $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Fase estacionária: X Terra RP 18; Fase móvel:  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  (60:40, v/v); vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . Tempos de retenção ( $t_r$ ): (A)  $t_r = 2,1 \text{ min}$ ; (B)  $t_r = 1,3 \text{ min}$ .

**Tabela IV.3** Figuras de mérito obtidas para os parabenos utilizando HPLC.

<b>Figuras de Mérito</b>	<b>MePa</b>	<b>EtPa</b>	<b>PrPa</b>
<b>Equação da Reta</b>	u.A = 0,183 C + 0,391	u.A=0,172 C + 0,348	u.A = 0,165 C + 0,380
<b>Faixa linear de trabalho (mg L<sup>-1</sup>)</b>	2,0 – 10,0	2,0 – 10,0	2,0 – 10,0
<b>Linearidade (r)</b>	0,9988	0,9984	0,9948
<b>Sensibilidade u.a* /mg L<sup>-1</sup></b>	0,183	0,172	0,165
<b>Exatidão (% recuperação)</b>			
<b>2 mg L<sup>-1</sup></b>	100,8	100,6	91,0
<b>6 mg L<sup>-1</sup></b>	97,9	97,0	95,7
<b>10 mg L<sup>-1</sup></b>	102,5	100,5	100,5
<b>Precisão intra-ensaio (CV %), n=6</b>			
<b>2 mg L<sup>-1</sup></b>	2,8	4,2	2,8
<b>6 mg L<sup>-1</sup></b>	0,4	0,4	0,3
<b>10 mg L<sup>-1</sup></b>	2,4	1,8	0,2
<b>Limite de detecção</b>	0,002 % m/m	0,002 % m/m	0,002 % m/m

\*u.a: unidade de área.

Diferentes amostras de antitranspirantes *roll on* foram adquiridas no comércio de Campinas, SP e analisadas pelo método cromatográfico validado. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela IV.4. Todas as análises foram realizadas em sextuplicata, sendo apresentados os valores médios de cada parabeno. Entre parênteses estão apresentados o coeficiente de variação das replicatas.

**Tabela IV.4** Teores de parabenos nas amostras de antitranspirantes do tipo *roll on*.

<i>Amostra</i>	<i>MePa (% m/m)</i>	<i>EtPa (% m/m)</i>	<i>PrPa % m/m)</i>	<i>Parabenos totais* (% m/m)</i>
<i>AT 1</i>	0,025 (4,9 %)	< LOD	< LOQ	0,025
<i>AT 2</i>	0,27 (2,5 %)	< LOD	0,082 (2,4 %)	0,35
<i>AT 3</i>	0,21 (1,9 %)	< LOD	0,039 (1,9 %)	0,25
<i>AT 4</i>	0,26 (1,9 %)	< LOD	0,019 (1,2 %)	0,28
<i>AT 5</i>	0,040 (4,8 %)	< LOD	0,020 (4,9 %)	0,06
<i>AT 6</i>	0,26 (3,4 %)	< LOD	0,011 (1,6 %)	0,27
<i>AT 7</i>	0,17 (1,7 %)	< LOD	0,048 (4,1 %)	0,22
<i>AT 8</i>	0,28 (1,1 %)	< LOD	0,103 (0,9 %)	0,38
<i>AT 9</i>	0,29 (0,9 %)	< LOD	< LOQ	0,29
<i>AT 10</i>	0,23 (1,1 %)	< LOD	0,10 (1,1 %)	0,24
<i>AT 11</i>	0,21 (1,4 %)	< LOD	< LOD	0,21
<i>AT 12</i>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<i>AT 13</i>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

\*Somatória de *MePa*, *EtPa* e *PrPa*. LOD: 0,002 % m/m.

Pelos resultados obtidos verifica-se que as amostras apresentam um teor de parabenos totais em uma concentração máxima de 0,38 % (m/m), estando todas as amostras analisadas em conformidade com a legislação vigente (concentração máxima permitida de 0,8 % m/m para parabenos totais e 0,4 % m/m para a presença de apenas um parabeno na formulação). O EtPa não foi detectado nas amostras analisadas e o MePa esteve em concentração maior do

que o PrPa em todas as amostras que continham parabenos em sua formulação. A precisão dos resultados foi menor do que 5 %.

Quanto a declaração dos conservantes no rótulo da embalagem, em particular parabenos, as amostras AT2, AT3, AT4, AT8, AT9, AT10 estão de acordo com o declarado. As amostras AT12 e AT13 não contem parabenos e nos rótulos também não foi informada a presença destes. Quanto as demais amostras foi verificado:

- AT1: não foi declarada a presença específica de parabenos. Apenas foi informada a presença de conservantes. A amostra contem MePa.
- AT5 e AT6: apenas foi declarada a presença de MePa, no entanto, as amostras contem também PrPa.
- AT7: o fabricante apenas declarou a presença de parabenos sem especificar quais os compostos estão presentes. Foi verificada a presença de MePa e PrPa.
- AT11: o fabricante declarou a presença de MePa e PrPa, no entanto, apenas foi verificada a presença de MePa.

Vale ressaltar que de modo geral a descrição da composição química no rótulo da embalagem não é uniformizado e depende do fabricante. Além disso, verifica-se a descrição de 4 a 25 compostos diferentes presentes nas formulações, ou seja, na maioria dos casos os rótulos são incompletos.

# **CAPÍTULO V**

## **CONCLUSÕES**

## V. CONCLUSÕES

### V.1 Voltametria

- Os resultados obtidos demonstram que os parabenos sofrem oxidação no eletrodo de diamante dopado com boro e que o sinal analítico (corrente anódica) é adequado para fins quantitativos;
- Como a oxidação do MePa, EtPa, PrPa e BePa envolve o mesmo grupo funcional, comum aos quatro parabenos, não é possível diferenciar entre os parabenos usando a voltametria cíclica ou mesmo a voltametria de onda quadrada. No entanto, como a sensibilidade para os diferentes parabenos não difere significativamente é possível realizar a quantificação de parabenos totais na amostra. Esse parâmetro é relevante uma vez que a legislação vigente estabelece um teor máximo de 0,8 % m/m de parabenos totais em produtos cosméticos.
- Durante o processo redox dos parabenos no eletrodo de diamante ocorrem fenômenos de adsorção que levam a passivação da superfície eletródica em medidas sucessivas o que vem a comprometer a repetibilidade das medidas. O uso de padrão interno demonstrou ser uma alternativa interessante para corrigir a perda da área ativa durante a análise de amostras.
- A hidroquinona mostrou ser um padrão interno viável uma vez que oxida em potencial menor do que os parabenos;
- O eletrodo de diamante dopado com boro é adequado para medidas em fluxo, o que permite usá-lo como detector amperométrico para medidas por FIA ou HPLC;

- 
- Para diminuir a passivação da superfície eletródica é necessário fazer um *clean-up* da amostra de antitranspirantes anterior determinação voltamétrica. Neste contexto, o melhor procedimento foi a extração em fase sólida usando cartuchos octadecil.
  - De acordo com os resultados obtidos o método voltamétrico empregado possibilitou a determinação de parabenos totais em amostras de antitranspirantes, sem a necessidade de preparos de amostra diferentes do que àquele empregado para análise cromatográfica. Desta forma, a extração em fase sólida se mostra promissora para a extração de parabenos de amostras de antitranspirantes e determinação por voltametria cíclica em conjunto com o eletrodo DDB.
  - Como desvantagem do método voltamétrico destacamos a impossibilidade da confirmação de identidade.

## V.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

- A cromatografia líquida de alta eficiência, usando uma coluna de fase reversa octadecil e fase móvel composta de água:acetonitrila é adequada para a separação de MePa, EtPa, PrPa e BePa. As amostras de antitranspirantes de diferentes procedências e marcas comerciais não apresentam interferentes em potencial que possam afetar a exatidão dos resultados.
- A extração em fase sólida é recomendada para limpeza da amostra anterior análise cromatográfica. O caráter apolar dos parabenos justifica o uso de cartuchos octadecil, levando a uma elevada eficiência de extração e eliminação de outros compostos concomitantes da matriz.
- O método cromatográfico desenvolvido mostrou-se adequado aos objetivos que se propõe.

Das doze amostras analisadas de fabricantes diferentes, todas estavam em conformidade com a legislação vigente quanto à concentração de parabenos permitida para os antitranspirantes. No entanto, apenas 66 % apresentaram nos rótulos da embalagem a descrição completa dos parabenos contidos na formulação.

# **CAPÍTULO VI**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VI. REFERÊNCIAS

- ALI, M. S.; GHORI M.; KHETRI, A. R. Stability indicating simultaneous determination of domperidone (DP), methylparaben (MP) and propylparaben by high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 358-365, 2006.
- ANVISA, 2000. *RDC nº 79 de 28 de agosto de 2000, republicada no D.O. de 02/10/2001*. [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/162\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/162_01rdc.htm), acessado em fevereiro de 2008).
- ANVISA, 2001. *RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001, republicada no D.O. de 02/10/2001*. [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/162\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/162_01rdc.htm), acessado em fevereiro de 2008).
- ANVISA, 2008. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/antitranspirante.htm> acessado em fevereiro de 2008.
- ANVISA, 2003. *Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 – ANVISA/MS, 2003*.
- ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. P. Aditivos em alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA - UNICAMP), 1983.
- BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; MARKS, J. G.; ANDERSEN, F. A. Safety of ingredients used in cosmetic. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 52, n. 1, p. 125-132, 2005.
- BORREMANS, M.; LOCO, J. V.; 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, n. 1/2, p. 47-53, 2004.
- CARVALHO, R. M.; KUBOTA, L. T.; RATH, S. Influence of EDTA on the electrochemical behavior of phenols. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 548, p. 19-26, 2003.

- CODOGNATO, L.; ZUIN, V. G.; SOUZA, D.; YARIWAKE, J. H.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Electroanalytical and chromatographic determination of pentachlorophenol and related molecules in a contaminated soil: a real case example. *Microchemical Journal*, v. 77, p. 177-184, 2004.
- COVINGTON, T. R. Handbook of Nonprescription Drugs, *American Pharmaceutical Association*, ed. 11, 1996.
- DARBRE, P. D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W. R.; GOLDHAM, N. G.; SAUER, M. J. Oestrogenic activity of benzylparaben. *Journal of Applied Toxicology*, v. 23, p. 43-51, 2003.
- DARBRE, P. D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W. R.; GOLDHAM, N. G.; SAUER, M. J. Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*, v. 24, p. 5-13, 2004.
- EC, European Commission, Regulation 76/768/EEC. Implementing Council Directive 2003/83/EC concerning the restrictions on materials listed in Annex VI of Directive 76/768/EEC on cosmetic products. *Official Journal of European Communities*, 2005.
- FRANCO, B. D. G. M. ; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*, Editora Atheneu, 1996.
- FUJISHIMA, A.; RAO, T. N. *Diamond and Related Materials*, n. 10, p. 1799-1803, 2001.
- GANDINI, D.; MICHAULD, P. DUO, I.; MACHÉ, E. HAENNI, W. PERRET, A. COMNINELLIS, C. *New Diamond and Frontier Carbon Technology*, v.9, n. 5, p. 301-316, 1999.
- GATTRELL, M.; KIRK, D. W. A study of electrode passivation during aqueous phenol electrolysis. *Journal of Electrochemical Society*, n. 9, p. 384-389, 2000.
- GOLDEN, R.; GANDY, J.; VOLLMER, G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 35, p. 435-458, 2005.

- GROSA, G.; GROSSO, E. D.; RUSSO, R.; ALLEGRONE, G. Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propylparaben in cough syrup. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 798-803, 2006.
- GUENBOUR, A.; KACEMI, A.; BENBACHIR, A.; ARIES, L. Electropolymerization of 2-aminophenol - Electrochemical and spectroscopic studies. *Prog. Org. Coat*, v. 38, n. 2, p. 121-126, 2000.
- HANDA, O.; KOKURA S.; ADACHI, S.; TAKAGI, T.; NAITO, Y.; TANIGAWA, T.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*, v. 227, p. 62-72, 2006.
- HARVEY, P. W.; EVERETT, D. J. Significance of the detection of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*, v. 24, p. 1-9, 2004.
- HAVLÍKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P. HPLC determination of calcium pantothenate and two preservatives in topical cream. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 671-675, 2006.
- 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, p. 166-171, 2006.
- IVANDINI, T. A.; HONDA, K.; RAO, T. N. FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y. Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography. *Talanta*, v. 71, p. 648-655, 2007.
- JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Editora Acribia S.A, 3ª ed, 1992.
- KOKOLETSI, M. X.; KAFKALA, S.; TSIAGANIS, M. A novel gradient HPLC method for simultaneous determination of ranitidine, methylparaben and propylparaben in oral liquid pharmaceutical

- formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 763-767, 2005.
- KOLLMORGEN, D.; KRAUT, B. Determination of methylparaben, propylparaben and chlorpromazine in chlorpromazine hydrochloride oral solution by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 707, p. 181-187, 1998.
- 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, 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. *Journal of Chromatography A*, v. 1120, p. 244-251, 2006.
- MASTEN, S. Final Review of Toxicological Literature for Parabens. p. 1-55, 2004.
- OISHI, S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 1807-1813, 2002
- OISHI, S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of *p*-hydroxybenzoic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 1845-1849, 2004
- OLIVEIRA, R. T. S.; GIANCARLO, R.; BANDA, S.; SANTOS, M. C.; CALEGARO, M. L.; MIWA, D. W.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Electrochemical oxidation of benzene on boron-doped diamond electrodes. *Chemosphere*, v. 66, p. 2152-2158, 2007.
- PAPA, C. M.; KLINGMAN, A. M. Mechanisms of eccrine anhidrosis: II. The antiperspirant effect of aluminum salts. *J. Invest. Dermatol*, 1967, 49:139.
- PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, 1997.

- PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Is the boron-doped diamond electrode a suitable substitute for mercury in pesticide analyses? A comparative study of 4-nitrophenol quantification in pure and natural waters. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 573, p. 11-18, 2004.
- PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. *Química Nova*, v. 26, p. 844-849, 2003.
- PREECHAWORAPUN, A.; CHUANUWATANAKUL, S.; EINAGA, Y.; GRUDPAN, K.; MOTOMIZU, S.; CHAILAPAKUL, O. Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode. *Talanta*, v. 68, p. 1726-1731, 2006.
- RAO, T. N.; FUJISHIMA, A. Recent advances in electrochemistry of diamond. *Diamond and Related Materials*, n. 9, p. 384-389, 2000.
- RASTOGI, S. C.; SCHOUTEN, A.; KRUIJF, N.; WEIJLAND, J. W. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis*, v. 32, p. 28-30, 1995.
- REBBECK, C.; HAMMOND, R.; WONG, N.; NAIR, L.; RAGHAVAN, N. Solid-phase extraction and HPLC analysis of methylparaben and propylparaben in a concentrated antibiotic suspension, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 32, p. 1095-1102, 2006.
- Resolução n.º 79, de 28 de agosto de 2000, publicada em DOU de 31/08/00.
- ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, v. 21, p. 119 – 125, 2000.
- ROSSI, A., DESIDERIO, C. Fast capillary electrochromatographic analysis of parabens and 4-hydroxybenzoic acid in drugs and cosmetics. *Electrophoresis*, v. 23, p. 3410-3417, 2002.

- SAAD, B.; BARI, M. F.; SALEH, M. I.; AHMAD, K.; TALIB, M. K. M. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1073, p. 393 – 397, 2005.
- SALAZAR-BANDA, G. R.; ANDRADE, L. S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L.A. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. *Electrochimica Acta*, v.51, p. 4612 – 4619, 2006.
- SCHNUCH, A.; GEIER, J.; UTER, W.; FROSCH, P. J. Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. *British Journal of Dermatology*, v. 138, p. 467-476, 1998.
- SHABIR, G. A. Determination of combined *p*-hydroxy benzoic acid preservatives in a liquid pharmaceutical formulation by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 34, p. 207-213, 2004.
- SHABIR, G. A.; LOUGH, W. J.; ARAIN, S. A.; SHAR, G. Q. Method development and validation of preservatives (phenylformic acid, 2,4-hexadienoic acid, methyl 4-hydroxybenzoate, and propyl 4-hydroxybenzoate) by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 29, p. 1223-1233, 2006.
- 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. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 48-54, 2007.
- SIMÃO, A. M. *Aditivos para alimentos sob aspecto toxicológico*. Editora Nobel, 2<sup>a</sup> ed, 1989.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*. Philadelphia, Saunders College Publishing, p. 917, 1998.

- SOTTOFATTORI, E.; ANZALDI, M.; BALBI, A.; TONELLO, G. Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 18, p. 213-217, 1998.
- SPATARU, T.; SPATARU, N.; FUJISHIMA, A. Detection of aniline at boron-doped diamond electrodes with cathodic stripping voltammetry. *Talanta*, v. 73, p. 404-406, 2007.
- SUZUKI, A.; IVANDINI, T. A.; KAMIYA, A.; NOMURA, S.; YAMANUKI, M.; MATSUMOTO, K.; FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y. Direct electrochemical detection of sodium azide in physiological saline buffers using highly boron-doped diamond electrodes. *Sensors and Actuators B*, v. 120, p. 500-507, 2007.
- TEÓFILO, R. F. Métodos Quimiométricos em Estudos Eletroquímicos de Fenóis sobre Filmes de Diamante Dopado com Boro. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, (115 P), 2007.
- THOMPSON, M.; STEPHEN, L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report) *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, p.835-855, 2002.
- WINTER, E. Influência de compostos carboxílicos e íons metálicos na degradação de neurotransmissores. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP (182 p), 2007.
- YE, X.; KUKLENYIK, Z.; BISHOP, A. M.; NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M. Quantification of the urinary concentration of parabens in humans by on-line solid phase extraction high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 844, p. 53-59, 2006.
- ZHANG, Q.; LIAN, M.; LIU, L.; CUI, H. High-performance liquid chromatographic assay of parabens in wash-off cosmetic products and food using chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 537, p. 31-39, 2005.