



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MARIA FERNANDA ARAUJO VIEIRA MATOS

**MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE *N*-NITROSAMINAS EM ÁGUA E
ESMALTES DE UNHAS**

**CAMPINAS
2023**

MARIA FERNANDA ARAUJO VIEIRA MATOS

**MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE *N*-NITROSAMINAS EM ÁGUA E
ESMALTES DE UNHAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Maria Fernanda Araujo Vieira Matos e orientada pela Profa. Dra. Susanne Rath

**CAMPINAS
2023**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

M428m Matos, Maria Fernanda Araujo Vieira, 1993-
Métodos para a determinação de N-nitrosaminas em água e esmaltes de unhas / Maria Fernanda Araujo Vieira Matos. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Susanne Rath.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. N-nitrosaminas. 2. Água. 3. Cosméticos. 4. Preparo de amostra -Química. 5. Cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrometria de massas sequencial. I. Rath, Susanne, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Methods for determining N-nitrosamines in water and nail polishes

Palavras-chave em inglês:

N-nitrosamines

Water

Cosmetics

Sample preparation

Bidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Susanne Rath [Orientador]

Leandro Wang Hantao

Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Data de defesa: 28-02-2023

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0000-8610-9135>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8225336409271479>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Susanne Rath (Orientadora)

Prof. Dr. Leandro Wang Hantao (Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal (Universidade de São Paulo)

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

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **MARIA FERNANDA ARAUJO VIEIRA MATOS**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Susanne Rath, pela oportunidade, paciência, e por compartilhar seus conhecimentos. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

Ao meu esposo Leonardo por estar ao meu lado durante toda essa jornada, sempre me apoiando e me incentivando.

À minha família, pelo apoio, em especial ao meu avô Eutímio e meu padrinho Roberto, que enquanto em vida sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor.

Aos colegas e companheiros do laboratório Paracelsus, Anna Paula, Gabriela, Andreza, Tharcilla, Andreza, Larissa, Lucas e Vinicius, pela contribuição direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho, discussões científicas, conversas e momentos de descontração.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, por oferecer uma infraestrutura que proporcionaram o meu desenvolvimento ao longo do mestrado

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPESP processo nº 2021/03239-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP).

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O Brasil ocupa a segunda posição no ranking de países que mais consomem esmaltes de unhas. Embora esses cosméticos não sejam considerados de risco para o consumidor, tem sido relatada a presença de *N*-nitrosaminas que são compostos de reconhecida toxicidade. A contaminação por *N*-nitrosaminas pode ser decorrente das matérias primas utilizadas na formulação, produtos de degradação ou podem ser originados por meio de reações de nitrosação na formulação. Os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento de métodos para a determinação de *N*-nitrosodietanolamina (NDELA), *N*-nitrosomorfolina (NMOR), *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosopirrolidina (NPYR), *N*-nitrosopiperidina (NPIP), *N*-nitrosometiletilamina (NMEA), *N*-nitrosodi-*n*-propilamina (NDPLA), *N*-nitrosodibutilamina (NDBA) em água e NDELA, NMOR, NDMA e NDEA em esmaltes de unhas utilizando a cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-UHPLC-MS/MS). Para o preparo de amostras de água foram avaliados dois procedimentos: (i) filtração e (ii) a extração em fase sólida (SPE) *off-line* utilizando cartucho de carvão de casca de coco ativado. Para as amostras de esmaltes de unhas foram consideradas a extração por solvente e a SPE. A SPE permitiu a determinação das *N*-nitrosaminas em concentrações menores devido ao efeito de pré-concentração e redução do efeito matriz. Na separação cromatográfica, na primeira dimensão foi empregada uma coluna Atlantis® T3 (3 µm) e na segunda dimensão uma coluna de fase reversa Acquity UPLC® HSS T3 (1,8 µm), ambas da Waters. A amostra foi carregada com uma fase móvel de água:metanol 95:5 v/v a uma vazão de 1,25 mL min⁻¹ por 0,40 min (volume de injeção de 200 µL). A fase móvel de eluição e separação cromatográfica na segunda dimensão foi uma mistura de 0,01% de ácido fórmico em água:metanol com gradiente de eluição. A interface foi uma fonte de APCI operando no modo positivo e a quantificação no MS/MS foi realizada no modo de reações selecionadas. Os métodos foram validados. Considerando os métodos com a SPE anterior a quantificação foi possível atingir um limite de quantificação (LOQ) para as nove *N*-nitrosaminas na faixa de 0,10 – 1,0 ng mL⁻¹ para a matriz água. O método para a determinação de NDELA, NDMA, NDEA e NMOR em esmaltes de unhas foi linear na faixa de concentração de 20,0 – 80,0 ng g⁻¹. A precisão intra- e inter-dias foi de 1,5 – 11,1% e os LOQ de 20 ng g⁻¹. Foram analisadas seis amostras de esmaltes de unhas, sendo detectadas NDELA 23 – 77 ng g⁻¹; NDMA <LOQ – 100 ng g⁻¹; NMOR < LOQ. A NDEA não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Os resultados indicam a necessidade do controle de qualidade quanto a presença de impurezas de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas.

Palavras chaves: *N*-nitrosaminas, água, cosméticos, preparo de amostras, LC-UHPLC/MS-MS

ABSTRACT

Brazil occupies the second position in the ranking of countries that consume the most nail polishes. Nevertheless, while these cosmetics are not generally considered a risk for consumers, the presence of *N*-nitrosamines has been reported, which are compounds of recognized toxicity. Contamination by *N*-nitrosamines may result from the raw materials used in the formulation and degradation products or may originate through nitrosation reactions. The objectives of this work were to develop methods for the determination of *N*-nitrosodiethanolamine (NDELA), *N*-nitrosomorpholine (NMOR), *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR), *N*-nitrosopiperidine (NPIP), *N*-nitrosomethylethylamine (NMEA), *N*-nitrosodi-*N*-propylamine (NDPLA), *N*-nitrosodibutylamine (NDBA) in water and NDELA, NMOR, NDMA and NDEA in nail polishes using two-dimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-UHPLC-MS/MS). For the preparation of water samples, (i) filtration and (ii) offline solid phase extraction (SPE), using an activated coconut shell charcoal cartridge, were considered. For nail polish samples, solvent extraction and SPE were assessed. SPE allowed the determination of *N*-nitrosamines in lower concentrations due to the pre-concentration and reduction of the matrix effects. In the chromatographic separation, an Atlantis® T3 (3 μm) column was used in the first dimension and an Acquity UPLC® HSS T3 (1.8 μm) reverse phase column (1.8 μm) in the second dimension, both from Waters. The sample was loaded with water:methanol 95:5 v/v mobile phase at a flow rate of 1.25 mL min⁻¹ for 0.40 min (200 μL injection volume). The mobile phase for elution and chromatographic separation in the second dimension was a mixture of 0.01% formic acid in water:methanol under gradient elution. The interface was an APCI source operating in positive mode, and MS/MS quantification was performed in selected reaction mode. The methods were validated. Considering the methods with SPE prior to quantification, it was possible to reach a limit of quantitation (LOQ) for the nine *N*-nitrosamines in the range of 0.10 – 1.0 ng mL⁻¹ for water samples. The method for the determination of NDELA, NDMA, NDEA and NMOR in nail polish is linear in the concentration range of 20.0 – 80.0 ng g⁻¹. The intra and inter-day precision was 1.5 – 11.1%, and the LOQ was 20 ng g⁻¹. Six nail polish samples were analyzed, detecting NDELA at 23 – 77 ng g⁻¹; NDMA at <LOQ – 100 ng g⁻¹; NMOR at < LOQ. NDEA was not detected in any of the analyzed samples. The results indicate the need for quality control regarding *N*-nitrosamine impurities in nail polishes.

Keywords: *N*-nitrosamines, water; cosmetics, sample preparation, LC-UHPLC/MS-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de uma <i>N</i> -nitrosamina.....	25
Figura 2: Esquema da LC-UHPLC-MS/MS com transferência com troca de eluente da primeira coluna (LC) para a segunda coluna (coluna analítica). Posição 1: carregamento da amostra na coluna LC e Posição 2: eluição dos analitos da coluna de LC para a coluna analítica.....	53
Figura 3: Esquema de preparo das amostras de água utilizando a SPE <i>off-line</i> . Fonte: Próprio autor.....	58
Figura 4: Área da NDELA em diferentes tempos de viragem das válvulas. Solução padrão fortificada com 50 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 300 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.	67
Figura 5: Área dos analitos em diferentes tempos de viragem das válvulas. Solução padrão fortificada com 50 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 300 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.	68
Figura 6: Área dos analitos usando diferentes aditivos na fase móvel. Solução padrão fortificada com 100 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 100 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7. Coluna na primeira dimensão: Atlantis.	70
Figura 7: Cromatogramas da NDELA em função da variação do aditivo na fase móvel. (A) acetato de amônio 5 mmol/L, (B) 0,1% de ácido fórmico e (C) 0,01% de ácido fórmico.	71
Figura 8: Área dos analitos em diferentes tempos de viragem das válvulas. Solução padrão fortificada com 100 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 100 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.	72
Figura 9: Área dos analitos usando diferentes proporções (v/v) de solventes água:metanol na QSM. Solução padrão fortificada com 100 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 100 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.	73
Figura 10: Curvas analíticas para as <i>N</i> -nitrosaminas (0,10 - 25,0 ng mL ⁻¹) com adição do PI na concentração de 10,0 ng mL ⁻¹	75
Figura 11: Gráfico de resíduos das curvas analíticas para as <i>N</i> -nitrosaminas (0,10 - 25,0 ng mL ⁻¹) com adição do PI na concentração de 10 ng mL ⁻¹	76

Figura 12: Cromatogramas da NMOR (0,1 ng mL ⁻¹), NDMA (1 ng mL ⁻¹), NDELA (0,1 ng mL ⁻¹) e NDEA (5 ng mL ⁻¹) em seus respectivos LOQ. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7	77
Figura 13: Recuperação (%) dos analitos usando diferentes solventes de eluição dos analitos do cartucho SPE. Solução padrão fortificada com 100 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 100 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.	81
Figura 14: Recuperação dos analitos em diclorometano:acetona 1:1 v/v em diferentes condições. Solução padrão fortificada com 100 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 100 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7. .	82
Figura 15: Concentração dos analitos em função da evaporação do solvente de eluição. Solução padrão fortificada com 10 ng mL ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 100 ng mL ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.	83
Figura 16: Curvas analíticas para as <i>N</i> -nitrosaminas (0,10 - 2,0 ng mL ⁻¹) com adição do PI na concentração de 1,0 ng mL ⁻¹	84
Figura 17: Gráfico de resíduos das curvas analíticas para as <i>N</i> -nitrosaminas (0,10 - 2,0 ng mL ⁻¹) com adição do PI na concentração de 1,0 ng mL ⁻¹	85
Figura 18: Recuperação (%) dos analitos nas amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g ⁻¹ de cada <i>N</i> -nitrosamina e 100 ng g ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.	94
Figura 19: Recuperação (%) dos analitos em função da variação da massa das amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g ⁻¹ de cada <i>N</i> -nitrosamina e 100 ng g ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.	95
Figura 20: Recuperação (%) dos analitos em função da variação da porcentagem de metanol na solução extratora. Amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g ⁻¹ de cada <i>N</i> -nitrosamina e 100 ng g ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.	96
Figura 21: Recuperação (%) dos analitos em função do uso do ácido fórmico na solução extratora. Amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g ⁻¹ de cada <i>N</i> -nitrosamina e 100 ng g ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.	97
Figura 22: Recuperação (%) dos analitos em função do uso do solvente de extração. Amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g ⁻¹ de cada <i>N</i> -nitrosamina e 100 ng g ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.	98

Figura 23: Cromatogramas de recuperação da NDELA e NDELA-d8 no Esmalte D em função da variação da composição da solução extratora.....	100
Figura 24: Recuperação (%) dos analitos em diferentes esmaltes de unhas. Amostras dos esmaltes B, D e F fortificadas com 20 ng g ⁻¹ das <i>N</i> -nitrosaminas e 20 ng g ⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.	101
Figura 25: Curvas analíticas para as <i>N</i> -nitrosaminas (20 – 80 ng g ⁻¹) com adição do PI na concentração de 40 ng g ⁻¹	104
Figura 26: Gráfico de resíduos das curvas analíticas para as <i>N</i> -nitrosaminas (20 - 80 ng g ⁻¹) com adição do PI na concentração de 40 ng g ⁻¹	104
Figura 27: Cromatogramas da NDELA, NDELA-d ⁸ , NDMA, NDMA-d ₆ , NMOR, NMOR-d ₄ , NDEA e NDEA-d ₆ na concentração de 20 ng g ⁻¹ (LOQ) no Esmalte D.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de <i>N</i> -nitrosaminas em esmaltes de unhas (HAURI, 2016)	22
Tabela 2: Propriedades físico-químicas das <i>N</i> -nitrosaminas avaliadas neste trabalho.	26
Tabela 3: Determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em cosméticos usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Dados relevantes encontrados na literatura (SANTOS, 2018).	35
Tabela 4: Condições operacionais do espectrômetro de massas para as <i>N</i> -nitrosaminas (as transições de quantificação estão marcadas em negrito).	55
Tabela 5: Condições definidas para o método LC-UHPLC-MS/MS	74
Tabela 6: Parâmetros estatísticos para a curva analítica (Procedimento A).	76
Tabela 7: Parâmetros de validação do método de determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em água (Procedimento A).	79
Tabela 8: Parâmetros de validação do método de determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em água (com concentração no SPE, Procedimento B).	87
Tabela 9: Coeficientes angular, linear e de correlação linear para as curvas analíticas usando LC-UHPLC-MS/MS (Curva analítica) e SPE+ LC-UHPLC-MS/MS (Procedimento B).	89
Tabela 10: Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes de unhas analisados.	91
Tabela 11: Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes de unhas analisados (continuação).	91
Tabela 12: Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes de unhas analisados (continuação).	92
Tabela 13: Quantidade de substâncias presentes nos esmaltes analisados (informações de rótulo).	92
Tabela 14: Valores de recuperação (%) das <i>N</i> -nitrosaminas para os Esmaltes B, D e F	102
Tabela 15: Parâmetros estatísticos das curvas analíticas	105
Tabela 16: Parâmetros de validação do método de determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em esmaltes de unhas.	107
Tabela 17: Concentração média (n=2) de <i>N</i> -nitrosaminas em ng g ⁻¹ ± incerteza expandida (U) com um fator de abrangência (k=2) e um nível de confiança de 95%.	108
Tabela 18: Recuperação média (n=2) das <i>N</i> -nitrosaminas adicionadas às amostras.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI - Ionização química a pressão atmosférica

CV - Coeficiente de variação

CYP2E1 - Citocromo P450 2E1

CYP2A6 - Citocromo P450 2A6

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva

EPA - *Environmental Protection Agency*

ESI - Ionização por eletronebulização

HPPC - Produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos

IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LC - Cromatografia líquida

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial

LC-UHPLC-MS/MS - Cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrometria de massas sequencial

LLE - Extração líquido-líquido

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

MRM - Monitoramento de reações múltiplas

MS/MS - Espectrometria de massas sequencial

m/z - Razão massa/carga

MWCNT- Nanotubos de carbono multi-paredes

NDBA - *N*-nitrosodibutilamina

NDEA - *N*-nitrosodietilamina

NDELA - *N*-nitrosodietanolamina

NDMA - *N*-nitrosodimetilamina

NDPLA - *N*-nitrosodi-*n*-propilamina

NMEA - *N*-nitrosometiletilamina

NMOR - *N*-nitrosomorfolina

NPIP - *N*-nitrosopiperidina

NPYR - *N*-nitrosopirrolidina

PI - Padrão interno

ppb - Partes por bilhão

ppt - Partes por trilhão

PSA - Amina primária secundária

QqQ - Triplo quadrupolo

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

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RSD - Desvio padrão relativo

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SLE - Extração sólido-líquido

SPE - Extração em fase sólida

SPE-UHPLC-MS/MS - Extração em fase sólida *on-line* a cromatografia líquida de ultra alta eficiência associada a espectrometria de massas

SPME - Microextração em fase sólida

SRM - Monitoramento de reações selecionadas

UAE - Extração assistida por ultrassom

UHPLC - Cromatografia de ultra alta eficiência

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

VA-RP-DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa assistida por vórtex

SUMÁRIO

Capítulo 1. Revisão bibliográfica	19
1.1. Esmaltes de unhas	20
1.2. <i>N</i> -nitrosaminas em esmaltes de unhas	21
1.3. Legislação para cosméticos	22
1.4. As <i>N</i> -nitrosaminas	24
1.4.1. Propriedades químicas e físico-químicas	24
1.4.2. Formação e inibição de <i>N</i> -nitrosaminas	27
1.4.3. Aspectos toxicológicos	28
1.5. <i>N</i> -Nitrosaminas em cosméticos	31
1.6. Métodos analíticos para determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em cosméticos	33
1.7. Preparo de amostras	38
1.8. Cromatografia bidimensional	39
1.9. Métodos cromatográficos	40
1.10. Validação do método LC-UHPLC-MS/MS	42
1.10.1. Seletividade	42
1.10.2. Faixa linear e linearidade	42
1.10.3. Precisão	43
1.10.4. Exatidão	44
1.10.5. Limites de detecção e quantificação	44
1.10.6. Quantificação por padronização interna	45
Capítulo 2. Objetivos	46
2.1. Objetivos	47
Capítulo 3. Material e métodos	48
3.1. Equipamentos	49
3.2. Material	49
3.3. Padrões analíticos	49
3.4. Solventes e reagentes	50
3.5. Preparo das soluções padrões	50
3.6. Amostras de esmaltes de unhas	51
3.7. Desenvolvimento/ otimização do método bidimensional (LC-UHPLC-MS/MS) ..	51
3.7.1 Otimização das condições cromatográficas (UHPLC)	53
3.7.2. Otimização das condições de carregamento da amostra na primeira dimensão (LC)	53

3.7.3. Condições do espectrômetro de massas	54
3.8. Preparo das amostras	56
3.8.1. Determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em água	56
3.8.1.1. Filtração e análise por LC-UHPLC-MS/MS (Procedimento A).....	56
3.8.1.2. Concentração dos analitos por SPE <i>off-line</i> e análise por LC-UHPLC-MS/MS (Procedimento B)	57
3.8.2. Avaliação dos solventes de eluição.....	58
3.8.3. Determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em esmaltes de unhas	58
3.8.3.1 Extração líquido-líquido e análise por LC-UHPLC-MS/MS.....	59
3.8.3.2 Extração em fase sólida <i>off-line</i> e análise por LC-UHPLC-MS/MS	60
3.8.3.3. Cálculo da incerteza de medição	61
3.9. Validação dos métodos LC-UHPLC-MS/MS	62
3.9.1. Validação do método – amostras de água (Procedimento A)	62
3.9.2. Validação do método – amostras de água (Procedimento B)	63
3.9.3. Validação do método – amostras de esmalte (extração em fase sólida <i>off-line</i>)	64
Capítulo 4. Resultados e discussões	65
4.1. Desenvolvimento/ otimização do método LC-UHPLC-MS/MS	66
4.1.1. Avaliação da fase estacionária da coluna LC na primeira dimensão	66
4.1.2. Aditivo da fase móvel no solvente de eluição.....	69
4.1.3. Condições cromatográficas na primeira dimensão.....	71
4.2. Determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em água	74
4.2.1. Quantificação direta por LC-UHPLC-MS/MS.....	74
4.2.1.1. Validação do método – Quantificação direta por LC-UHPLC-MS/MS	74
4.2.1.2. Faixa linear e linearidade	75
4.2.1.3. Limites de detecção e quantificação.....	76
4.2.1.4. Precisão	77
4.2.1.5. Exatidão	78
4.2.2. Concentração dos analitos em cartucho SPE de carvão e quantificação por LC-UHPLC-MS/MS	80
4.2.2.1. Validação do método - Concentração dos analitos em cartucho SPE de carvão	83
4.2.2.2. Faixa linear e linearidade	84
4.2.2.3. Limites de detecção e quantificação.....	85
4.2.2.4. Precisão	85

4.2.2.5. Exatidão	86
4.3. Esmaltes de unhas	90
4.3.1. Preparo de amostras de esmaltes de unhas usando extração com solvente..	93
4.3.2. Preparo de amostras de esmaltes de unhas usando extração com solvente seguido de SPE.....	100
4.3.3. Validação do método - esmalte de unhas usando a extração por solvente seguida de SPE e quantificação por LC-UHPLC-MS/MS.....	103
4.3.3.1. Faixa linear e linearidade	103
4.3.3.2. Limites de detecção e quantificação.....	105
4.3.3.3. Precisão	106
4.3.3.4. Exatidão	107
5. Análises das amostras de esmaltes de unhas	107
Capítulo 5. Conclusão	110
Capítulo 6. Referências bibliográficas	114
Capítulo 7. Anexos	122
Anexo I - Cromatogramas do desenvolvimento/otimização do método LC-UHPLC-MS/MS	123
Anexo II – Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes avaliados.	128
Anexo III Cromatogramas das amostras de esmaltes de unhas analisados	152

Prefácio

A

presença de *N*-nitrosaminas nos mais diversos produtos, entre esses alimentos, medicamentos e cosméticos tem sido discutida por longa data. *N*-nitrosaminas são potencialmente carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas e sua toxicidade para o ser humano tem sido indiscutível.

Atualmente a discussão tem sido focada na presença de impurezas da família das *N*-nitrosaminas em medicamentos, uma vez que essas foram detectadas em 2018 em vários medicamentos, incluindo os antagonistas de receptor de angiotensina II, conhecidas como sartanas, que são amplamente empregados para tratar a pressão arterial e no hipoglicemiante metformina indicado para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2.

Assim sendo, as discussões sobre a presença de *N*-nitrosaminas em produtos diversos voltou a ser foco no meio científico e agências governamentais. Ainda existe uma carência de informações para o entendimento das fontes de contaminação e técnicas viáveis para minimizar a presença, ou seja, medidas possíveis de serem adotadas para mitigar o risco.

O grupo de pesquisa (Laboratório de Bioanalítica Paracelsus) no qual foi desenvolvido essa dissertação tem trabalhado com *N*-nitrosaminas por mais de duas décadas, focando pesquisas para as áreas de alimentos e cosméticos. No entanto, ainda não desenvolveu trabalhos com esmaltes de unhas e, no primeiro levantamento bibliográfico realizado, foi verificado que existe uma carência tanto no que concerne a métodos analíticos como resultados de análises da presença de *N*-nitrosaminas nestas matrizes. Essa foi a motivação para o desenvolvimento desta dissertação e a pesquisa contou com o apoio financeiro da FAPESP (2021/03239-0).

A presente dissertação, é apresentada em seis capítulos.

No Capítulo 1 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o assunto, no Capítulo 2 os objetivos da dissertação, no Capítulo 3 os Materiais e Métodos, no Capítulo 4 os Resultados e Discussões e finalmente nos Capítulos 5 e 6 as Conclusões e Referências Bibliográficas, respectivamente. Ao final da dissertação se encontram alguns Anexos que entendemos que são importantes como material suplementar.

Capítulo 1

**REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

1.1. Esmaltes de unhas

Os esmaltes de unhas compreendem o maior e mais importante grupo de itens cosméticos para as unhas. O uso desses cosméticos é de longa data. Há relatos de múmias egípcias encontradas com as unhas douradas.

De acordo com o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), o Brasil é o segundo país que mais consome esmaltes no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2019).

A indústria de cosméticos tem passado por um desenvolvimento para diversificar e apresentar opções de esmaltes de unhas para seus consumidores. Os esmaltes de unhas são encontrados em diferentes colorações e formulações: base, cintilante, cremoso, esmalte em gel, esmalte com glitter e, até mesmo, esmalte infantil. Alguns desses itens de beleza também prometem cuidados para as unhas, como os esmaltes fortalecedores indicados para unhas fracas.

O esmalte é formado essencialmente por base de laca com propriedades de suspensão e um sistema de coloração. Dentre os demais componentes que constituem os esmaltes de unhas temos os formadores de filme, resinas, plastificantes, solventes, diluentes, corantes, pigmentos perolados e agentes de suspensão (WILKINSON; MOORE, 1982).

A nitrocelulose é usada como formador de filme nos esmaltes, sendo um dos principais componentes da formulação dos esmaltes de unhas. Sua produção se dá através da reação de nitração da celulose em meio aquoso de ácidos nítrico e sulfúrico. A formação da nitrocelulose ocorre quando o ácido nítrico reage de forma parcial com as hidroxilas primárias ($-\text{CH}_2\text{OH}$) e com as secundárias ($-\text{OH}$) presentes na celulose. Posteriormente a nitrocelulose passa por uma lavagem com água para remoção do ácido residual. Os filmes produzidos pela nitrocelulose são à prova d'água e resistentes à abrasão (NITRO QUÍMICA, 2012; WILKINSON; MOORE, 1982).

As resinas são empregadas para promover a adesão dos esmaltes, fornecer brilho e aumentar a dureza dos filmes. A resina de arilsulfonamida-formaldeído é uma das mais utilizadas. Em relação aos plastificantes, eles possuem a função de garantir que o filme permaneça nas unhas após a evaporação dos solventes, pois o ponto de ebulição dos plastificantes é alto, garantindo a adesão no

filme, além de torná-los maleáveis. Os ésteres de alta massa molecular são empregados como plastificantes (WILKINSON; MOORE, 1982).

Os solventes são empregados para garantir a fluidez e aplicabilidade dos esmaltes nas unhas. Os solventes apresentam papel primordial na secagem do filme nas unhas. Os mais utilizados são os ésteres (acetato de etila e acetato de butila), aromáticos (tolueno e xileno), álcoois (álcool etílico e álcool butílico) ou silicones. O critério de escolha está relacionado com a inocuidade da substância (REIGER, 2000).

Em 1930, Charles Revlon revolucionou a indústria de esmaltes de unhas ao substituir corantes da formulação por pigmentos. Os corantes eram absorvidos pelas unhas e mantinham o esmalte translúcido, o mesmo não acontece com os pigmentos. Os pigmentos são classificados em três tipos na indústria cosméticas: pigmentos minerais (ou inorgânicos), pigmentos orgânicos e pigmentos nacarados. É comum os pigmentos sedimentarem nos esmaltes, pois eles são insolúveis no meio. Propriedades de suspensão são obtidas criando um sistema tixotrópico através de um aditivo reológico, conhecido como bentone, promovendo a interação dos pigmentos com o meio (REIGER, 2000).

1.2. *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas

O Departamento de Saúde da cidade de Basiléia (Suíça) reportou a presença de quatro *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas infantil: *N*-nitrosodietanolamina (NDELA), *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), *N*-nitrosomorfolina (NMOR) e *N*-nitrosodietilamina (NDEA). Existe uma grande discussão sobre as possíveis fontes de contaminação de esmaltes por *N*-nitrosaminas. Em 2016, foi reportado um trabalho que teve como objetivo avaliar a presença de *N*-nitrosaminas em amostras de esmaltes de unhas. Foram analisadas 104 amostras. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. Concentrações superiores a 50 µg kg⁻¹ de *N*-nitrosaminas foram determinadas em 50 amostras dos esmaltes analisados e a maior concentração determinada foi de NDELA (6010 µg kg⁻¹) (HAURI, 2016).

Tabela 1: Concentrações de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas (HAURI, 2016).

	NDELA	NDMA	NMOR	NDEA	Total
Número de amostras > LOD (5 - 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	49	51	48	18	62
Número de amostras > 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	33	46	36	8	61
Número de amostras > 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	17	29	7	8	50
Valor máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	6010	497	255	266	6507
Valor mínimo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	7	10	8	8	20

1.3. Legislação para cosméticos

No decorrer da evolução científica e tecnológica dos cosméticos notou-se a necessidade regulamentar esses produtos, visando garantir a qualidade e segurança para seus consumidores. No Brasil a regulamentação dos cosméticos é realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio de critérios previstos em lei.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 07 de 2015, os produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (HPPC) são definidos como:

“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” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Os produtos HPPC são classificados em dois diferentes tipos, Produtos Grau 1 e Produtos Grau 2. Os Produtos Grau 1 possuem propriedades básicas ou elementares, sendo isentos de registro devido ao baixo risco à saúde dos consumidores. No entanto, a comunicação prévia à ANVISA antes da comercialização é necessária. Batons, condicionadores, demaquilantes e esmaltes de unhas são exemplos de Produtos Grau 1 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Os Produtos Grau 2 necessitam de comprovação da segurança e/ou eficácia, assim como modos e restrições de uso, portanto precisam ser registrados junto a ANVISA antes da comercialização. Protetores solar, produtos para alisar e/ou tingir os cabelos, produtos infantis (e.g., esmaltes de unhas infantil) fazem parte do Grupo 2 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Anteriormente a comercialização, os produtos registrados na ANVISA necessitam passar por avaliações, cujos ensaios devem ser realizados pelos fabricantes do produto, para garantir segurança à saúde do consumidor. No entanto, diferentes matérias primas são utilizadas na fabricação dos cosméticos, tornando-se inevitável em alguns casos, a presença de impurezas no produto acabado. A nitrosação de componentes da matéria prima ou a presença de aminas nitrosáveis no produto cosmético pode levar a formação das *N*-nitrosaminas, considerados contaminantes de preocupação.

A RDC nº 83 de 2016 dispõe uma lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. As seguintes *N*-nitrosaminas se encontram nessa lista: a *N*-nitrosopirrolidina (NPYR), *N*-nitrosopiperidina (NPIP), *N*-nitrosometiletilamina (NMEA), NMOR, *N*-nitrosodi-*n*-propilamina (NDPLA), *N*-nitrosodibutilamina (NDBA), NDEA, NDELA e NDMA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). Em relação as matérias primas, a ANVISA preconiza que o nitrito de sódio não deve ser utilizado em formulações que contenham aminas (secundárias ou terciárias) ou outras substâncias passíveis da formação de *N*-nitrosaminas. As monoalquilaminas, monoalcanolaminas e seus sais; dialquilamidas e dialcanolamidas de ácidos graxos e as trialquilaminas, trialcanolaminas e seus sais não devem ser utilizadas em sistemas nitrosantes e a concentração máxima definida de *N*-nitrosaminas nessas matérias primas é de 50 µg kg⁻¹. Também é recomendado conservar/embalar essas matérias primas em embalagens livres de nitritos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Com exceção dos esmaltes infantis, os demais esmaltes de unhas são isentos de registro na ANVISA. Os esmaltes não possuem a capacidade de alterar a aparência das unhas de forma definitiva, eles atuam como uma maquiagem e apesar de serem considerados seguros, ainda assim podem conter contaminantes (e.g., *N*-nitrosaminas) que precisam ser monitorados para garantir a segurança do

consumidor. Um dos objetivos desse trabalho foi realizar um levantamento das formulações presentes no mercado e avaliar a presença de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas, uma vez que a presença desses compostos é proibida em produtos cosméticos devido a sua toxicidade.

1.4. As *N*-nitrosaminas

As *N*-nitrosaminas compreendem um grande grupo de compostos *N*-nitrosos considerados potentes carcinógenos, podendo ser formados em diversos produtos como medicamentos, alimentos, bebidas, amostras biológicas (tecidos, sangue, saliva), amostras ambientais (ar, solo, efluentes, água), cosméticos e outros (RATH; CANAES, 2009).

Recentemente, no ano de 2018 as *N*-nitrosaminas ganharam destaque na indústria farmacêutica a nível mundial após serem detectadas como impurezas em diversos medicamentos. Os medicamentos afetados foram os antagonistas de receptor de angiotensina II (conhecidos como “sartanas”), comumente empregados para o tratamento de pressão arterial e a metformina, hipoglicemiante prescrito para o tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2. No Brasil, a ANVISA suspendeu a fabricação de alguns medicamentos e outros foram recolhidos. Desde então a indústria farmacêutica tem realizado esforços para identificar as fontes e mitigar a contaminação dos medicamentos (AGLIO *et al.*, 2022).

Menos recente, e mais precisamente em 1977, a indústria de cosméticos passou por processo similar, quando tomou ciência da presença de *N*-nitrosaminas em cosméticos em um Encontro da Sociedade Americana de Químicos (*American Chemical Society*), quando foi reportado por Fan *et al.*, pela primeira vez, a contaminação de cosméticos e produtos de higiene pessoal pela NDELA (FAN *et al.*, 1977). A formação de *N*-nitrosaminas em cosméticos pode ser decorrente de reações de nitrosação devido presença de aminas como subprodutos ou impurezas nas matérias primas presentes na formulação.

1.4.1. Propriedades químicas e físico-químicas

As *N*-nitrosaminas são compostos caracterizados pela presença de um grupo *N*-nitroso ($N-N=O$), conforme ilustrado na Figura 1.

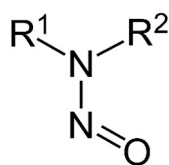


Figura 1: Estrutura química de uma *N*-nitrosamina.

As propriedades físico-químicas das *N*-nitrosaminas são dependentes do radical ligado ao átomo de nitrogênio e da cadeia (alifática ou aromática) que está ligada a esse grupo, podendo inferir na volatilidade, polaridade e estabilidade destes compostos (NASCIMENTO, 2003). As propriedades físico-químicas das *N*-nitrosaminas avaliadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 2.

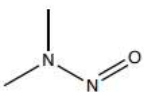
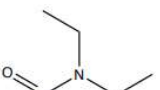
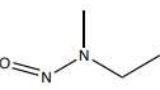
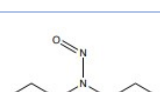
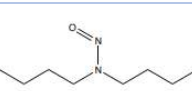
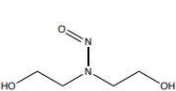
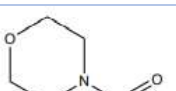
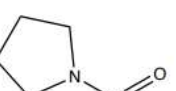
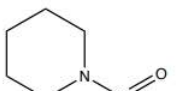
Em temperatura ambiente, as *N*-nitrosaminas encontram-se na coloração amarela ou laranja-amarelo em fase líquida, sólida ou gasosa (RATH; CANAES, 2009; SCANLAN, 1975). As *N*-nitrosaminas absorvem radiação na região do ultravioleta em 230 a 240 nm e em 330 a 350 nm. Quando adicionadas em solventes orgânicos ocorre um deslocamento (aproximadamente 20 nm) no comprimento de onda de máxima absorção (MIRVISH, 1975). Em relação a solubilidade, as *N*-nitrosaminas apresentam solubilidade parcial em água, variando de acordo com a sua massa molar. Em relação a solventes orgânicos, a solubilidade é maior nestes quando comparado com a água (CROSBY; SAWYER, 1976).

No ano de 1967 um grupo de pesquisadores classificou as *N*-nitrosaminas em voláteis e não voláteis (TELLING, 1982). Essa classificação é utilizada até os dias atuais, principalmente para escolha da técnica de análise desses compostos, enquanto os voláteis são preferencialmente determinados por cromatografia a gás, os não voláteis são determinados por cromatografia líquida.

Quando uma *N*-nitrosamina é formada, sua decomposição não é favorecida, pois esses compostos apresentam elevada estabilidade tanto em meio neutro, quanto em meio fortemente básico (na ausência de luz). No entanto, a exposição à luz ultravioleta pode favorecer a decomposição das *N*-nitrosaminas, dando origem a produtos de decomposição que variam de acordo com o comprimento de onda aplicado. Na decomposição podem ser formados amidas e ácido nitroso ou aldeídos, nitrogênio e óxido nitroso (IKEDA; MIGLIORESE G, 1990).

Outro processo de decomposição das *N*-nitrosaminas é a desnitrosação em meio ácido. Esse processo apesar de ser originalmente lento, pode ser acelerado com o uso de nucleófilos como cloreto, brometo iodeto ou tiocianato. O ácido bromídrico em ácido acético glacial, também é uma opção para a decomposição.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas das *N*-nitrosaminas avaliadas neste trabalho.

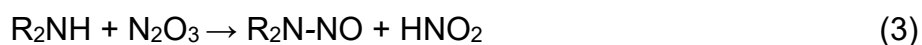
Nome - Sinônimo (Abreviação) Nome IUPAC em inglês	CAS	Fórmula Molecular	Estrutura Química	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Pressão de vapor, mm de Hg (T)	Log P
<i>N</i> -nitrosodimetilamina (NDMA) <i>N,N</i> -dimethylnitrous amide	62-75-9	C ₂ H ₆ N ₂ O		74,08	2,7 (20 °C)	- 0,57
<i>N</i> -nitrosodietilamina (NDEA) <i>N,N</i> -diethylnitrous amide	55-18-5	C ₄ H ₁₀ N ₂ O		102,14	0,86 (20 °C)	0,48
<i>N</i> -nitrosometiletilamina (NMEA) <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -methylnitrous amide	10595-95-6	C ₃ H ₈ N ₂ O		88,11	1,1 (20 °C)	0,04
<i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -propilamina (NDPA) <i>N,N</i> -dipropylnitrous amide	621-64-7	C ₆ H ₁₄ N ₂ O		130,19	0,39 (25 °C)	1,36
<i>N</i> -nitrosodibutilamina (NDBA) <i>N,N</i> -dibutylnitrous amide	924-16-3	C ₈ H ₁₈ N ₂ O		158,24	0,05 (25 °C)	2,63
<i>N</i> -nitrosodietanolamina (NDELA) <i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)nitrous amide	1116-54-7	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₃		134,13	0,0005 (20 °C)	- 1,28
<i>N</i> -nitrosomorfolina (NMOR) 4-nitrosomorpholine	59-89-2	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂		116,12	0,036 (20 °C)	- 0,44
<i>N</i> -nitrosopirrolidina (NPYR) 1-nitrosopyrrolidine	930-55-2	C ₄ H ₈ N ₂ O		100,12	0,06 (20 °C)	- 0,19
<i>N</i> -nitrosopiperidina (NPIP) 1-nitrosopiperidine	100-75-4	C ₅ H ₁₀ N ₂ O		114,15	0,092 (20 °C)	0,36

Fonte: Pubchem, 2021.

1.4.2. Formação e inibição de *N*-nitrosaminas

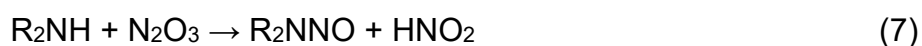
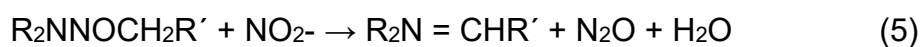
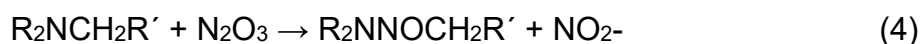
As *N*-nitrosaminas são compostos *N*-nitrosos formados majoritariamente a partir da reação de uma amina secundária com um agente nitrosante (e.g., nitrito). No entanto, aminas primárias e terciárias também podem ser nitrosadas (RATH; CANAES, 2009).

As reações de 1 a 3 descrevem as reações de nitrosação de aminas secundárias com íon nitrito como agente nitrosante:



O agente nitrosante (N_2O_3 , anidrido nitroso) formado a partir do nitrito reage com a amina secundária formando a *N*-nitrosamina. A reação é de segunda ordem, em relação ao ácido nitroso. O pH do meio é um fator preponderante para que ocorra a reação de nitrosação, sendo essa favorecida quando a amina se encontra em sua forma não protonada (meio básico) e quando o nitrito é levado para anidrido nitroso, reação favorecida em meio ácido. Para as aminas que possuem $\text{pK}_a > 5$ o pH ótimo de nitrosação em meio aquoso é próximo do pK_a do ácido nitroso, na faixa de 3,0 a 3,4 (MIRVISH, 1975; RATH; CANAES, 2009).

A formação de *N*-nitrosaminas a partir de aminas terciárias depende de uma clivagem nitrosativa para gerar uma amina secundária, tornando a reação mais lenta. A trietanolamina passa por esse processo, após a clivagem nitrosativa é gerada a dietanolamina e posteriormente é formada a *N*-nitrosamina, as reações 4 a 7 ilustram o mecanismo (IKEDA; MIGLIORESE G, 1990).



O organismo humano também pode sintetizar *N*-nitrosaminas de forma endógena. A nitrosação *in vivo* pode acontecer devido à presença de aminas e nitratos/nitritos ingeridos através de alimentos ou medicamentos. Ainda, macrófagos ativados conseguem realizar a síntese de nitritos, nitratos e agentes nitrosantes, contribuindo com a formação de compostos *N*-nitrosos. Cepas bacterianas isoladas de infecções humanas também conseguem sintetizar esses compostos de forma enzimática utilizando os precursores amino. Devido a tais mecanismos, é possível que a nitrosação endógena aconteça em diversos locais do corpo, como nos pulmões, trato urinário, cavidade oral, estômago e em outros órgãos em que possa ocorrer uma inflamação ou infecção (BARTSCH; OHSHIMA; PIGNATELLI, 1988).

Alguns reagentes conseguem inibir a formação de *N*-nitrosaminas, reduzindo ou até mesmo evitando a formação delas, esses reagentes destroem ou reduzem os agentes nitrosantes a espécies não reativas. Tais inibidores competem pela amina que está servindo de substrato para o agente nitrosante. A principal característica dos inibidores da formação de compostos *N*-nitrosos é a capacidade de reduzir o grupo nitroso a espécies como NO, N₂ ou N₂O (não possuem atividade nitrosante) ou também podem ligar-se de forma irreversível no grupo NO⁺. Na presença de oxigênio pode haver a restauração da atividade nitrosante do NO através da oxidação a NO₂. Se houver a reação do NO₂ com NO será formado o N₂O₃ (BARTSCH; OHSHIMA; PIGNATELLI, 1988).

O α-tocoferol, sulfamato de amônio, ácido tânico, ácido ascórbico e ácido sulfâmico são alguns dos inibidores de *N*-nitrosaminas conhecidos e utilizados em cosméticos (IKEDA; MIGLIORESE G, 1990).

1.4.3. Aspectos toxicológicos

Embora as *N*-nitrosaminas tenham sido descobertas em 1863, somente a partir do ano de 1954 que a toxicologia desses compostos começou a ser estudada, quando os cientistas britânicos Barnes e Magee reportarem pela primeira vez sobre as *N*-nitrosaminas, associando a NDMA como causa de danos hepáticos graves seguido de morte em ratos, coelhos, cachorros e porquinhos da Índia que receberam doses de 20 a 40 mg kg⁻¹ de NDMA (BARNES; MAGEE, 1954; TELLING, 1982).

Em 1956, os mesmos cientistas reportaram sobre a indução de tumores em ratos que receberam 50 mg kg⁻¹ de NDMA em suas dietas em um período menor que um ano (MAGEE; BARNES, 1956). Desde então foram evidenciados efeitos carcinogênicos em mais de 40 espécies de animais, incluindo primatas (TRICKER; PREUSSMANN, 1991).

O metabolismo das *N*-nitrosaminas tem sido estudado *in vitro* e a partir de células de cultura de diversos tecidos extra hepáticos (origem humana). NDEA e NDMA apresentaram ativação metabólica para todos os tipos de tecidos que foram expostos (BARTSCH; MONTESANO, 1984).

Para as *N*-nitrosaminas conseguirem realizar sua ação carcinogênica, elas necessitam de uma ativação metabólica. Essa ativação ocorre através da hidroxilação do carbono α do grupo alquila e é catalisada pela mono-oxigenase de função mista do citocromo P₄₅₀ (geralmente CYP2E1 com sua isoforma CYP2A6), onde há a formação de um aldeído ou cetona que é eliminado restando uma amina primária instável que tautomeriza a um alquildiazoidróxido. O íon diazônio pode ser formado a partir do azoidróxido e esse íon pode atuar como um agente alquilante nos sítios nucleofílicos do RNA, DNA e proteínas. Essa alquilação no material genético é mecanismo fundamental para o iniciar o desenvolvimento do câncer (DOUGLASS *et al.*, 1978; RATH; CANAES, 2009; TRICKER; PREUSSMANN, 1991).

De acordo com classificação de agentes carcinogênicos da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), as *N*-nitrosaminas são pertencentes ao Grupo 2A, substâncias que demonstraram evidência limitada do efeito carcinogênico em humanos e evidência suficiente de carcinogenicidade em animais de experimentação. Alguns compostos pertencem ao grupo 2B, substâncias que demonstraram evidência de efeito carcinogênico em determinadas espécies de animais. Em relação aos seres humanos, não há evidências diretas que associem a incidência de câncer com a exposição à *N*-nitrosaminas, no entanto pressupõe-se que os humanos apresentem sensibilidade à ação tóxica desses compostos. Dessa forma, é estabelecido pela IARC que as *N*-nitrosaminas devem ser consideradas agentes carcinogênicos para os seres humanos (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 1978). A atividade carcinogênica das *N*-nitrosaminas foi evidenciada em cerca de 90% dos mais de 300 compostos *N*-nitrosos avaliados. Além de

carcinogênicas, as *N*-nitrosaminas também apresentaram ações mutagênicas e teratogênicas em animais de laboratório (PREUSSMANN, 1984).

Em 1967 estudos evidenciaram a indução de tumores hepáticos em ratos alimentados com NDELA, no entanto, essa *N*-nitrosamina possui potência cerca de duzentas vezes menor que a ação carcinogênica da NDMA (DRUCKREY *et al.*, 1967; FAN *et al.*, 1977).

Um estudo realizado com ratos que receberam cinco diferentes doses de NDELA seguido de uma avaliação estatística mostrou que ainda em concentrações baixas (1,5 mg kg⁻¹ por dia), esse composto apresenta ação carcinogênica. Cerca de 60 a 90% de uma dose administrada da NDELA é excretada pela urina, de forma inalterada (PREUSSMANN *et al.*, 1982).

Testes de experimentação realizados em animais (ratos, camundongos, coelhos, macacos, sapos, porcos, aves, cães, hamsters, peixes) que receberam NDMA e NDEA, mostraram atividades cancerígenas em órgãos como trato digestório, fígado e rins (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 1978).

Foram observados a formação de tumores (malignos e benignos) nos vasos sanguíneos, pulmão e fígado foram observadas após a administração oral de NMOR em ratos. Espécies de peixes, hamsters e camundongos também apresentaram tumores após a ingestão da NMOR. Uma dose única desse composto é capaz realizar a indução de tumores (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 1978).

De modo geral, a absorção das *N*-nitrosaminas ocorre de forma rápida através do trato gastrointestinal e/ou através da pele, como no caso da NDELA. Após a absorção, esse composto se acumula em órgãos como fígado, bexiga dentre outros, induzindo efeitos tóxicos (FRANZ *et al.*, 1993; MATYSKA; PESEK; YANG, 2000; RATH; CANAES, 2009).

A indução de tumores pode ocorrer em diferentes órgãos, dependendo de diferentes fatores como: a estrutura da química da *N*-nitrosamina, a via de exposição, a dose e a espécie animal.

1.5. *N*-Nitrosaminas em cosméticos

Os primeiros estudos sobre a ocorrência de *N*-nitrosaminas em cosméticos datam da década de 70. O interesse por esses compostos foi devido a evidência que produtos que continham etanolaminas secundárias e terciárias poderiam formar compostos *N*-nitrosos (SANTOS, 2018). No ano de 1977, Fan *et al* constataram em seus estudos a presença de NDELA em alguns cosméticos, loções e shampoos, onde a concentração desse contaminante variou entre 1 e 48.000 ng g⁻¹ (FAN *et al.*, 1977).

As formulações dos cosméticos podem conter uma diversidade de compostos nitrogenados, sendo que muitos deles apresentam uma quantidade pequena de impurezas e subprodutos da classe das aminas. Devido ao meio favorecido, compostos *N*-nitrosos podem ser formados por meio de uma variedade de reações de nitrosação. No que diz respeito ao tipo de *N*-nitrosaminas que são formadas nesses produtos, estas são dependentes dos precursores presentes no meio. A dietanolamina e trietanolamina são os dois tipos de aminas mais comumente utilizadas em cosméticos e elas podem resultar na formação da *N*-nitrosamina mais frequentemente detectada em produtos cosméticos: a NDELA (IKEDA; MIGLIORESE G, 1990).

Alguns conservantes também podem atuar como agentes nitrosantes como o Bronopol® (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) e o Bronidox® (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano). Esses conservantes liberam nitrito que reagem com a dietanolamina ou trietanolamina presente na formulação, formando a NDELA (CHOU, 1998; ROSENBERG *et al.*, 1980).

Em um ensaio em 1984 para determinação de *N*-nitrosaminas voláteis e não voláteis, foram analisadas 145 amostras de produtos cosméticos comerciais onde 50 amostras apresentaram contaminação por NDMA (concentração máxima encontrada de 24 µg kg⁻¹). A NMOR foi encontrada em 26 desses produtos (concentração máxima de 640 µg kg⁻¹) e 25 amostras apresentaram NDELA, com concentrações de até 1400 µg kg⁻¹ (SPIEGELHALDER; PREUSSMANN, 1984).

Diversos estudos para determinação de *N*-nitrosaminas têm sido realizados até os dias atuais, apesar da proibição de agentes nitrosantes nos produtos HPPC, esses contaminantes continuam sendo detectados em produtos cosméticos, mostrando que a problemática das *N*-nitrosaminas ainda não foi solucionada. Com o

avanço da ciência e tecnologia têm sido possível detectar as *N*-nitrosaminas em concentrações cada vez menores, alguns desses estudos serão mencionados a seguir.

Um estudo realizado em 2015 em diferentes produtos cosméticos (loções, cremes, sérum, tintura para lábios, produtos capilares, entre outros) e matérias primas (trietanolamina, trometamina, dietanolamina de ácido graxo, lauril sulfato de trietanolamina, entre outras) foi detectada NDELA em concentrações de até cerca de $223 \mu\text{g kg}^{-1}$ (JOO *et al.*, 2015). No ano de 2017 foi detectada NDELA em amostras de géis de banho e cremes, em concentrações variando de 136 a 355 ng g^{-1} , aproximadamente (CHISVERT *et al.*, 2017).

Em 2018 em um estudo realizado em amostras de cosméticos como shampoo, gel de banho, loção corporal, creme para mãos, creme para área dos olhos, protetor solar, produtos para bebê, entre outros, foram detectadas NDELA e NDMA em concentrações de até $596,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $40,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (LIM *et al.*, 2018)

Um estudo reportado em 2019 relatou a presença de NDEA em concentrações de até $460 \mu\text{g kg}^{-1}$ e NDMA em concentrações de até $190 \mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de géis de banho e cremes para o corpo (MIRALLES *et al.*, 2019). Em 2021 foi reportada a presença de NDELA em amostra de shampoo de bebês na concentração de 54 ng g^{-1} (TADA; RODRIGUES-SILVA; RATH, 2021).

Na literatura são encontrados diversos estudos sobre *N*-nitrosaminas em cremes, loções e xampus, no entanto, somente em 2012 foi reportado pela primeira vez a presença desses contaminantes em esmaltes de unhas. No ano de 2020 foram reportadas a presença de NDELA, NMOR, NDEA e NDMA em esmaltes de unhas, em concentrações de até $418,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EUROPEAN NETWORK OF OFFICIAL COSMETICS CONTROL LABORATORIES - OCCLS, 2020). Cabe destacar que os esmaltes de unhas têm sido pouco explorados quanto à presença de *N*-nitrosaminas o que se reflete nos poucos trabalhos publicados em periódicos científicos de domínio público. Por outro lado, são produtos muito acessíveis para a população, principalmente pelo seu baixo valor comercial.

1.6. Métodos analíticos para determinação de *N*-nitrosaminas em cosméticos

Para fins analíticos as *N*-nitrosaminas são divididas em voláteis e não voláteis, sendo as primeiras preferencialmente determinadas por cromatografia a gás e as últimas por cromatografia líquida, ambas acopladas a espectrometria de massas. Com o aprimoramento das interfaces de ionização por eletronebulização (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI) se abriu a possibilidade da determinação de *N*-nitrosaminas voláteis e não-voláteis simultaneamente por cromatografia líquida, o que certamente é uma grande vantagem. Em produtos cosméticos mais especificamente, a atenção tem sido dada as *N*-nitrosaminas não voláteis como a NDELA (IKEDA; MIGLIORESE G, 1990).

Cabe destacar que as *N*-nitrosaminas englobam uma grande variedade de compostos de diferentes estruturas químicas e propriedades físico-químicas, além de estarem presentes, em geral, em baixas concentrações (ng g^{-1}) e geralmente em matrizes complexas variando de fabricante para fabricante, o que requer procedimentos de preparo de amostra otimizados para cada formulação. No preparo de amostras, além do procedimento de extração dos analitos da matriz são requeridas etapas de concentração e *clean-up* dos extratos. Os preparos de amostra mais reportados na literatura envolvem a microextração em fase sólida (SPME, *solid phase microextraction*) (CHOI *et al.*, 2016; DAVARANI *et al.*, 2013), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *dispersive liquid-liquid microextraction*) (CHISVERT *et al.*, 2017) e a extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) (DONG *et al.*, 2015; JOO *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2011; SANTOS, 2018; MIRALLES *et al.*, 2019; MIRALLES; CHISVERT; SALVADOR, 2018).

Os esmaltes de unhas possuem matriz complexa, pois diversas matérias primas são utilizadas nessas formulações. Os analitos monitorados no esmalte neste trabalho (NDELA, NMOR, NDEA e NDMA) possuem caráter mais polar, assim como a maioria dos solventes presentes nos esmaltes, tornando a extração das *N*-nitrosaminas um desafio. Na literatura foi encontrado apenas um estudo que realiza uma extração líquido-líquido assistida por ultrassom empregando como solvente uma solução com água, ácido fórmico e metanol (EUROPEAN NETWORK OF OFFICIAL COSMETICS CONTROL LABORATORIES - OCCLS, 2020) . No entanto, sem a realização do *clean-up* no preparo da amostra muitos interferentes acabam sendo coextraídos com os analitos, podendo afetar a separação e a quantificação das *N*-

nitrosaminas. Outro fator a se considerar é a concentração dos analitos em amostras de esmaltes de unhas, que geralmente estão na faixa de ng g^{-1} .

Devido as propriedades físico-químicas das *N*-nitrosaminas encontradas em cosméticos, a cromatografia líquida se torna a melhor opção para quantificação desses compostos. Os analitos não voláteis devem ser quantificados preferencialmente pela cromatografia gasosa (IKEDA; MIGLIORESE G, 1990). Embora o espectrômetro de massas seja o detector mais indicado, pois através dele também é possível confirmar a identidade do analito, outros detectores como o de eletroquímica, ultravioleta e quimioluminescência também tem sido reportados (SANTOS, 2018).

Na Tabela 3 são apresentados alguns métodos analíticos utilizando LC-MS/MS de maior relevância na área de cosméticos disponíveis na literatura.

Tabela 3: Determinação de *N*-nitrosaminas em cosméticos usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Dados relevantes encontrados na literatura (SANTOS, 2018).

Analito	Matriz	Preparo de amostras				Técnica analítica	Modo de ionização/ modo de quantificação	LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
NDELA	Gel de banho, óleo para cabelo, shampoo, condicionador, cremes, espuma de banho, esfoliante, sabão para as mãos	Extração		Clean-up		LC-MS/MS	ESI+/SRM	45,6	(SCHOTHORST; SOMERS, 2005)
		Amostra (qtd.)	1 g	Técnica	SPE (amostras solúveis em água)				
		Técnica	LLE (para amostras menos solúveis em água)	Sorvente	Bakerbond C18				
		Solvente extrator	Diclorometano	Solvente de eluição	Amostra eluída pelo cartucho sem utilizar solvente para eluição				
NDELA	Suavizante de pele, limpador facial, máscara para cílios, shampoo, batom líquido, tintura para cabelo	Extração		Clean-up		UHPLC-MS/MS	ESI+/SRM	20	(JOO <i>et al.</i> , 2015)
		Amostra (qtd.)	0,5 g/0,1 g	Técnica	SPE (amostras solúveis em água)				
		Técnica	LLE	Sorvente	Bond Elut AccuCAT troca iônica e catiônica				
		Solventes extratores *	Água, diclorometano, acetonitrila, etanol, clorofórmio	Solvente de eluição	Água				

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

NDELA, NDMA, NMOR, NDEA, NPIP, NPYR, NMEA	Creme e gel	Extração				LC/MS	ESI+/SRM	6 (NDELA); 120 (NDMA); 10 (NMOR); 170 (NDEA); 40 (NPIP); 9 (NPYR); 120 (NMEA)	(MIRALLES; CHISVERT; SALVADOR, 2018)
		Amostra (qtd.)	0,1 g	Técnica	-				
		Técnica	VA-RP-DLLME	Sorvente	-				
		Solventes extrator	Na ₂ SO ₄	Solvente de eluição	-				
NDELA, NDMA, NMOR, NDEA, NPIP, NPYR, NMEA	Esmalte de unhas	Extração				Orbitrap-LC- MS/MS	APCI+	3 (NDELA); 5 (NDMA); 4 (NMOR); 2 (NDEA); 2 (NPIP); 3 (NPYR); 35 (NMEA)	(EUROPEAN NETWORK OF OFFICIAL COSMETICS CONTROL LABORATORIES - OCCLS, 2020)
		Amostra (qtd.)	0,25 g	Técnica	-				
		Técnica	LLE	Sorvente	-				
		Solventes extrator	Água, metanol, ácido fórmico	Solvente de eluição	-				
NDELA	Shampoo para bebê	Extração/clean up		Clean-up		SPE-UHPLC- MS/MS	ESI+/SRM	5 - 10	(TADA; RODRIGUES- SILVA; RATH, 2021)
		Amostra (qtd.)	1 g	Técnica	-				
		Técnica	LLE	Sorvente	-				
		Solventes extrator	Água	Solvente de eluição	-				

Legenda: **SPE**: Extração em fase sólida; **LLE**: Extração líquido-líquido; **UAE**: Extração assistida por ultrassom; **SLE**: Extração sólido-líquido; **VA-RP-DLLME**: microextração líquido-líquido dispersiva em fase reversa assistida por vórtex; **MWCNT**: Nanotubos de carbono multi-paredes; **PSA**: Amina primária secundária; **SRM**: Monitoramento de reações múltiplas.

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

Recentemente no nosso grupo de pesquisa foi desenvolvido um estudo referente a determinação de NDELA em shampoos de bebê. O preparo de amostras envolveu o uso da extração em fase sólida onde um cartucho de fase C18 foi utilizado para *clean-up* da matriz. A quantificação das *N*-nitrosaminas foi realizada por cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrometria de massas. Com essa modalidade de cromatografia é possível trabalhar no modo *heart-cut* na qual se faz possível selecionar uma fração da amostra da primeira dimensão a ser direcionada para a segunda dimensão, incrementando o *clean-up* da matriz e a seleção da fração dos analitos. Os modos de quantificação e ionização foram ESI +/SRM e o LOQ alcançado foi de 10 ng g⁻¹ (TADA; RODRIGUES-SILVA; RATH, 2021).

Como já relatado anteriormente, na literatura científica não há muitos estudos referentes a determinação de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas (EUROPEAN NETWORK OF OFFICIAL COSMETICS CONTROL LABORATORIES - OCCLS, 2020; HAURI, 2016), assim como a formação desses analitos nessa matriz. Diante desse cenário, o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação desses contaminantes se torna um grande desafio, porém, seu controle é de extrema importância devido ao reconhecido potencial tóxico destes compostos para os seres humanos.

1.7. Preparo de amostras

As *N*-nitrosaminas se apresentam em nível de ng g⁻¹ nos cosméticos e produtos de higiene. As matrizes desses produtos costumam ser complexas, contendo diversos compostos orgânicos em suas formulações que variam de fabricante para fabricante e podem ser coextraídos da matriz com os analitos (RATH; CANAES, 2009; SANTOS, 2018; ZHONG; LI, 2017).

Como apresentado na Tabela 3, a SPE é um dos procedimentos mais utilizados no preparo de amostras para determinação de *N*-nitrosaminas. Esse procedimento geralmente é realizado usando um cartucho com uma fase estacionária (denominada sorvente) onde os analitos da matriz são retidos e os interferentes da matriz são removidos por meio de uma lavagem com solvente. Posteriormente outro solvente é utilizado para eluir os analitos retidos. Quando se emprega uma fase estacionária C18, o modo de interação é do tipo fase reversa, ou seja, a fase

estacionária é apolar e a fase móvel polar (ZHONG; LI, 2017). Na SPE é possível alcançar LOQ menores devido a possibilidade de concentração dos analitos. Outra forma da aplicação da SPE se dá quando apenas os interferentes possuem afinidade pela fase estacionária do cartucho e assim permanecem retidos, enquanto os analitos que não possuem afinidade são eluidos. Dessa forma não há a concentração dos analitos no preparo de amostras, e apenas ocorre um *clean-up*. O uso da SPE juntamente com a LLE se torna uma opção para o aprimoramento da extração e o *clean-up* (ABEDI; TALEBPOUR, 2017; SANTOS, 2018).

No ano de 2004 a *Environmental Protection Agency* (EPA) publicou um método para determinação de *N*-nitrosaminas em amostras de água onde o preparo de amostras foi realizado com um cartucho SPE de carvão de casca de coco ativado (Supelclean™ Cocunut Carchoal SPE 2 g/6 mL). Embora esse modelo de cartucho tenha sido desenvolvido especificamente para concentração de *N*-nitrosaminas do método da EPA, ele ainda não foi explorado para amostras de cosméticos e produtos de higiene pessoal (MUNCH; BASSETT, 2004; SUPELCO, 2004).

1.8. Cromatografia bidimensional

A cromatografia bidimensional em papel foi relatada pela primeira vez em 1944, onde um solvente diferente do utilizado na primeira dimensão foi empregado para eluição dos analitos na segunda dimensão para realizar a separação de aminoácidos (CONSDEN; GORDON; MARTIN, 1944).

Em 1978 foi reportado sobre a cromatografia bidimensional em colunas, o sistema foi utilizado na separação de misturas de extratos de vegetais. Nesse estudo os autores relatam a descoberta da pré-concentração e a transferência de frações da amostra da coluna 1 para coluna 2. Na primeira dimensão foi empregada a cromatografia por permeação em gel e na segunda dimensão cromatografia em fase reversa (ERNI; FREL, 1978; MOGOLLÓN *et al.*, 2014).

Os métodos cromatográficos multidimensionais são capazes de amplificar o poder de resolução quando comparados aos sistemas monodimensionais. Quando se trata de amostras complexas, a cromatografia bidimensional se torna uma excelente opção devido aos seus mecanismos de separação (JACQUES; CARAMÃO, 2009).

A cromatografia líquida bidimensional pode ser utilizada de dois modos: no primeiro modo, toda a amostra é transferida da primeira dimensão para a segunda dimensão, e no segundo modo somente uma fração selecionada na primeira dimensão é direcionada para a segunda dimensão. No primeiro modo temos um sistema denominado de abrangente e no segundo modo é chamado de *heart-cut*. O símbolo de multiplicação (x) é utilizado para abreviar cromatografia abrangente: LCxLC para cromatografia líquida ou GCxGC para cromatografia gasosa. Quando é realizada no modo *heart cut* é utilizado um hífen: LC-LC, LC-UHPLC (JACQUES; CARAMÃO, 2009; MOGOLLÓN *et al.*, 2014).

Neste trabalho a cromatografia bidimensional foi empregada no modo *heart-cut*, onde uma fração selecionada da amostra na primeira dimensão (¹D) foi direcionada para a segunda dimensão (²D). Além da seleção da fração de interesse realizada na primeira dimensão, também foi possível realizar um procedimento de *clean-up* dos concomitantes polares da matriz o que é vantajoso para minimizar o efeito matriz.

1.9. Métodos cromatográficos

A cromatografia líquida (LC) têm sido a mais reportada para determinação de *N*-nitrosaminas em cosméticos. A escolha é baseada na característica dos analitos que se apresentam em baixas concentrações e por serem não voláteis ou semivoláteis. A LC é uma técnica de separação bem estabelecida e consolidada, ela possui versatilidade no seu modo de separação (fase reversa, fase normal, troca iônica, exclusão de tamanho, entre outras). Seu funcionamento consiste em uma coluna contendo uma fase estacionária de pequenas partículas (coluna analítica) pelas quais os analitos devem ter afinidade para que o processo de separação ocorra. Um solvente (fase móvel) com o qual os analitos possuem afinidade é percolado no sistema direcionando os analitos para o detector. Atualmente existem diversas opções de colunas analíticas disponíveis no mercado para atender aos mais diversos analitos que podem ser determinados através da LC (PIROK; STOLL; SCHOENMAKERS, 2019). A busca por análises mais eficientes e rápidas levou ao desenvolvimento de um sistema de cromatografia de ultra alta eficiência (UHPLC). Nessa técnica as partículas das colunas são menores ($\leq 2 \mu\text{m}$). Além disso, esse sistema consegue

operar em pressões mais altas chegando a aproximadamente 15000 psi, entregando o máximo de eficiência do sistema (MALDANER; JARDIM, 2012).

Embora seja possível realizar a separação dos analitos por meio da cromatografia, é necessário outro sistema para realizar a quantificação e até mesmo a confirmação de identidade dos analitos. O espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) costuma ser o detector mais empregado para essa necessidade. O MS permite selecionar a razão massa/carga (m/z) de moléculas ou fragmentos das moléculas. Devido a seletividade desse sistema, quando operado no modo de reações selecionadas (*Selected Reaction Monitoring* – SRM) é possível diferenciar os analitos de seus interferentes, ainda que ambos compartilhem o mesmo tempo de retenção (LANÇAS, 2013; SANTOS, 2018).

Devido a polaridade média a baixa das *N*-nitrosaminas monitoradas em cosméticos, convém utilizar a fonte de ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI) operando no modo positivo. A APCI é indicada para análises de moléculas neutras que não se ionizam facilmente em soluções e que apresentem estabilidade térmica. O processo de ionização ocorre da seguinte forma, o analito é primeiramente volatilizado, na agulha corona é aplicado uma diferença de potencial ionizando o gás nitrogênio (gás de dessolvatação) e esse, ao se chocar com o analito, transfere a carga recebida. Por fim, os analitos com carga são transferidos para o analisador de massas (SILVA, 2020).

Dentre os diferentes analisadores de massas disponíveis, o quadrupolo tem sido frequentemente utilizado por apresentar linearidade satisfatória para as análises. O modelo triplo quadrupolo (*Triple Quadrupole*, QqQ) possui dois analisadores de massas dispostos de forma sequencial, eles são denominados de *tandem* ou MS/MS, e uma cela de colisão. No primeiro quadrupolo (Q1) é selecionado o íon precursor, no segundo quadrupolo (q2) o íon precursor é colidido com um gás neutro (e.g., argônio) para formar os fragmentos (íons produto). O terceiro quadrupolo (Q3) tem a função de selecionar os íons que serão direcionados para o detector, essa seleção é realizada por meio da razão m/z , dessa forma é realizado o modo de análise SRM, garantindo sensibilidade e seletividade ao método (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; SANTOS, 2018; SILVA, 2020).

1.10. Validação do método LC-UHPLC-MS/MS

Segundo a ANVISA a validação analítica é definida como: “a *avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos*” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

O objetivo da validação é demonstrar que os resultados obtidos pelo método são confiáveis e adequados para o que se destinam (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Alguns parâmetros a serem avaliados na validação do método são: seletividade, faixa linear, precisão intra e inter-dia, exatidão, limites de detecção e quantificação, (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

1.10.1. Seletividade

A seletividade do método está relacionada com a sua capacidade de quantificar ou identificar o analito de forma inequívoca, ainda que na presença de interferentes da matriz (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). O uso da espectrometria de massas é indicado para a caracterização da substância. Quando o espectrômetro é operado no modo sequencial (MS/MS) há aumento da seletividade quando comparado com outros detectores, além disso há a possibilidade de confirmar a identidade da substância (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; SANTOS, 2018).

Segundo a RDC 166 de 2017 a seletividade será considerada por meio da “*comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação*” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

1.10.2. Faixa linear e linearidade

A faixa linear (ou faixa de trabalho) é o intervalo em que concentrações confiáveis são obtidas com precisão e exatidão. Essa avaliação é feita através da relação concentração-resposta, ou seja, a resposta instrumental em função da

concentração da curva analítica. A faixa linear é determinada a partir de investigação da linearidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

A linearidade de um método está relacionada com a capacidade de se obter respostas analíticas diretamente proporcional a concentração do analito. Toda a faixa estabelecida pelo método deverá ter uma relação linear, para isso, deve-se preparar no mínimo cinco diferentes concentrações da solução padrão avaliadas no mínimo em triplicatas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

1.10.3. Precisão

A proximidade dos resultados obtidos é avaliada por meio da precisão, podendo ser expressa por três formas: por meio da repetibilidade, da precisão intermediária (intra-dia e inter-dia) ou da reprodutibilidade, sendo as amostras preparadas de forma independente. A precisão pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV), conforme Equação 1 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

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

Onde: s é a estimativa do desvio padrão absoluto e $\bar{x}$ é a média da concentração.

A precisão intra-dia é expressa em termos de repetibilidade, onde a amostra deve ser avaliada mediante as mesmas condições operacionais, mesmo equipamento, mesmo analista e a análise das replicatas deverá ser realizada no mesmo dia. A precisão inter-dia é similar a intra-dia com a diferença que deve ser avaliada em dias diferentes. O ensaio de reprodutibilidade, segundo a RDC nº 166 de 2017 deve ser realizado em laboratórios diferentes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

Os critérios de aceitação podem ser calculados a partir da equação de *Horwitz* que estabelece a relação entre concentração do analito e valores de CV para uma situação de reprodutibilidade (HORWITZ; KAMPS; BOYER, 1980). De modo geral, emprega-se uma fração deste valor calculado em uma situação de repetibilidade que leva em consideração os objetivos do método, concentração de

trabalho, concentração do analito na amostra e a variabilidade intrínseca do método (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

1.10.4. Exatidão

A exatidão deve ser avaliada por meio do grau de concordância entre a concentração experimentalmente determinada e a concentração real ou teórica, sendo expressa em termos de percentual de recuperação do analito. O cálculo é realizado através da relação entre a concentração experimental e a concentração teórica, conforme a Equação 2 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

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

1.10.5. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito possível de ser detectado, porém, não necessariamente quantificado na amostra. A determinação do LOD pode ser realizada de maneira visual, através da razão sinal/ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração. A razão sinal/ruído determinada pela RDC nº 166 de 2017 deve ser maior ou igual a 2:1, no entanto a razão de 3:1 é a mais utilizada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

O limite de quantificação (LOQ) é definido como “*menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas*” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017). Os mesmos critérios de LOD podem ser utilizados para o LOQ, no entanto, para esse último, a razão sinal/ruído deverá ser de no mínimo 10:1. O LOD e o LOQ devem ser expressos em concentração, a precisão e a exatidão do método também devem ser consideradas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

1.10.6. Quantificação por padronização interna

As análises quantitativas por cromatografia líquida devem preferencialmente fazer uso de padrões internos, que podem ser isotopicamente marcados ou outras moléculas que possuem similaridade no comportamento químico e físico com o analito em sua forma nativa, mas que não estejam presentes nas amostras. Compostos isotopicamente modificados são comumente utilizados como *surrogates*, sua adição deverá ser realizada na mesma concentração na matriz branco, soluções padrão e na matriz fortificada (RIBANI *et al.*, 2004; SANTOS, 2018).

Matrizes complexas como as de produtos cosméticos e de higiene pessoal podem apresentar um elevado número de compostos que podem coeluir ou afetar a ionização dos analitos alvos na fonte de ionização (APCI ou ESI), incrementando ou suprimindo a ionização. Além disso, dificilmente será encontrada uma matriz branco representativa para os cosméticos, pois as formulações variam de fabricante para fabricante, resultando em diferentes interferentes com diferentes concentrações, que podem co-eluir com os analitos (HEWAVITHARANA, 2011; SANTOS, 2018).

O uso de padrão interno (*surrogate*) para correção do efeito matriz é indispensável quando se trata de determinação de *N*-nitrosaminas, pois os analitos possuem massas moleculares baixas e as transições próximas. As vantagens do padrão interno (PI) são: possibilidade de quantificação e confirmação de identidade dos analitos, assim como a correção de perdas dos analitos ocasionadas durante o preparo das amostras, uma vez que o PI terá o mesmo comportamento do analito no preparo da amostra e na separação cromatográfica.

Já foi verificado em trabalho anterior desenvolvido no grupo de pesquisa que o uso do padrão deuterado para cada analito é necessário para que o método de LC-UHPLC-MS/MS possa alcançar os critérios de aceitação de exatidão e precisão.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2.1. Objetivos

O objetivo geral do trabalho constituiu no desenvolvimento e validação de métodos analíticos usando a cromatografia bidimensional acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-UHPLC-MS/MS) visando a determinação de *N*-nitrosaminas em água e esmaltes de unhas.

Os objetivos específicos compreendem:

- ⇒ Desenvolvimento de método para a determinação de multiresíduos de *N*-nitrosaminas em água usando a LC-UHPLC-MS/MS;
- ⇒ Desenvolvimento de método para a determinação de multiresíduos de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas usando a LC-UHPLC-MS/MS;
- ⇒ Avaliação de diferentes preparos de amostras para análise de água e esmaltes de unhas;
- ⇒ Validação dos métodos desenvolvidos para cada matriz;
- ⇒ Análise de amostras de esmaltes de unhas.

Capítulo 3

**MATERIAL E
MÉTODOS**

3.1. Equipamentos

- ✓ Cromatógrafo a líquido de ultra alta eficiência ACQUITY UPLC® (Waters, EUA), equipado um sistema de bombeamento binário e um sistema quaternário, *column manager*, duas válvulas de seis vias, sistema de injeção automático, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Xevo TQD (Waters, EUA) com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI). O software MassLynx (Waters, EUA) é utilizado para aquisição de dados e o TargetLynx (Waters, EUA) para o tratamento dos dados das análises;
- ✓ Balança analítica Sartorius modelo CPA 225D com precisão de $\pm 0,01$ mg (Brasil);
- ✓ Purificador de água Milli-Q Academic (Millipore, EUA);
- ✓ Banho de ultrassom Unique modelo 1450 (Brasil);
- ✓ Bomba de vácuo modelo 089-CAL (Fanem, Brasil);
- ✓ Centrífuga modelo Rotofix 32^a (Hettich, Alemanha);
- ✓ Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma, Alemanha);
- ✓ Concentrador rotativo à pressão reduzida modelo RVC 2-18CD (Martin Christ, Alemanha);
- ✓ Bombas peristálticas (Ismatec, Alemanha).

3.2. Material

- ✓ Coluna cromatográfica Waters Acquity UPLC® HSS T3 1,8 μ m, 2,1 x 50 mm (Waters, Irlanda);
- ✓ Coluna Waters Atlantis® T3 3 μ m, 3,0 x 100 mm (Waters, Irlanda);
- ✓ Coluna OASIS® HLB Direct Connect HP 20 μ m 2,1 x 30 mm (Waters, Irlanda);
- ✓ Cartucho Supelclean™ Coconut Charcoal SPE Tube (Sigma, Alemanha);
- ✓ Tubos para centrifuga tipo Falcon em polipropileno 15 mL;
- ✓ Tubos para centrifuga tipo Falcon em polipropileno 50 mL;
- ✓ Cartucho de carvão - Supelclean™ Coconut Charcoal SPE 2 g/6 mL (Sigma, Alemanha).

3.3. Padrões analíticos

- ✓ N-nitrosodietanolamina (Sigma Aldrich, 99%); Lote MBBC3917;

- ✓ Solução padrão de *N*-nitrosaminas (MIX): *N*-nitrosodimetilamina, *N*-nitrosodietilamina, *N*-nitrosometiletilamina, *N*-nitrosomorfolina, *N*-nitrosopiperidina, *N*-nitrosopirrolidina, *N*-Nitrosodi-*n*-propilamina, *N*-nitrosodibutilamina, *N*-nitrosodifenilamina (M-8270-03-ASL, AccuStandard (2 mg/mL), Lote 218051300, New Haven, EUA);
- ✓ *N*-nitrosodietanolamina- d_8 (Sigma-Aldrich, 98%), Lote MKBW2393V;
- ✓ *N*-nitrosodietilamina- d_{10} (Toronto Research Chemicals, Canada), Lote 8-TAH-3-1;
- ✓ *N*-nitrosodimetilamina- d_6 (Chem Service, 99,9%), Lote 9444600;
- ✓ *N*-nitrosomorfolina- d_4 (Toronto Research Chemicals, Canada), Lote 16-JHY-150-2;
- ✓ *N*-Nitrosopiperidina- d_{10} (Toronto Research Chemicals, Canada), Lote 1-SCZ-41-1;
- ✓ *N*-nitrosopirrolidina- d_4 (Toronto Research Chemicals, Canada), Lote 16-JHY-151-2;
- ✓ *N*-Nitrosodi-*n*-propilamina- d_{14} (Toronto Research Chemicals, Canada).

3.4. Solventes e reagentes

- ✓ A água empregada no preparo de soluções e amostras foi obtida em sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA);
- ✓ Ácido fórmico (Merck, Alemanha, 98-100%);
- ✓ Metanol grau HPLC (Honeywell, EUA, > 99%);
- ✓ Diclorometano grau HPLC (Honeywell, EUA, 99,5%);
- ✓ Acetona P.A.-ACS (Química Moderna, Brasil, 99,9%).

3.5. Preparo das soluções padrões

A solução estoque do mix de *N*-nitrosaminas ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada pela transferência quantitativa do conteúdo da ampola *AccuStandard* (2 mg mL^{-1}) para um balão volumétrico de 25,0 mL, empregando metanol como solvente. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque em água.

A solução de NDELA foi preparada em água na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução estoque intermediária contendo as nitrosaminas do mix e a NDELA

foram preparadas na concentração de 2000 ng mL⁻¹ pela diluição das soluções estoque em água.

As soluções estoque dos padrões deuterados foram preparadas na concentração de 100 µg mL⁻¹ em metanol. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque em água.

As soluções estoque foram armazenadas em freezer e as soluções intermediárias foram armazenadas em frasco de vidro e armazenadas em geladeira.

3.6. Amostras de esmaltes de unhas

Foram adquiridos quinze esmaltes de unhas mundiais, de diferentes colorações e fabricantes. O armazenamento das amostras foi em temperatura ambiente (25 °C) sem incidência de luz. Os esmaltes foram escolhidos baseado na composição da formulação. Devido à falta de uma matriz branco representativa, foi escolhido um esmalte de composição mais simples para realizar os ensaios referentes ao preparo de amostras. Para tanto, foram adquiridas 10 unidades do mesmo lote, os quais foram agrupados em um pool, armazenados em uma embalagem de vidro âmbar estéril e denominado Esmalte D. As demais amostras foram: um esmalte de composição mais simples, porém com coloração amarelada (Esmalte B); um esmalte nude (Esmalte C); um esmalte vermelho (Esmalte A); um esmalte branco (Esmalte E) e um esmalte infantil a base de água (Esmalte F). As amostras foram codificadas para preservar os fabricantes.

Esmaltes produzidos em laboratório externo também foram avaliados, ambos sem pigmentos em sua composição. A diferença entre os dois esmaltes está na presença ou ausência de verniz na composição, Esmaltes G e H, respectivamente.

3.7. Desenvolvimento/ otimização do método bidimensional (LC-UHPLC-MS/MS)

Um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) acoplado a um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS), com analisador triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI) foi utilizado para a quantificação das *N*-nitrosaminas. A separação cromatográfica foi realizada em duas dimensões (2D). Na primeira dimensão (LC) foi usada uma coluna OASIS HLB ou

Atlantis T3, com a finalidade de selecionar a fração dos analitos e *clean-up* e na segunda dimensão (UHPLC) uma coluna analítica de fase reversa (HSS T3). As principais vantagens desse acoplamento são: seleção da fração de interesse contendo os analitos, *clean-up* e maiores volumes de injeção de amostra. O sistema também é composto por duas bombas, uma binária (BSM) e uma quaternária (QSM).

A QSM é responsável pelo carregamento da amostra na coluna na primeira dimensão, assim como a lavagem dessa coluna. A eluição dos analitos da coluna analítica para a detecção no espectrômetro de massas é realizada através da BSM. Esse sistema é controlado por duas válvulas (válvula esquerda e válvula direita) que são responsáveis por direcionar os solventes para a coluna LC ou para a coluna analítica. No momento em que as válvulas estão na Posição 1 a amostra é carregada na coluna de LC da primeira dimensão. Quando ocorre a mudança da válvula esquerda para a Posição 2 a fração selecionada de analitos na coluna LC é direcionada para a coluna analítica de UHPLC, onde ocorre a separação. Um esquema do sistema está apresentado na Figura 2 e o detalhamento mais completo está descrito em artigos já publicados anteriormente pelo grupo de pesquisa (TADA; RODRIGUES-SILVA; RATH, 2021; TETZNER *et al.*, 2016). As condições do espectrômetro de massas foram baseadas em trabalho anterior (SANTOS, 2018). As condições do espectrômetro de massas são: fonte de APCI, modo positivo; corrente da corona: 3,5 μA ; temperatura da probe: 350 °C; vazão do gás (nitrogênio) de dessolvatação: 600 L h⁻¹ e vazão do gás (nitrogênio) no cone: 60 L h⁻¹; gás de colisão: argônio.

O método foi desenvolvido e otimizado baseado em condições estabelecidas em trabalho anterior do grupo (SANTOS, 2018).

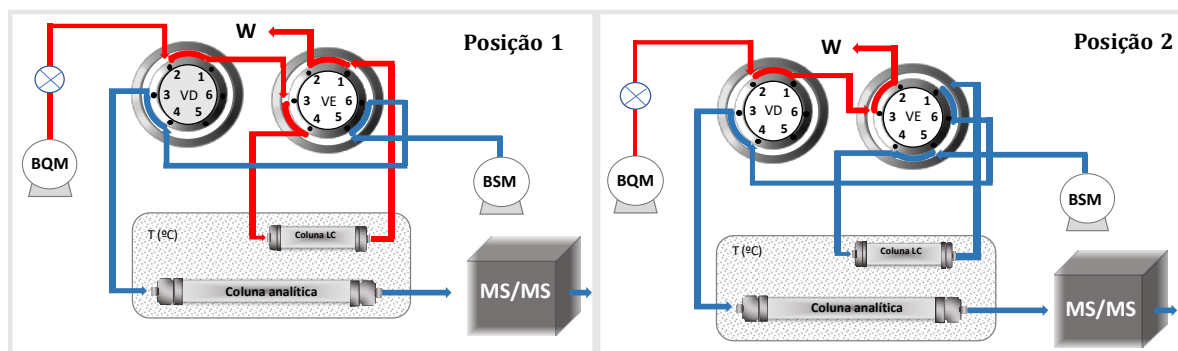


Figura 2: Esquema da LC-UHPLC-MS/MS com transferência com troca de eluente da primeira coluna (LC) para a segunda coluna (coluna analítica). Posição 1: carregamento da amostra na coluna LC e Posição 2: eluição dos analitos da coluna de LC para a coluna analítica.

3.7.1 Otimização das condições cromatográficas (UHPLC)

Para a otimização das condições cromatográficas foi utilizada a coluna Acquity UPLC® HSST3 na segunda dimensão. Os seguintes aditivos foram avaliados na fase móvel: ácido fórmico 0,01% v/v; ácido fórmico 0,1% v/v ou acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ com a vazão de carregamento na segunda dimensão de 0,500 mL min⁻¹.

Para a determinação das condições foi utilizada uma solução contendo 100 ng mL⁻¹ das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL⁻¹ do PI. O volume de injeção foi de 200 µL para cada teste realizado. Para a otimização do método foram avaliados as áreas e os formatos dos picos cromatográficos, priorizando a NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, por serem os compostos de maior interesse, uma vez que foram detectados em amostras de esmaltes de unhas (HAURI, 2016).

3.7.2. Otimização das condições de carregamento da amostra na primeira dimensão (LC)

Inicialmente foi avaliada a coluna HLB OASIS (20 µm) com as condições estabelecidas em trabalho anterior do grupo (SANTOS, 2018).

As condições foram reavaliadas de modo a atender todas as *N*-nitrosaminas monitoradas. Foram avaliados o uso da coluna Atlantis® T3 (3 µm), o tempo de viragem da válvula, composição do solvente de carregamento da amostra e tempo de regeneração da coluna LC.

3.7.3. Condições do espectrômetro de massas

As condições do espectrômetro de massas foram definidas em trabalho anterior do grupo, para isso foram realizadas infusões das soluções padrão de NDELA e NDELA-d₈ (individualmente) preparadas em solvente metanol na concentração de 1,0 µg mL⁻¹. Para as demais *N*-nitrosaminas foi preparado um mix de solução padrão na concentração de 10,0 µg mL⁻¹. A infusão foi feita no modo combinado, a fase móvel utilizada foi composta por 0,1% de ácido fórmico em água:metanol (85:15 v/v) com uma vazão de 0,4 mL mL⁻¹. Um íon precursor e um ou dois íons produtos foram selecionados para cada um dos analitos, onde foi selecionado um íon para realizar a quantificação e um ou dois íons para confirmação de identidade. A temperatura da coluna analítica foi mantida em 40 °C e o *sample manager* em 22 °C (SANTOS, 2018).

A quantificação foi realizada no modo de reações selecionadas (SRM), nas condições descritas na Tabela 4.

Os métodos de cromatografia bidimensional acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-UHPLC-MS/MS) foram desenvolvidos para a quantificação dos seguintes analitos: NDELA, NDMA, NMOR, NDEA, NPYR, NPIP, NMEA, NDPLA e NDBA em água; NDELA, NDMA, NMOR e NDEA em esmaltes de unhas. A principal diferença entre os métodos é o preparo das amostras, variando este de acordo com a matriz.

Tabela 4: Condições operacionais do espectrômetro de massas para as *N*-nitrosaminas (as transições de quantificação estão marcadas em negrito).

Analito	Íon precursor - Íon produto (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
<i>N</i> -nitrosodimetilamina	75 → 43	30	15
(NDMA)	75 → 58	30	10
<i>N</i> -nitrosodietilamina	103 → 28	30	15
(NDEA)	103 → 75	30	10
<i>N</i> -nitrosometiletilamina	89 → 42	28	10
(NMEA)	89 → 61	28	10
<i>N</i> -nitrosodietanolamina	135 → 74	16	10
(NDELA)	135 → 104	16	5
<i>N</i> -nitrosomorfolina	117 → 45	28	13
(NMOR)	117 → 87	28	10
<i>N</i> -nitrosopirrolidina	101 → 41	35	20
(NPYR)	101 → 55	35	15
<i>N</i> -nitrosopiperidina	115 → 41	30	18
(NPIP)	115 → 69	30	15
<i>N</i> -nitrosodi- <i>n</i> -propilamina	131 → 43	25	15
(NDPLA)	131 → 89	25	10
<i>N</i> -nitrosodibutilamina	159 → 41	25	16
(NDBA)	159 → 57	25	15
	159 → 103	25	10
NDELA- <i>d</i> ₈	143 → 80	15	11
	143 → 111	15	5
NDMA- <i>d</i> ₆	81 → 46	23	12
	81 → 64	23	9
NDEA- <i>d</i> ₁₀	113 → 34	30	11
	113 → 81	30	10
NMOR- <i>d</i> ₄	121 → 61	22	12
	121 → 91	22	10
NPIP- <i>d</i> ₁₀	125 → 78	23	16
	125 → 46	23	20
NPYR- <i>d</i> ₄	104,9 → 58	29	22
	105 → 31	29	14
NDPLA- <i>d</i> ₁₄	145 → 50	27	13
	145 → 97	27	9

3.8. Preparo das amostras

Na literatura foi encontrada apenas uma referência de preparo de amostra para determinação de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas, esse preparo envolve o uso da técnica de extração líquido-líquido assistida por ultrassom. Foi selecionado um esmalte denominado de “Esmalte D” o qual foi preparado um pool para realizar os ensaios de otimização desse preparo da amostra. No entanto devido a característica da matriz dos esmaltes, uma etapa de *clean-up* se fez necessária.

Para o *clean-up* foi utilizada a técnica SPE, a qual foi previamente testada e validada em uma matriz mais simples: amostras de água. Posteriormente foram realizados ensaios com o Esmalte D com fortificação de 20 ng g⁻¹ e 40 ng g⁻¹ de *N*-nitrosaminas e 20 ng g⁻¹ e 40 ng g⁻¹ de padrão interno (PI) de *N*-nitrosaminas. Posteriormente o método foi validado.

Para as amostras de água também foi validado um método de injeção direta, onde o preparo de amostra consistiu apenas na adição de 10 ng mL⁻¹ de PI de *N*-nitrosaminas seguida da filtração.

As *N*-nitrosaminas avaliadas nos procedimentos a seguir foram: NDELA, NMOR, NDMA, NDEA, NDPLA, NPIP, NPYR, NMEA e NDBA e os padrões internos empregados foram: NDELA-d₁₀, NMOR-d₄, NDMA-d₆, NDEA-d₁₀, NDPLA-d₁₄, NPIP-d₁₀, NPYR-d₄. Para a correção da NDBA e NMEA foi empregada a NMOR-d₄.

3.8.1. Determinação de *N*-nitrosaminas em água

Para todos os procedimentos a seguir as *N*-nitrosaminas alvo foram: NDELA, NDMA, NDEA, NMOR, NPIP, NPYR, NMEA, NDBA e NDPLA.

3.8.1.1. Filtração e análise por LC-UHPLC-MS/MS (Procedimento A)

Uma alíquota de 1,8 mL da amostra foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL e adicionada de 200 µL de uma mistura (mix) de padrão interno deuterado (PI) 100 ng mL⁻¹ (concentração final de 10 ng mL⁻¹). A amostra foi filtrada em filtro de seringa 0,22 µm para um vial de 2 mL e analisada por LC-UHPLC-MS/MS.

A curva analítica foi construída em água em uma faixa de concentração de 1 a 25 ng mL⁻¹, com a adição de 10 ng mL⁻¹ do PI.

3.8.1.2. Concentração dos analitos por SPE *off-line* e análise por LC-UHPLC-MS/MS (Procedimento B)

Uma quantidade de 100 mL de amostra adicionada de 1000 µL do PI de concentração de 100 ng mL⁻¹ (representando 1 ng mL⁻¹ na amostra) foi percolada em um cartucho de carvão (Supelclean™ Cocunut Carchoal SPE 2 g/6 mL) previamente condicionado com metanol (2x3 mL) e água (2x3 mL) utilizando um *manifold* para SPE. O eluato da amostra que foi percolada foi desprezado. O sorvente com os analitos retidos passou por um processo de secagem que durou 30 min sob condições de vácuo, no próprio *manifold*. Posteriormente, os analitos foram eluídos com 10 mL de uma mistura de diclorometano:acetona 1:1 v/v para um tubo Falcon. Foram adicionados 50 µL de metanol ao eluato e o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho de água (30 – 35 °C) até quase securo (restando aproximadamente 50 µL). O eluato foi reconstituído com 1 mL de água e a solução filtrada em filtro de seringa 0,22 µm para um vial de 2 mL. A evaporação dos solventes (diclorometano e acetona) também foi avaliada com o uso do concentrador rotativo à pressão reduzida modelo RVC 2-18CD.

Para realizar a quantificação dos analitos no extrato concentrado foi construída uma curva analítica na faixa de concentração de 0,10 a 2,0 ng mL⁻¹. Cada nível de concentração foi preparado em um volume de 100 mL de água, 1 ng mL⁻¹ do PI e concentrado por SPE. Este procedimento foi denominado de Procedimento B e leva a um fator de concentração de 100 vezes. Para comparação, considerando que não há perdas dos analitos no preparo de amostra representaria a curva no solvente de 10 a 200 ng mL⁻¹.

Na Figura 3 está apresentado o esquema de preparo das amostras de água utilizando a SPE *off-line*.

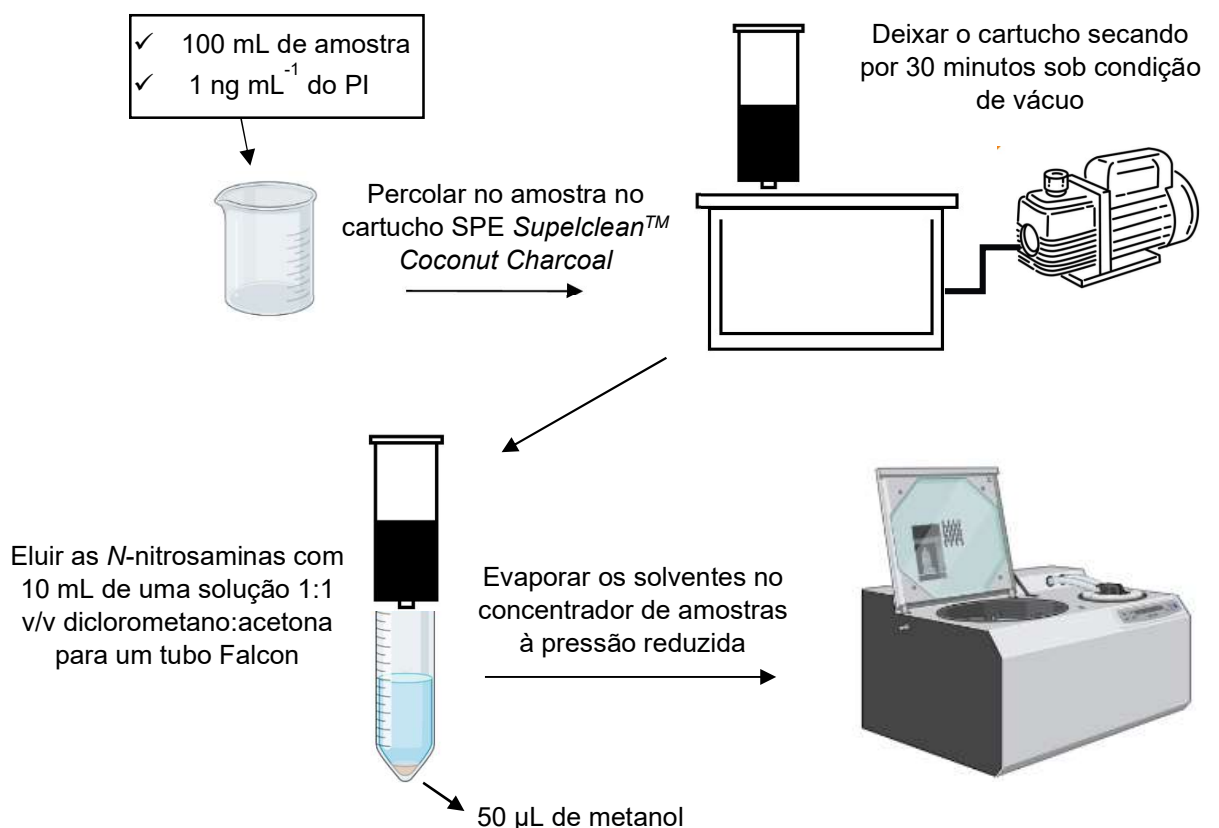


Figura 3: Esquema de preparo das amostras de água utilizando a SPE *off-line*. Fonte: Próprio autor.

3.8.2. Avaliação dos solventes de eluição

Em uma alíquota de 10 mL de água foram adicionados 10 ng mL⁻¹ do mix de *N*-nitrosaminas e 10 ng mL⁻¹ do PI. As amostras foram percoladas no cartucho de carvão SPE, conforme descrito no item 3.8.1.2, mudando apenas o solvente de eluição. Foram avaliadas as seguintes soluções para eluição dos analitos: solução de diclorometano:acetona 1:1 v/v, 3:1 v/v, 1:3 v/v e diclorometano. As amostras foram preparadas em duplicatas. Essa avaliação foi realizada antes de qualquer ensaio com o uso do SPE.

A curva analítica no solvente água na faixa de concentração de 25 a 150 ng mL⁻¹ com 100 ng mL⁻¹ do PI foi utilizada para a quantificação dos analitos.

3.8.3. Determinação de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas

Para todos os procedimentos a seguir as *N*-nitrosaminas alvo foram: NDELA, NDMA, NDEA e NMOR.

3.8.3.1 Extração líquido-líquido e análise por LC-UHPLC-MS/MS

Os ensaios a seguir foram realizados com o Esmalte D. Dentre os esmaltes pesquisados, esse possui composição mais simples e menor quantidade de matérias primas em sua formulação.

Para realizar a quantificação das *N*-nitrosaminas nos diferentes preparos de amostra dos testes descritos a seguir, as curvas analíticas (padronização interna) foram construídas no solvente água. A faixa de concentração foi de 25 a 150 ng g⁻¹, com a adição de 100 ng g⁻¹ do PI.

Teste 1: Uma amostra de 0,5 ± 0,02 g (com precisão de ±0,0001 g) foi fortificada com 50 ng das *N*-nitrosaminas (concentração nominal 100 ng g⁻¹) e 50 ng do PI (concentração nominal 100 ng g⁻¹). Como solvente extrator foram adicionados 5,0 mL da solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v e a extração líquido-líquido foi assistida por ultrassom (tempo de 10 min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4186 g durante 10 min e o sobrenadante foi coletado e filtrado (0,22 µm) para um vial de 2 mL e analisado por LC-UHPLC-MS/MS.

Teste 2: Uma amostra de 0,3; 0,4 g ou 0,5 ±0,02 g (com precisão de ±0,0001 g) foi fortificada com 50 ng das *N*-nitrosaminas (concentração nominal 166,6; 125 ou 100 ng g⁻¹) e 50 ng do PI (concentração nominal 166,6; 125 ou 100 ng g⁻¹). Como solvente extrator foram adicionados 5,0 mL da solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v e a extração líquido-líquido foi assistida por ultrassom (tempo de 10 min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4186 g durante 10 min e o sobrenadante foi coletado e filtrado (0,22 µm) para um vial de 2 mL e analisado por LC-UHPLC-MS/MS.

Teste 3: Uma amostra de 0,5 ± 0,02 g (com precisão de ±0,0001 g) foi fortificada com 50 ng das *N*-nitrosaminas (concentração nominal 100 ng g⁻¹) e 50 ng do PI (concentração nominal 100 ng g⁻¹). Como solvente extrator foram adicionados 5,0 mL da solução água:metanol:ácido fórmico 89:10:1 v/v/v ou 5,0 mL da solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v e a extração líquido-líquido foi assistida por ultrassom (tempo de 10 min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4186 g durante 10 min e o sobrenadante foi coletado e filtrado (0,22 µm) para um vial de 2 mL e analisado por LC-UHPLC-MS/MS.

Teste 4: Uma amostra de $0,5 \pm 0,02$ g (com precisão de $\pm 0,0001$ g) foi fortificada com 50 ng das *N*-nitrosaminas (concentração nominal 100 ng g^{-1}) e 50 ng do PI (concentração nominal 100 ng g^{-1}). Como solvente extrator foram adicionados 5,0 mL da solução água:metanol 95:5 v/v ou solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1v/v/v e a extração líquido-líquido foi assistida por ultrassom (tempo de 10 min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4186 g durante 10 min e o sobrenadante foi coletado e filtrado ($0,22 \mu\text{m}$) para um vial de 2 mL e analisado por LC-UHPLC-MS/MS.

Teste 5: Uma amostra de $0,5 \pm 0,02$ g (com precisão de $\pm 0,0001$ g) foi fortificada com 50 ng das *N*-nitrosaminas (concentração nominal 100 ng g^{-1}) e 50 ng do PI (concentração nominal 100 ng g^{-1}). Como solvente extrator foram adicionados 5,0 mL de água ou solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1v/v/v e a extração líquido-líquido foi assistida por ultrassom (tempo de 10 min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4186 g durante 10 min e o sobrenadante foi coletado e filtrado ($0,22 \mu\text{m}$) para um vial de 2 mL e analisado por LC-UHPLC-MS/MS.

3.8.3.2 Extração em fase sólida *off-line* e análise por LC-UHPLC-MS/MS

Foram pesados $0,5 \pm 0,02$ g (com precisão de $\pm 0,0001$ g) em um tubo Falcon de 50 mL e foram adicionados 25 mL de água:metanol 80:20 v/v, 100 μL das *N*-nitrosaminas (concentração nominal 20 ng g^{-1}) e 100 μL do PI (concentração nominal de 20 ng g^{-1}). Foi realizada uma extração líquido-líquido assistida por ultrassom (tempo de 10 min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4186 g durante 10 min.

O sobrenadante foi percolado no cartucho de carvão SPE previamente condicionado com metanol (2x3 mL) e água (2x3 mL) utilizando um *manifold* para SPE conforme descrito no item 3.8.1.2. Esse procedimento foi realizado com três diferentes marcas de esmaltes (Esmalte B, Esmalte D e Esmalte F).

O mesmo ensaio foi realizado mudando apenas concentração das *N*-nitrosaminas e do PI para 40 ng g^{-1} e os esmaltes avaliados: Esmalte A, Esmalte C, Esmalte E, Esmalte D, Esmalte G e Esmalte H.

Para realizar a quantificação das *N*-nitrosaminas, a curva foi construída no solvente água, sem realizar a concentração no cartucho. A faixa de concentração foi de 1 a 20 ng mL⁻¹, com a adição de 10 ng mL⁻¹ do PI.

3.8.3.3. Cálculo da incerteza de medição

A incerteza da medição de um conjunto de dados pode ser observada quando se aplica um tratamento estatístico, que deve ser considerado para se obter resultados de análises confiáveis.

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) a incerteza expandida é uma grandeza que define um intervalo em torno do resultado de uma medição, no qual se espera englobar grande fração da distribuição dos valores possíveis de serem razoavelmente atribuídos ao mensurável (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2012). A incerteza expandida foi estimada para os resultados das amostras de esmaltes de unhas.

A incerteza expandida foi calculada pela incerteza combinada da curva analítica (u_{CA}) e da incerteza da precisão inter-dias (u_P) e considerando um fator de abrangência (k) de 2, usando as Equações 3 e 4. Foram desconsiderados a incerteza da amostragem nos cálculos.

$$u = \sqrt{u_{CA}^2 + u_P^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$u = U \times k \quad (\text{Eq. 4})$$

A incerteza da curva analítica foi calculada pela Equação 5:

$$s_c = \frac{s_r}{m} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{m^2 S_{xx}}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde,

s_c : estimativa do desvio padrão da curva analítica;

m : coeficiente angular da curva analítica;

s_r : desvio padrão da regressão da curva analítica;

M : número de replicatas da análise da amostra;

N : número de pontos da curva analítica;

S_{xx} : soma dos quadrados dos desvios em relação a média dos valores de x ;

$\bar{y}_c$: resposta média das M replicatas obtida na análise da amostra;

$\bar{y}$: valor médio de y para os N pontos da curva analítica.

3.9. Validação dos métodos LC-UHPLC-MS/MS

Foram realizadas as validações para os seguintes procedimentos: amostras de água procedimentos A e B (injeção direta e concentração em SPE *off-line*, respectivamente), amostra de esmaltes de unhas procedimento de SPE *off-line*.

Os parâmetros de validação avaliados foram os seguintes: faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra e inter-dia e exatidão.

3.9.1. Validação do método – amostras de água (Procedimento A)

O método foi validado através da construção de curvas analíticas em nove níveis de concentração (0,10 – 0,50 – 1,0 – 2,0 – 5,0 – 10,0 – 15,0 – 20,0 – 25,0 ng mL⁻¹), utilizando 10 ng mL⁻¹ de PI, para avaliação da linearidade. O preparo das amostras foi realizado conforme descrito no item 3.8.1.1. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

Os limites de quantificação e detecção foram avaliados de forma individual para cada uma das *N*-nitrosaminas e ambos determinados pelo método instrumental (razão sinal/ruído). Foram realizadas fortificações com os analitos em concentrações

decrecentes na amostra branco até a obtenção da razão sinal/ruído de 3:1 para determinação do LOD e 10:1 para o LOQ.

A precisão foi avaliada mediante ensaio de repetibilidade. Para tanto, amostras branco (água purificada em sistema Milli-Q) foram fortificadas em dois níveis de concentração ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ e 5 ng mL^{-1}). A precisão intra-dia (mesmo dia) foi realizada em cinco replicatas ($n=5$) e a precisão inter-dia (dias diferentes) foi realizada em dois dias alternados em três replicatas ($n=11$). A precisão foi demonstrada através da dispersão dos resultados e o cálculo foi realizado conforme a Equação 1 no item 1.10.3.

A exatidão do método foi expressa através do valor percentual de recuperação dos analitos adicionados à amostra nos níveis de concentração de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ e 5 ng mL^{-1} . As análises foram realizadas em cinco replicatas ($n=5$) e para a quantificação foi utilizada a curva analítica no solvente. O cálculo da exatidão foi realizado conforme a Equação 2 no item 1.10.4.

3.9.2. Validação do método – amostras de água (Procedimento B)

O método foi validado através da construção de curvas analíticas em cinco níveis de concentração ($0,10 - 0,50 - 1,0 - 1,5 - 2,0 \text{ ng mL}^{-1}$), utilizando $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ do PI para avaliação da linearidade. O preparo das amostras foi realizado conforme descrito no item 3.8.1.2. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica. Os LOD e LOQ foram determinados conforme descrito no item 3.9.1.

A precisão foi avaliada mediante a repetibilidade, a amostra foi fortificada em dois níveis de concentração ($0,10 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$). A precisão intra-dia foi realizada em cinco replicatas ($n=5$). A precisão inter-dia (dias diferentes) foi realizada em outro dia em cinco replicatas ($n=10$). A precisão foi demonstrada através da dispersão dos resultados e o cálculo foi realizado conforme a Equação 1 no item 1.10.3.

A exatidão do método foi expressa através do valor percentual de recuperação dos analitos adicionados à amostra nos níveis de concentração de $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em cinco replicatas ($n=5$). Para a

quantificação foi utilizada a curva analítica no solvente processada no SPE. O cálculo da exatidão foi realizado conforme a Equação 2 no item 1.10.4.

3.9.3. Validação do método – amostras de esmalte (extração em fase sólida *off-line*)

O método foi validado através da construção de curvas analíticas em seis níveis de concentração em solvente (5,0 – 10,0 – 15,0 – 20,0 – 25,0 – 40,0 ng mL⁻¹), utilizando 20,0 ng mL⁻¹ do PI para avaliação da linearidade. O preparo das amostras foi realizado conforme descrito no item 3.8.1.2. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica. Os LOD e LOQ foram determinados conforme descrito no item 3.9.1.

A precisão foi avaliada mediante a repetibilidade, a amostra foi fortificada em dois níveis de concentração (20 ng g⁻¹ e 40 ng g⁻¹). A precisão intra-dia foi realizada em cinco replicatas para cada nível de concentração ($n=5$). A precisão inter-dia (dias diferentes) foi realizada em um outro dia em três replicatas ($n=8$). A precisão foi demonstrada através da dispersão dos resultados e o cálculo foi realizado conforme a Equação 1 no item 1.10.3.

A exatidão do método foi expressa através do valor percentual de recuperação dos analitos adicionados à amostra nos níveis de concentração de 20 ng g⁻¹ e 40 ng g⁻¹. As análises foram realizadas em cinco replicatas para cada concentração ($n=10$), para a quantificação foi utilizada a curva analítica no solvente processada no SPE. O cálculo da exatidão foi realizado conforme a Equação 2 no item 1.10.4.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Desenvolvimento/ otimização do método LC-UHPLC-MS/MS

As condições do espectrômetro de massas sequencial foram baseadas em trabalho anterior do grupo (SANTOS, 2018) e estão apresentadas no item 3.7.3. Neste trabalho, além da NDELA, foram monitoradas mais oito *N*-nitrosaminas. Devido a diferença de polaridade entre os analitos, a fonte APCI foi empregada para garantir ionização eficiente para todas as *N*-nitrosaminas em estudo.

4.1.1. Avaliação da fase estacionária da coluna LC na primeira dimensão

Para a otimização do método foram avaliadas as áreas e os formatos dos picos cromatográficos de nove *N*-nitrosaminas (NDELA, NDMA, NDEA, NMEA, NMOR, NPIP, NPYR, NDBA e NDPLA), priorizando a NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, por serem os compostos de maior interesse para esmaltes de unhas. Os analitos apresentados nos gráficos a seguir estão em ordem decrescente de polaridade, sendo a NDELA o analito mais polar e a NDBA o analito menos polar.

Inicialmente foi avaliada a coluna HLB OASIS (20 μ m) na primeira dimensão cromatográfica com as condições estabelecidas em trabalho anterior do grupo (SANTOS, 2018): coluna analítica Acquity UPLC[®] HSS T3 na segunda dimensão, volume de injeção 50 μ L, vazão de carregamento da amostra 0,87 mL min⁻¹, tempo de carregamento da amostra e *clean-up* de 0,27 min e gradiente de eluição na bomba BSM com vazão de 0,30 mL min⁻¹. No entanto, como outras *N*-nitrosaminas seriam determinadas se fez necessário avaliar o método para essa condição.

As condições empregadas foram adequadas para a NDELA, no entanto as demais *N*-nitrosaminas, nesta condição, apresentaram picos cromatográficos alargados conforme apresentado no Anexo I. Mesmo fazendo alterações na composição da fase móvel não foram observadas melhoras significativas nos formatos dos picos.

Em um primeiro ensaio foram avaliados diversos tempos de carregamento da amostra na coluna da primeira dimensão: 0,25, 0,30, 0,40, 0,50 e 0,70 min a uma vazão de 0,87 mL min⁻¹, ou seja, 0,218 mL; 0,261 mL; 0,348 mL; 0,435 mL; 0,609 mL (vazão x tempo), usando água como solvente de carregamento. A fase móvel da na segunda dimensão foi uma mistura de ácido fórmico 0,01% e metanol. Foram avaliadas as áreas dos picos cromatográficos no intuito de verificar em que momento

haveria perda do analito na aplicação da amostra na coluna da primeira dimensão. Uma solução padrão contendo 50 ng mL^{-1} das *N*-nitrosaminas e 300 ng mL^{-1} do PI foi utilizada para fazer esses ensaios.

Nos testes exploratórios realizados com a coluna HLB OASIS na primeira dimensão, os melhores resultados obtidos foram utilizando o tempo de carregamento da amostra de 0,25 min (ou 0,218 mL) ou 0,30 min (ou 0,261 mL). Em um tempo de carregamento maior houve perda do sinal da NDELA (Figura 4), pois esse analito é o mais polar e possui menor fator de retenção com a fase estacionária da coluna HLB OASIS.

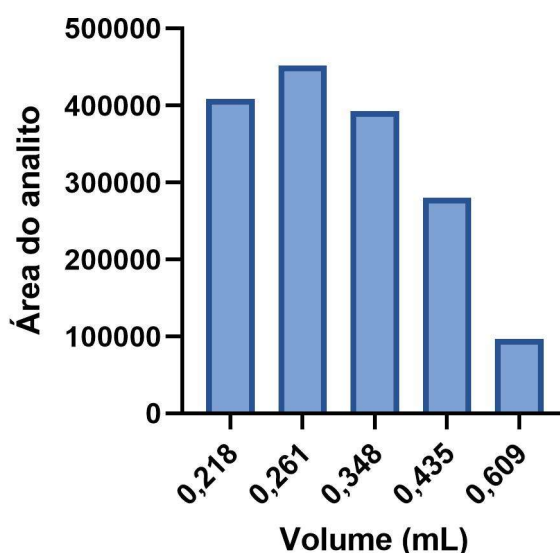


Figura 4: Área da NDELA em diferentes tempos de viragem das válvulas. Solução padrão fortificada com 50 ng mL^{-1} das *N*-nitrosaminas e 300 ng mL^{-1} do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

Em 0,70 min (ou 0,609 mL) houve a perda da NDPLA. Em relação as demais tempos de carregamento não houve perda do sinal (Figura 5), no entanto os picos cromatográficos começaram a ficar deformados. Na primeira dimensão foi utilizado apenas água e em relação a fase móvel na segunda dimensão os melhores resultados foram obtidos utilizando água:metanol 70:30 v/v com 0,01% de ácido fórmico na fase aquosa.

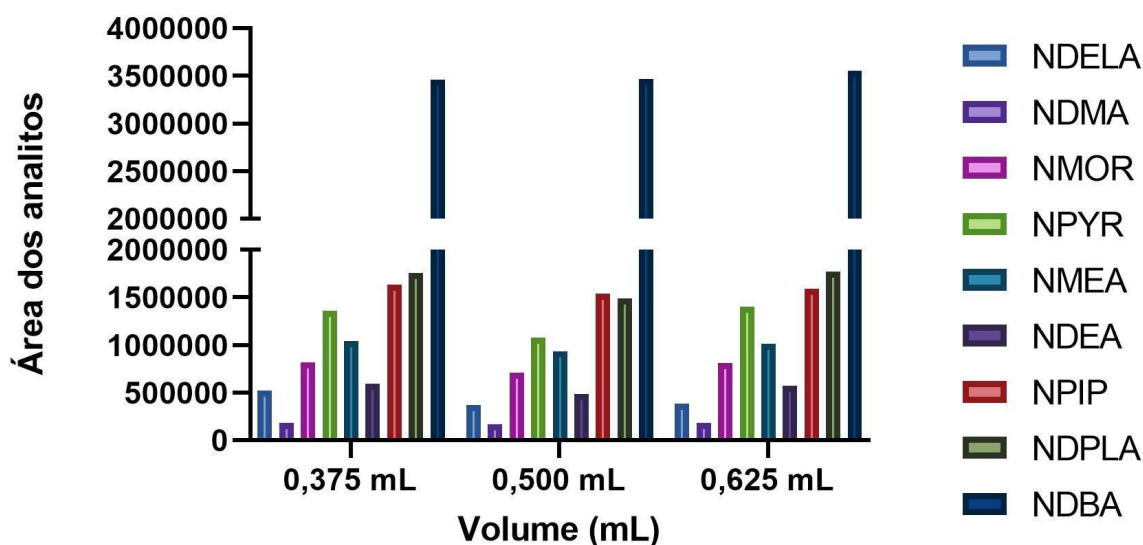


Figura 5: Área dos analitos em diferentes tempos de viragem das válvulas. Solução padrão fortificada com 50 ng mL⁻¹ das *N*-nitrosaminas e 300 ng mL⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

Em um ensaio subsequente foi avaliada a coluna Atlantis (tamanho de partícula de 3 µm) na primeira dimensão. Essa coluna tem um tamanho de partícula menor do que a HLB Oasis avaliada anteriormente, o que resulta em um número maior de pratos e uma maior eficiência. Ainda, a fase estacionária da coluna Atlantis é indicada para separação de compostos polares. Nesta coluna a vazão de carregamento da amostra foi ajustada para 1,0 mL min⁻¹.

O primeiro teste realizado com após a troca da coluna foi utilizando apenas água na primeira dimensão para o carregamento da amostra. Um tempo de carregamento maior, de 0,50 min (ou 0,500 mL), foi utilizado com o intuito eliminar interferentes polares. No entanto, nessas condições foi observada perda de sinal (em área) da NDELA. Testes adicionais foram realizados de modo a conseguir melhor sinal e formato de pico cromatográfico para esse analito. Primeiramente foi realizado um aumento na vazão da coluna para 1,25 min⁻¹, alterando o volume de carregamento da amostra para 0,625 mL (ou 0,50 min). Em seguida foi avaliado o uso de metanol nas seguintes proporções: água:metanol (90:10 e 95:5, v/v, respectivamente). O metanol foi empregado para auxiliar na remoção dos interferentes, no entanto 10% desse solvente levou a perdas da NDELA quando comparado com a adição de 5% de metanol. Portanto a condição água e metanol 95:5 v/v apresentou melhoras no perfil

do pico cromatográfico da NDELA, sendo a condição adotada para os estudos subsequentes.

A coluna OASIS por ser constituída de uma fase estacionária polimérica, apresenta menor interação com compostos com características mais polares. A coluna Atlantis é a base de sílica, sendo indicada para compostos polares e apolares. Os ensaios realizados evidenciaram melhoras nos resultados ao empregar a coluna Atlantis conforme apresentado no Anexo I.

Posteriormente foram avaliadas diferentes condições para os parâmetros a seguir: aditivo da fase móvel, tempo de viragem das válvulas e proporções do solvente de carregamento. Para a determinação das condições foi utilizada uma solução contendo 100 ng mL^{-1} das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL^{-1} do PI. O volume de injeção foi de $200 \text{ }\mu\text{L}$ para cada teste realizado.

4.1.2. Aditivo da fase móvel no solvente de eluição

Quando os analitos possuem caráter básico, como é o caso das *N*-nitrosaminas, é comum o uso de um aditivo ácido na fase móvel para auxiliar na protonação dos analitos. A protonação é importante para que os analitos sejam direcionados para o MS/MS. No entanto, o uso de aditivo ácido na fase móvel pode prejudicar a separação cromatográfica em colunas de fase reversa quando se tem analitos de caráter básico. Para avaliar melhor esse efeito, foram testados o ácido fórmico e acetato de amônio como aditivos da fase móvel.

Os aditivos selecionados foram: ácido fórmico aquoso 0,01% v/v; ácido fórmico aquoso 0,1% v/v (pH entre 4,0 e 4,5) e acetato de amônio 5 mmol/L (pH entre 6 e 6,5).

A escolha dos aditivos foi baseada nos resultados observados em trabalho realizado anteriormente no grupo (SANTOS, 2018). Em todos os testes, o aditivo foi adicionado apenas na fase aquosa da fase móvel que alimenta a coluna analítica na segunda dimensão. De forma geral, não foram observadas mudanças significativas no formato dos picos e sensibilidade dos sinais entre as duas concentrações de ácido fórmico.

Com o uso do acetato de amônio houve redução nas áreas da NDMA (40%), NMOR (39%) e NDEA (18%) conforme apresentado na Figura 6, além deste aditivo causar alargamento na base do pico da NDELA, conforme pode ser visualizado nos cromatogramas na Figura 7. O acetato de amônio demonstrou menor eficiência de ionização para todos os analitos, que pode ser explicada pela supressão do sinal causada pela concentração do sal.

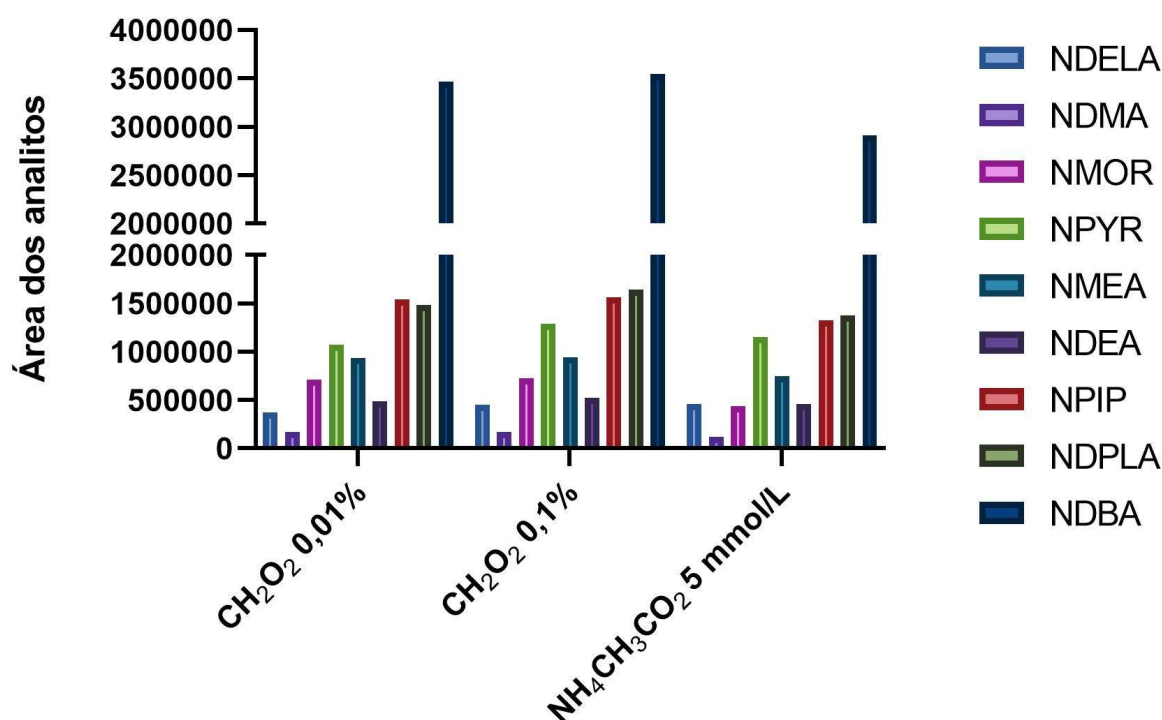


Figura 6: Área dos analitos usando diferentes aditivos na fase móvel. Solução padrão fortificada com 100 ng mL⁻¹ das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7. Coluna na primeira dimensão: Atlantis.

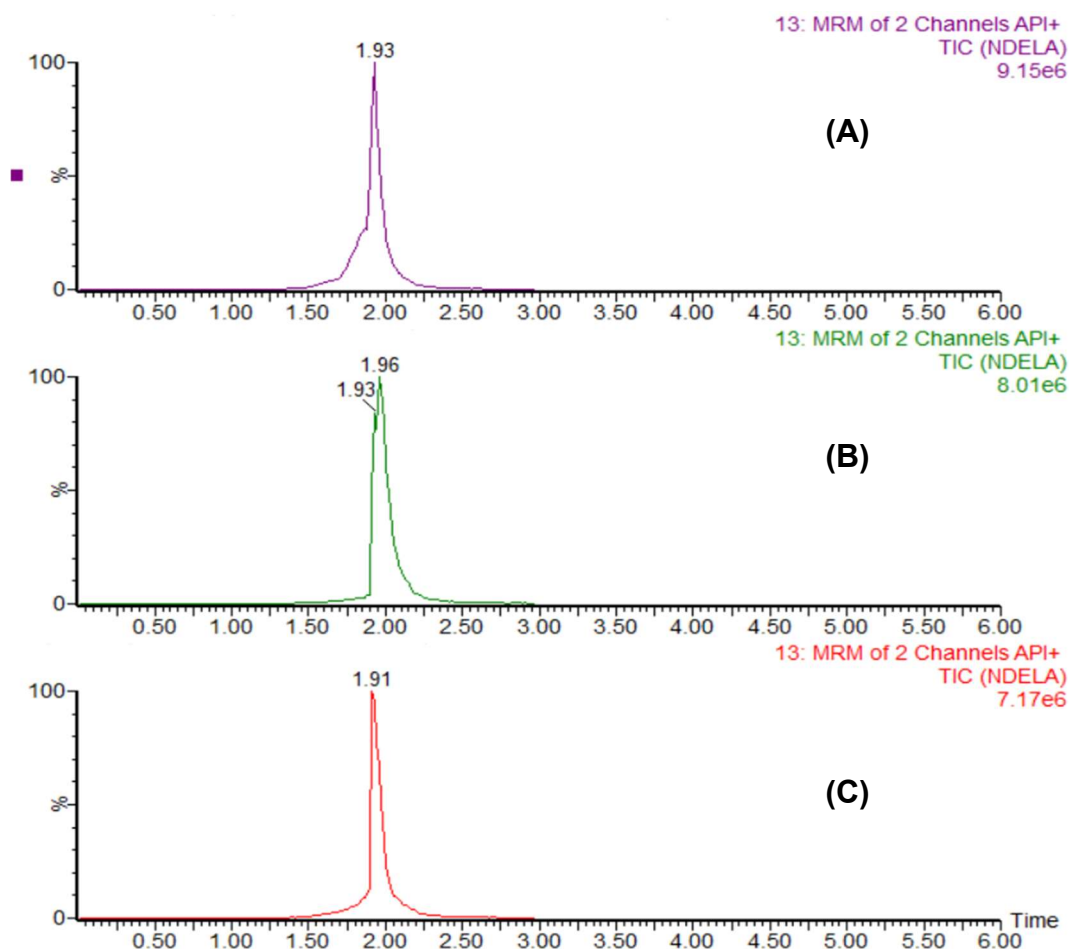


Figura 7: Cromatogramas da NDELA em função da variação do aditivo na fase móvel. (A) acetato de amônio 5 mmol/L, (B) 0,1% de ácido fórmico e (C) 0,01% de ácido fórmico.

4.1.3. Condições cromatográficas na primeira dimensão

A primeira dimensão cromatográfica tem o objetivo de selecionar a fração de interesse contendo os analitos e remover concomitantes polares da matriz, visando um aumento de sinal e minimizar o efeito matriz. Sendo assim, é vantajoso usar um solvente de carregamento de força cromatográfica fraco e um volume grande, mas sem que isso leve a perda dos analitos. A válvula fica na Posição 1, o que indica que o eluato da coluna LC é direcionado para o descarte. Foram avaliados a composição do solvente de carregamento e o volume de carregamento. O volume de carregamento é definido pela viragem da válvula da Posição 1 para a Posição 2. Na Posição 2, a fração com os analitos que estavam na coluna da primeira dimensão é transferida para a coluna analítica na segunda dimensão. O tempo de viragem da

válvula é crítico, podendo levar a perda do analito que tem menor afinidade pela fase estacionária da coluna na primeira dimensão. Os testes foram realizados virando as válvulas nos tempos de: 0,30 min, 0,40 min e 0,50 min em uma vazão de 1,25 mL min⁻¹, ou seja, 0,375 mL; 0,500 mL e 0,625 mL volume (vazão x tempo). A fase de carregamento é composta de água:metanol 95:5 v/v.

Os testes realizados não mostraram diferenças significativas, porém, ao aumentar o tempo da viragem da válvula para 0,50 min (ou 0,625 mL) ocorreu perda do analito mais polar (NDELA) quando comparado com a viragem em 0,30 min (ou 0,375 mL). A viragem da válvula em 0,30 e 0,40 min não resultou em diferenças significativas nos resultados (Figura 8). Com o objetivo de ter um *clean-up* mais efetivo, principalmente em relação aos esmaltes de unhas, o tempo de viragem de 0,40 min (ou 0,500 mL) foi definido como a melhor condição.

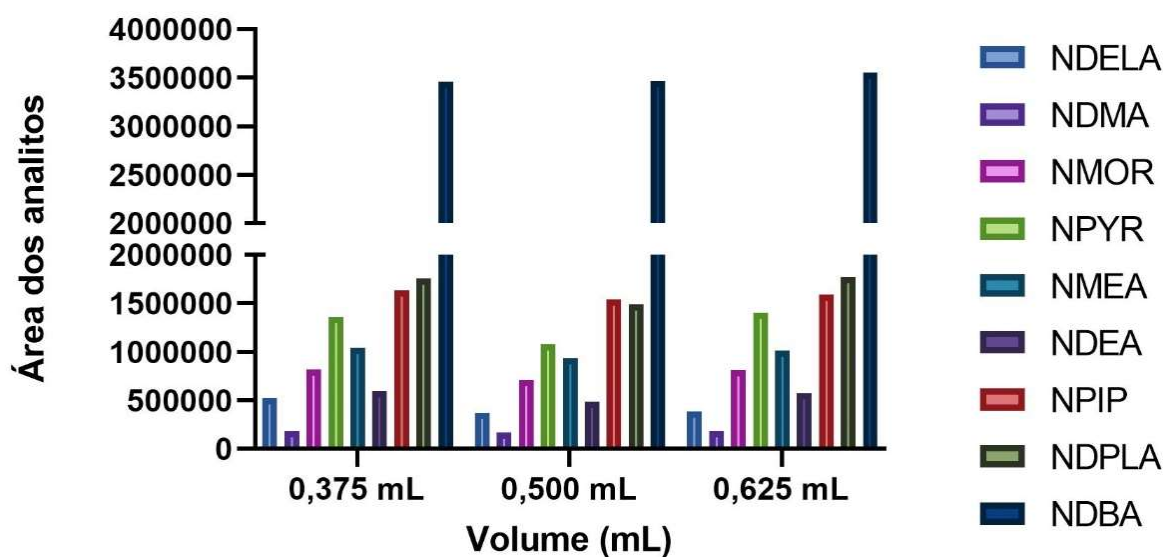


Figura 8: Área dos analitos em diferentes tempos de viragem das válvulas. Solução padrão fortificada com 100 ng mL⁻¹ das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

O carregamento da amostra é realizado pela bomba QSM. A composição do solvente de carregamento (fase móvel) influencia na interação dos analitos com a fase estacionária da coluna LC, podendo aumentar ou diminuir a retenção na coluna.

Devido a maior polaridade do primeiro analito a sair da coluna (NDELA), baixas proporções de metanol foram testados para não perder esse analito na etapa

de carregamento. As condições avaliadas foram: 100% de água; água:metanol 95:5 v/v e água:metanol 90:10 v/v (Figura 9).

A proporção de água:metanol 90:10 v/v causou alargamento no pico da NDELA e cerca de 20% de diminuição na área da NMOR e NDMA e 15% na área da NDEA. O carregamento com 100% de água apresentou leve melhora nos resultados, porém, a adição de fase orgânica no carregamento auxilia no *clean-up* da amostra. Dessa forma a proporção de água:metanol 95:5 v/v foi definida como a melhor condição.

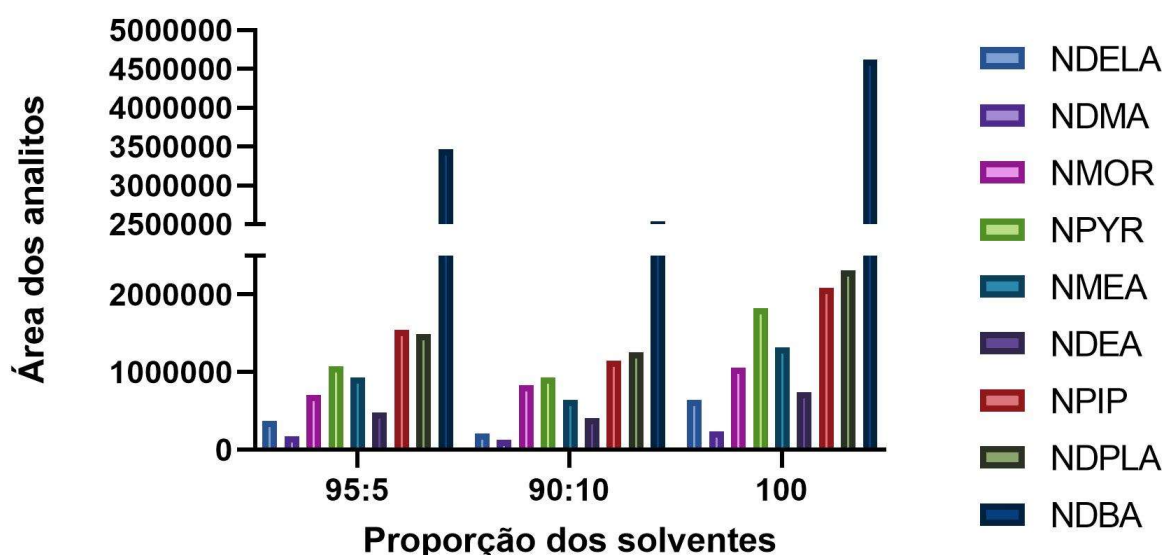


Figura 9: Área dos analitos usando diferentes proporções (v/v) de solventes água:metanol na QSM. Solução padrão fortificada com 100 ng mL⁻¹ das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

Também foi avaliado o tempo de regeneração da coluna LC. Esse tempo foi determinado levando em consideração que todos os analitos precisam ser eluídos para a segunda dimensão cromatográfica antes de se iniciar este processo. Na lavagem devem ser removidos compostos da matriz e na regeneração a fase deve estar equilibrada com o solvente para a próxima injeção. No tempo de 4,5 min (Tabela 5) a válvula é retornada para a Posição 1 e neste tempo se inicia a lavagem da coluna de LC por 0,50 min com água:metanol 20:80 v/v. Em seguida a coluna é condicionada durante 1 min com o solvente de carregamento inicial. O tempo total da corrida cromatográfica totaliza 6 min e nesta condição não foi observado *carryover*.

Na Tabela 5 estão apresentadas as condições do método que foram definidas após os testes realizados e descritos anteriormente.

Tabela 5: Condições definidas para o método LC-UHPLC-MS/MS

BSM	Segunda dimensão ² D (coluna analítica)			QSM	Primeira dimensão - LC ¹ D			Válvulas		
	Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	Ácido Fórmico 0.01%		Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	Água		Tempo (min)	
	0	0,45	60	40	0	1,25	95	5	0	1 1
	0,40	0,45	60	40	4,50	1,25	95	5	0,40	2 1
	3,00	0,45	5	95	4,51	1,25	20	80	4,50	1 1
	4,50	0,45	5	95	5,00	1,25	20	80		
	5,00	0,45	60	40	5,10	1,25	95	5		

Uma vez estabelecidas as condições para a quantificação das *N*-nitrosaminas, foram avaliados os preparos de amostras. O preparo das amostras é a etapa mais crítica na determinação de *N*-nitrosaminas, devido à complexidade das matrizes (água e esmaltes de unhas) e pelo fato das baixas concentrações desses analitos ng L⁻¹/ ng kg⁻¹ a ng mL⁻¹/ ng g⁻¹ (ppt a ppb, respectivamente).

4.2. Determinação de *N*-nitrosaminas em água

4.2.1. Quantificação direta por LC-UHPLC-MS/MS

Na análise direta das amostras de água, o preparo de amostra se resume na adição do PI e filtração, o que é um procedimento rápido, sem uso de cartuchos SPE (que elevam o custo por análise) e dispensa o uso de solventes. Esse procedimento foi avaliado para verificar os LOQ que seriam possíveis de serem alcançados. Inicialmente ficou evidente que os LOQ seriam dependentes das propriedades físico-químicas de cada *N*-nitrosamina e do processo de ionização na fonte APCI.

4.2.1.1. Validação do método – Quantificação direta por LC-UHPLC-MS/MS

O desenvolvimento do método LC-UHPLC-MS/MS e avaliação do preparo de amostra por SPE levou em consideração os seguintes parâmetros de validação: faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra e inter-dia

e exatidão. A validação foi realizada para as nove *N*-nitrosaminas: NDELA, NDMA, NMOR, NDEA, NMEA, NPYR, NPIP, NDBA e NDPLA. O uso do padrão isotopicamente marcado (*surrogate*) para cada analito foi essencial para que o método atingisse os objetivos a que se propõe.

4.2.1.2. Faixa linear e linearidade

As curvas analíticas foram construídas no solvente água em nove níveis de concentração (0,10 – 0,5 – 1,0 – 2,0 – 5,0 – 10,0 – 15,0 – 20,0 – 25,0 ng mL⁻¹), utilizando 10,0 ng mL⁻¹ do PI para avaliação da linearidade. Essa faixa ampla foi selecionada considerando que os LOQ para cada *N*-nitrosamina não é o mesmo (vide item 4.2.1.3). As curvas analíticas foram construídas plotando as razões das áreas dos picos nas *N*-nitrosaminas e das *N*-nitrosaminas deuteradas em função da concentração do analito (ng mL⁻¹). A Figura 10 ilustra o gráfico da curva no solvente e a Figura 11 o gráfico de resíduos para as *N*-nitrosaminas e seus respectivos padrões internos: NDELA (NDELA-d₈), NDMA (NDMA-d₆), NMOR (NMOR-d₄), NDEA (NDEA-d₁₀), NMEA (NMOR-d₄), NPYR (NPYR-d₄), NPIP (NPIP-d₁₀), NDBA (NMOR-d₄) e NDPLA (NDPLA-d₁₄).

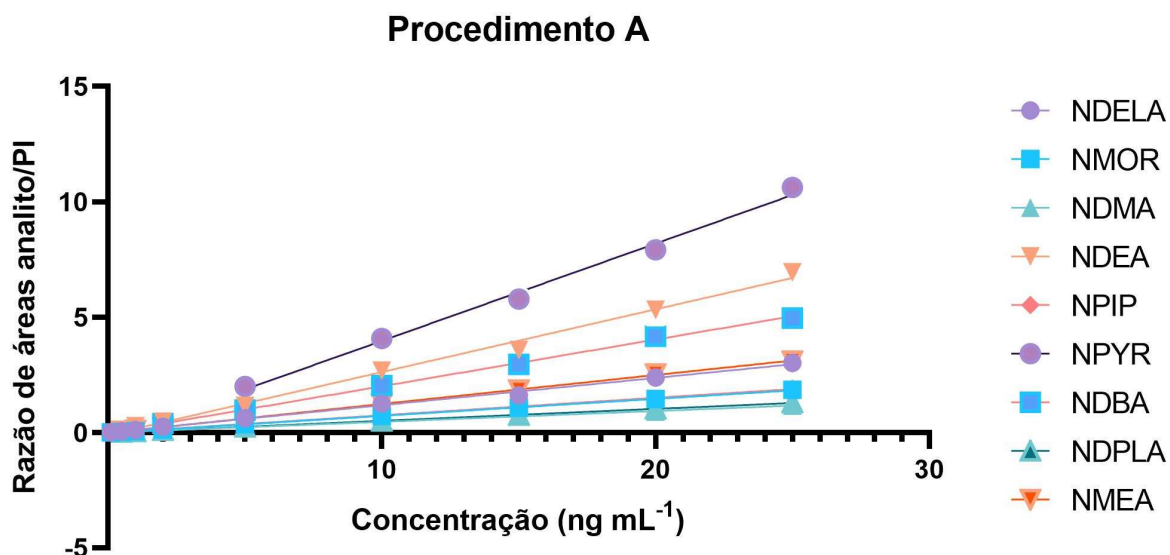


Figura 10: Curvas analíticas para as *N*-nitrosaminas (0,10 - 25,0 ng mL⁻¹) com adição do PI na concentração de 10,0 ng mL⁻¹.

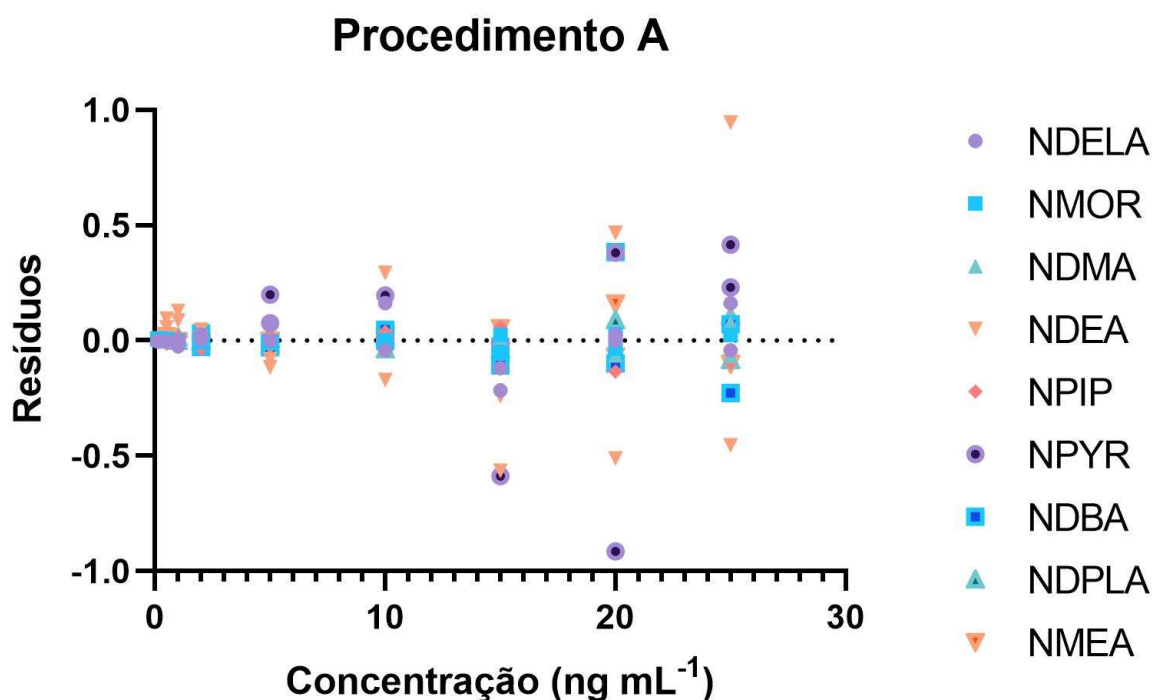


Figura 11: Gráfico de resíduos das curvas analíticas para as *N*-nitrosaminas (0,10 - 25,0 ng mL⁻¹) com adição do PI na concentração de 10 ng mL⁻¹.

Os parâmetros estatísticos estão apresentados na apresentados na Tabela

6.

Tabela 6: Parâmetros estatísticos para a curva analítica (Procedimento A).

Parâmetro	NDELA	NDMA	NDEA	NMEA	NMOR	NPIP	NPYR	NDBA	NDPLA
m	0,1182	0,0468	0,2719	0,1256	0,0735	0,0755	0,4214	0,2022	0,0518
b	0,0069	0,0007	-0,0954	-0,0138	-0,0079	0,0001	-0,2391	-0,0114	-0,0052
r	0,9968	0,9964	0,9884	0,9984	0,9995	0,9958	0,9909	0,9964	0,9940
s_{y/x}	0,0878	0,0365	0,3902	0,0649	0,0203	0,0647	0,4523	0,1520	0,0530

m: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r: coeficiente de regressão linear; s_{y/x}: erro padrão da curva.

4.2.1.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada uma das *N*-nitrosaminas foram estimados para que pelo menos a razão sinal/ruído 3:1 e 10:1, respectivamente, fossem atingidos. Para algumas *N*-nitrosaminas valores maiores das razões foram considerados em um cenário mais conservador, avaliando o cromatograma como um todo e os objetivos do trabalho. Os LOQ e LOD adotados estão apresentados na Tabela 6. Na Figura 12 estão apresentados os cromatogramas

da NMOR, NDMA, NDELA, NDEA em seus respectivos LOQ (0,10; 1,0; 0,10; 0,50 ng mL⁻¹).

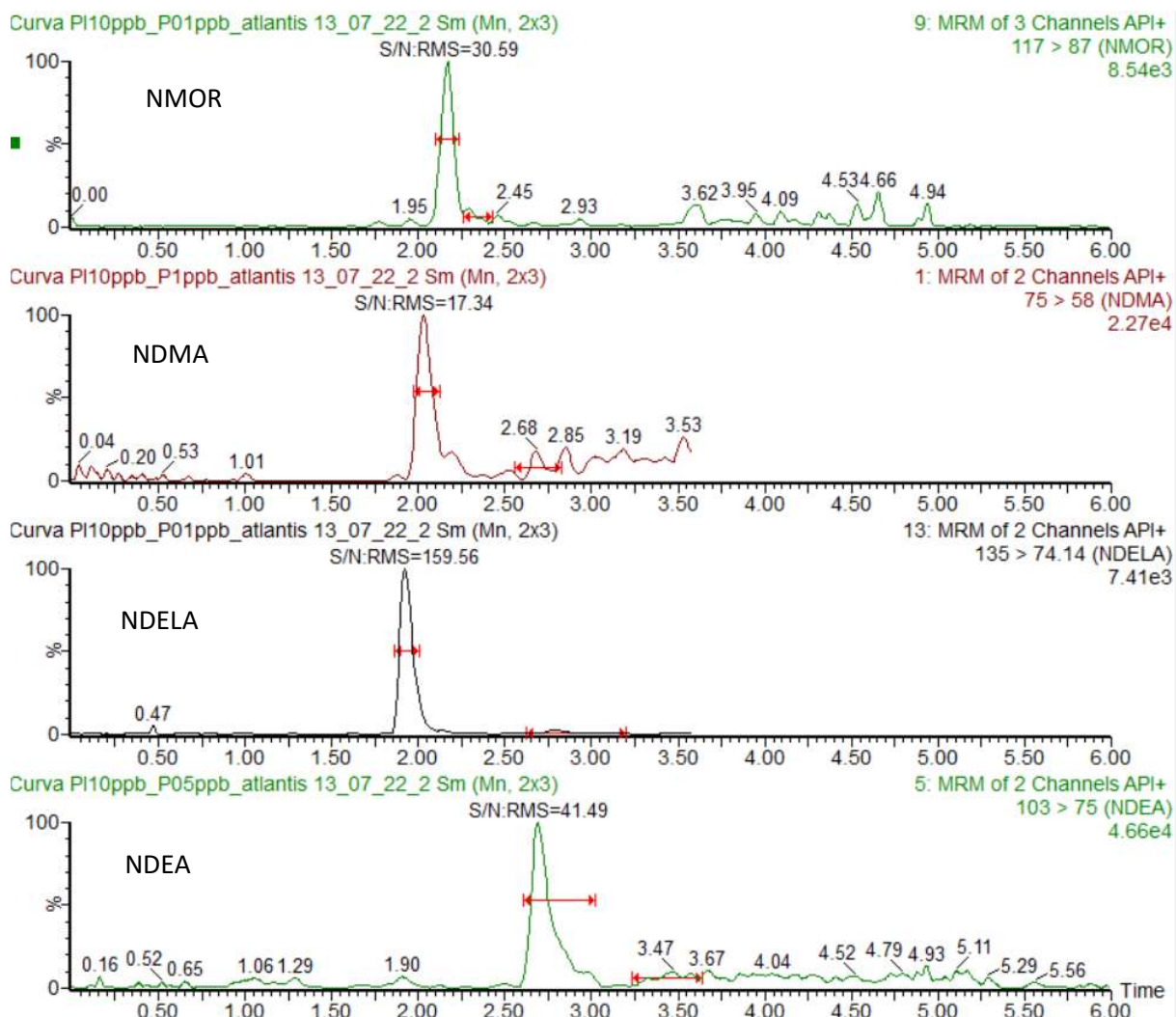


Figura 12: Cromatogramas da NMOR (0,1 ng mL⁻¹), NDMA (1 ng mL⁻¹), NDELA (0,1 ng mL⁻¹) e NDEA (5 ng mL⁻¹) em seus respectivos LOQ. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7

4.2.1.4. Precisão

A precisão intra-dia foi avaliada para dois níveis de concentração 0,50 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹ para cada uma das *N*-nitrosaminas através da fortificação das amostras branco, as quais foram preparadas em cinco replicatas (n=5) independentes no mesmo dia, pelo mesmo analista e analisadas no mesmo equipamento. A precisão inter-dia foi realizada da mesma forma, porém, em dois dias não consecutivos e com três replicatas (n= 11).

A equação de *Horwitz* foi utilizada para determinar o coeficiente de variação (CV) interlaboratorial. Para as concentrações de 0,50 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹, a equação de *Horwitz* preconiza CV de 50,23 e 35,52%, respectivamente. No entanto, esses valores são determinados para ensaios realizados em diferentes laboratórios. Devido ao fato dessas análises terem sido realizadas em um mesmo laboratório, 2/3 do valor calculado pela equação de *Horwitz* foi estabelecido como critério de aceitação. Esse valor representa um CV de 33,5% para a concentração de 0,5 ng mL⁻¹ e 23,7% para a concentração de 5,0 ng mL⁻¹, sendo considerados adequados ao objetivo do trabalho. Através dos resultados apresentados na Tabela 7, conclui-se que o método apresenta repetitividade aceitável.

4.2.1.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação de dois níveis de concentração das *N*-nitrosaminas (0,50 ng mL⁻¹ e 5,0 ng mL⁻¹) adicionadas nas amostras, as quais foram preparadas em cinco replicatas independentes (n=5).

Os resultados estão expressos em porcentagem de recuperação e estão apresentados na Tabela 7. Os valores variaram entre 90,9 e 104,4% para todas as *N*-nitrosaminas e esses valores foram considerados aceitáveis para esse trabalho, considerando o nível de concentração e o objetivo do método.

Tabela 7: Parâmetros de validação do método de determinação de *N*-nitrosaminas em água (Procedimento A).

Parâmetro	NDELA	NDMA	NDEA	NMEA	NMOR	NPIP	NPYR	NDBA	NDPLA
Faixa linear (ng mL⁻¹)	0,1 – 25	1 – 25	0,5 – 25	0,5 – 25	0,1 – 25	0,5 – 25	5 – 25	2 – 25	0,5 – 25
Linearidade (r)	0,9925	0,9907	0,9963	0,9943	0,9932	0,9927	0,9943	0,9925	0,9949
Precisão intra-dia (%)									
0,5 ng mL ⁻¹	6,9	*	18,4	9,8	9,9	12,0	*	*	10,0
5 ng mL ⁻¹	2,6	4,1	7,4	3,4	3,4	2,0	7,9	4,1	2,4
Precisão inter-dia (%)									
0,5 ng mL ⁻¹	17,7	*	16,1	12,7	9,3	17,1	*	*	8,5
5 ng mL ⁻¹	6,8	5,1	10,6	4,6	5,2	4,1	7,8	11,9	5,7
Exatidão (%)									
0,5 ng mL ⁻¹	90,9	*	100,6	101,4	97,7	101,4	*	*	99,4
5 ng mL ⁻¹	104,4	102,2	93,6	100,8	100,8	99,1	100,4	96,0	99,1
LOQ (ng mL⁻¹)	0,1	1	0,5	0,5	0,1	0,5	5	2	0,5
Sinal-ruído no LOQ	159	17	41	36	30	17	10	47	10
LOD (ng mL⁻¹)	0,05	0,3	0,2	0,2	0,05	0,2	2	1	0,2

* Não foi possível estabelecer a precisão e exatidão para essas *N*-nitrosaminas nas concentrações adotadas porque o nível de concentração está abaixo do LOQ.

4.2.2. Concentração dos analitos em cartucho SPE de carvão e quantificação por LC-UHPLC-MS/MS

A SPE tem sido muito empregada no preparo de amostras (BIAN *et al.*, 2021; QIU *et al.*, 2021; TADA; RODRIGUES-SILVA; RATH, 2021; YURCHENKO; MÖLDER, 2006), pois permite realizar um *clean-up* da matriz da amostra e concentrar os analitos. Diversas fases estacionárias têm sido usadas como C18, carvão ativado, HLB, entre outras. O consumo de solventes orgânicos quando se usa a SPE é baixo, porém, devido ao número de etapas que envolvem esse procedimento pode ocorrer a perda dos analitos, além de consumir tempo no preparo das amostras (ZHONG; LI, 2017). Neste trabalho como fase sorvente foi selecionado o carvão de casca de coco (Supelclean™ Cocunut Carchoal SPE 2 g/6 mL), por ter sido empregado com sucesso na determinação de *N*-nitrosaminas em água (MUNCH; BASSETT, 2004; RIPOLLÉS *et al.*, 2011; VIZIOLI; HANTAO; MONTAGNER, 2021; WANG *et al.*, 2012, 2011).

A SPE envolve várias etapas críticas tais como a concentração dos analitos no cartucho que deve ser realizada de forma controlada para permitir a interação dos analitos com a fase sorvente e a etapa de eluição dos analitos da fase em que é necessário promover a interação dos analitos com os solventes de eluição.

Na literatura é reportado o uso de diclorometano para a eluição de *N*-nitrosaminas do carvão casca de coco (MUNCH; BASSETT, 2004; RIPOLLÉS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012, 2011), porém, a NDELA por ter um caráter mais polar, não elui do carvão apenas com esse solvente.

Devido a variação de polaridades das *N*-nitrosaminas avaliadas, foram avaliadas algumas condições de solventes de eluição. Além do diclorometano, a acetona foi selecionada para os testes, devido a sua característica polar e miscibilidade com o diclorometano. Foram avaliadas quatro diferentes condições com os solventes acetona e diclorometano. Uma alíquota de 10 mL de água foi fortificada com 10 ng mL⁻¹ do mix de *N*-nitrosaminas e 10 ng mL⁻¹ do PI. As amostras foram percoladas no cartucho de carvão SPE, conforme descrito no item 3.8.1.2, mudando apenas o solvente de eluição. As soluções avaliadas foram: diclorometano:acetona 1:1 v/v, 3:1 v/v, 1:3 v/v e diclorometano. As amostras foram preparadas em duplicatas.

A curva analítica foi construída no solvente água. A faixa de concentração de 25 a 150 ng mL⁻¹ com a adição de 100 ng mL⁻¹ do PI.

Ao utilizar apenas diclorometano na eluição, a NDELA e a NPIP ficaram retidas no cartucho. Ao eluir os analitos com a solução de diclorometano:acetona 3:1 v/v a NDELA permaneceu retida no cartucho. A solução de diclorometano:acetona 1:3 v/v possibilitou a eluição da NDELA, com uma recuperação de 68%. No entanto, o eluente diclorometano:acetona 1:1 v/v levou a uma recuperação de 91% para a NDELA, também favoreceu a eluição das demais *N*-nitrosaminas (Figura 13).

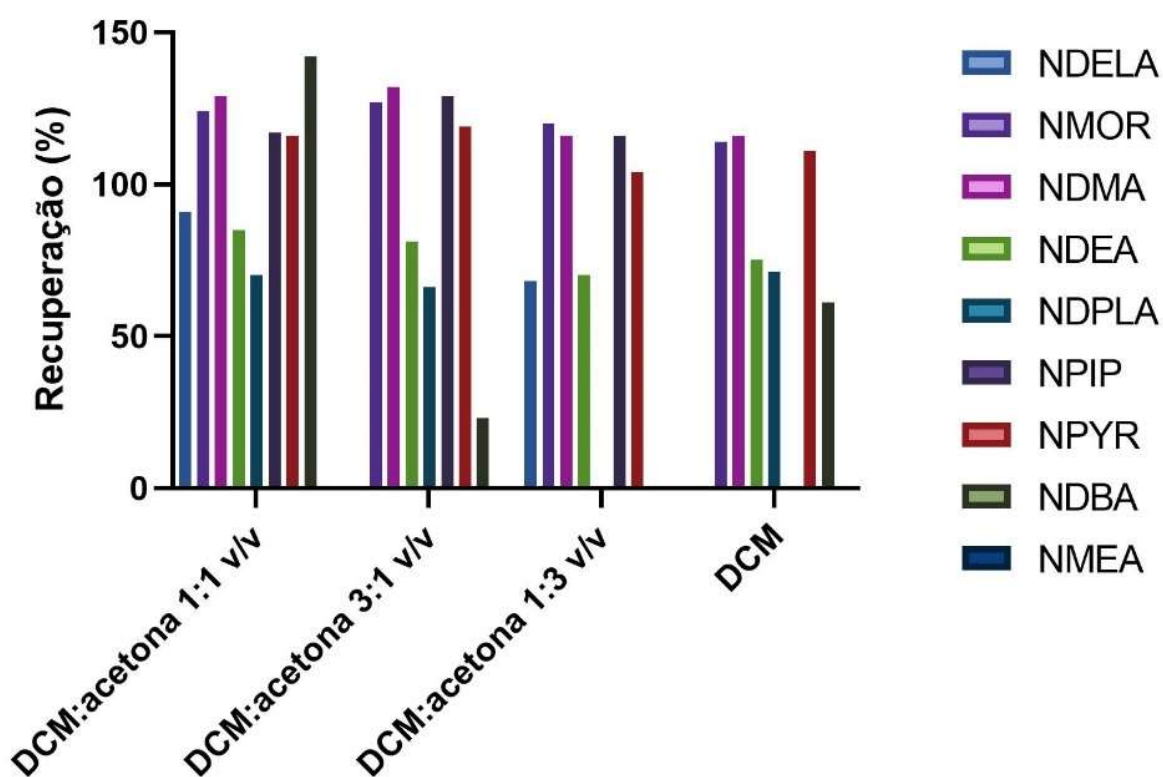


Figura 13: Recuperação (%) dos analitos usando diferentes solventes de eluição dos analitos do cartucho SPE. Solução padrão fortificada com 100 ng mL⁻¹ das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

Sendo assim, a solução de diclorometano:acetona 1:1 v/v foi selecionada para eluição das *N*-nitrosaminas do cartucho de carvão. Após a eluição, os solventes precisam ser evaporados, pois eles não são compatíveis com a coluna cromatográfica. No entanto os analitos também são voláteis, tornando essa etapa a mais crítica do processo.

Inicialmente, a evaporação estava sendo realizada sob fluxo de nitrogênio em banho de água (30 a 35 °C), porém, foi observado que não havia repetibilidade adequada nos resultados. Alguns testes foram realizados fazendo a evaporação no concentrador rotativo à pressão reduzida (40 °C), um sistema que permite controlar a pressão e a temperatura durante todo o processo. Uma alíquota de 50 µL de metanol foi adicionada para minimizar a perda dos analitos durante a evaporação.

Primeiramente foram avaliados dois parâmetros no uso do concentrador rotativo: a redução da pressão em relação à atmosférica e a temperatura. As pressões avaliadas foram de 460 mbar (n=4), 600 mbar (n=16) e 740 mbar (n=4), todas à 40 °C. A condição que levou a menor dispersão dos resultados e uma aceitável recuperação foi a pressão de 460 mbar. Nas demais condições, foram observadas perda de repetibilidade nos resultados (Figura 14).

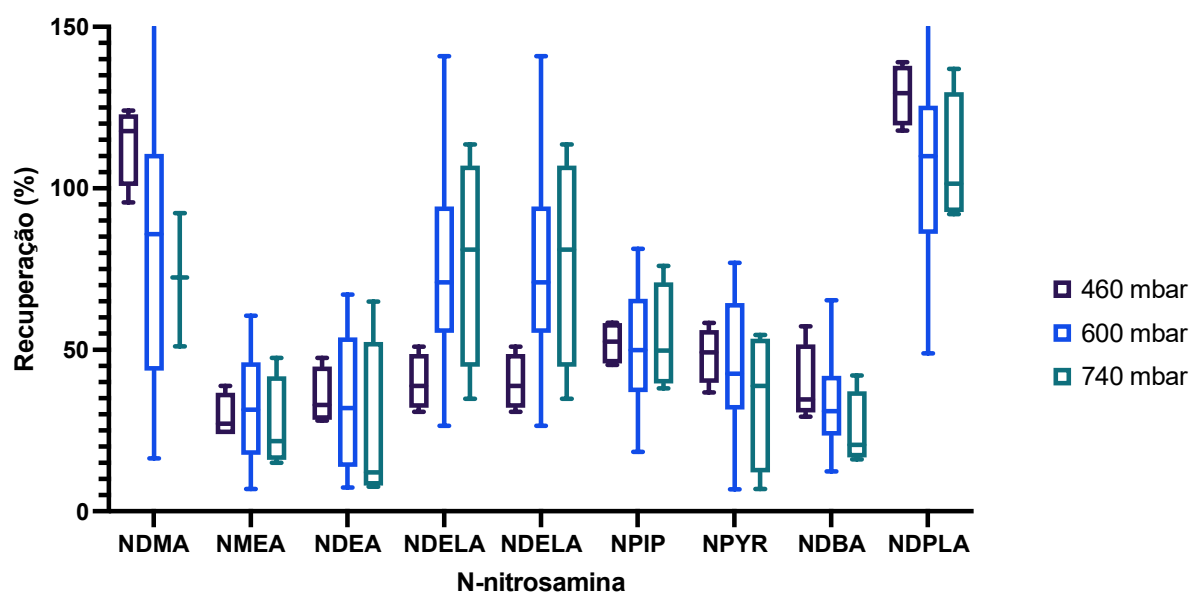


Figura 14: Recuperação dos analitos em diclorometano:acetona 1:1 v/v em diferentes condições. Solução padrão fortificada com 100 ng mL⁻¹ das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

Posteriormente, foram avaliadas outras condições em que a temperatura foi mantida em 35 °C e a rotação em 750 rpm. As variações foram realizadas na pressão reduzida: 450 mbar, 550 mbar e 600 mbar. Os analitos estavam na concentração de 10 ng mL⁻¹ em diclorometano:acetona 1:1 v/v. Foram avaliadas quatro replicatas para cada uma das condições mencionadas. Os resultados estão

apresentados na Figura 15, onde é possível verificar que nas condições de 35 °C, 750 rpm e 450 mbar, foram obtidos resultados satisfatórios em relação a recuperação dos analitos (10 ng mL^{-1}). Os maiores desvios são observados para a NMEA e NDBA, pois ambas não possuem seus próprios PI deuterados, sendo corrigidas com o uso da NMOR- d_4 . Contudo, essas duas *N*-nitrosaminas são menos importantes na análise das amostras alvo. Cabe ressaltar que dentre o preparo de amostras de *N*-nitrosaminas a etapa de evaporação dos solventes é a mais longa, dependendo da quantidade de amostras podem ser necessárias 7 horas apenas para a evaporação do solvente de eluição.

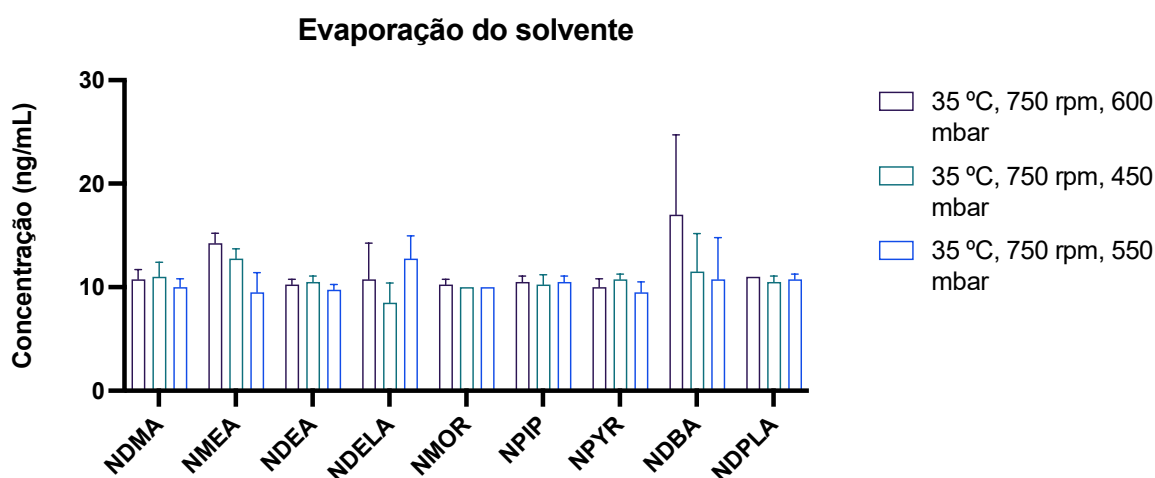


Figura 15: Concentração dos analitos em função da evaporação do solvente de eluição. Solução padrão fortificada com 10 ng mL^{-1} das *N*-nitrosaminas e 100 ng mL^{-1} do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

4.2.2.1. Validação do método - Concentração dos analitos em cartucho SPE de carvão

Para a validação do método LC-UHPLC-MS/MS foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra- e inter-dia e exatidão. A validação foi realizada para as nove *N*-nitrosaminas: NDELA, NDMA, NMOR, NDEA, NMEA, NPYR, NPIP, NDBA e NDPLA.

4.2.2.2. Faixa linear e linearidade

As curvas analíticas foram construídas no solvente água em cinco níveis de concentração (0,10 – 0,50 – 1,0 – 1,5 – 2,0 ng mL⁻¹), utilizando 1,0 ng mL⁻¹ do PI para avaliação da linearidade. As curvas analíticas foram construídas plotando as razões das áreas dos picos nas *N*-nitrosaminas e das *N*-nitrosaminas deuteradas em função da concentração do analito (ng mL⁻¹). As Figuras 16 e 17 ilustram os respectivos gráficos da curva no solvente e os gráficos de resíduos para a NDELA, NDMA, NMOR, NDEA, NMEA, NPYR, NPIP, NDBA e NDPLA.

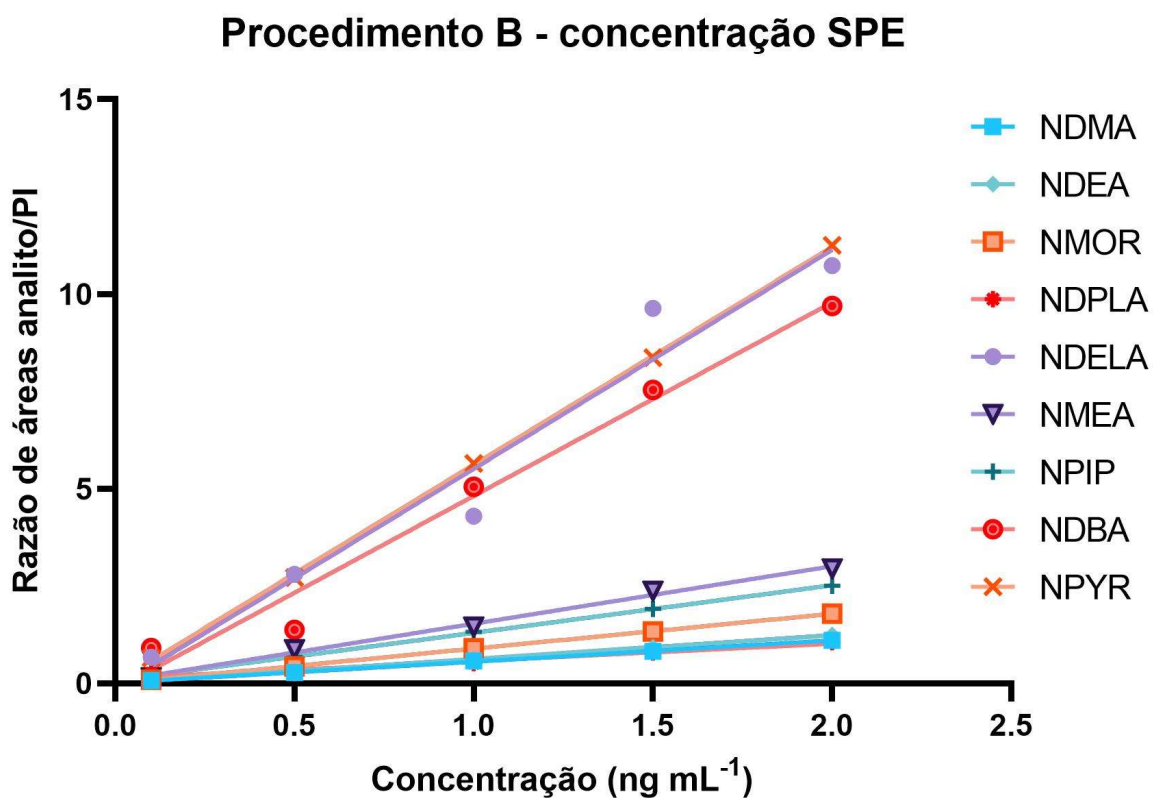


Figura 16: Curvas analíticas para as *N*-nitrosaminas (0,10 - 2,0 ng mL⁻¹) com adição do PI na concentração de 1,0 ng mL⁻¹.

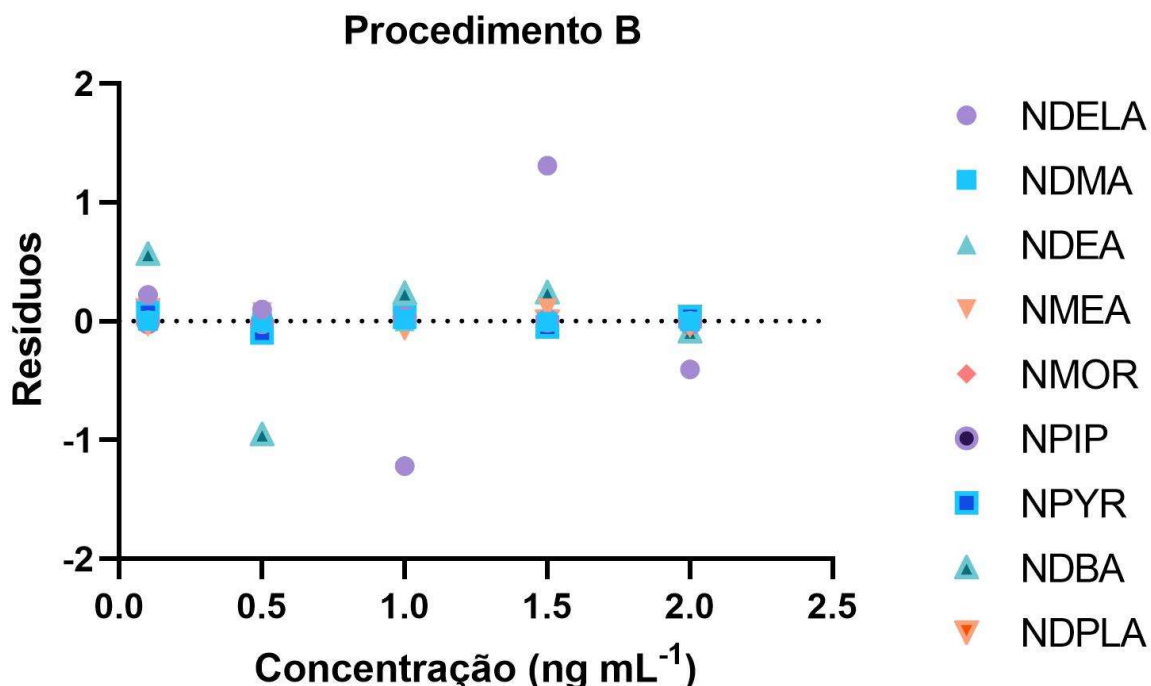


Figura 17: Gráfico de resíduos das curvas analíticas para as *N*-nitrosaminas (0,10 - 2,0 ng mL⁻¹) com adição do PI na concentração de 1,0 ng mL⁻¹.

4.2.2.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada uma das *N*-nitrosaminas foram estimados a partir da razão sinal/ruído 3:1 e 10:1, respectivamente e estão apresentados na Tabela 8. Do mesmo modo, como descrito anteriormente foi adotado uma avaliação conservadora e por isso os LOQ selecionados de algumas *N*-nitrosaminas apresentam uma razão sinal/ruído maior do que 10.

4.2.2.4. Precisão

A precisão intra-dia foi obtida para dois níveis de concentração 0,10 ng e 1,0 ng mL⁻¹ para cada uma das *N*-nitrosaminas através da fortificação das amostras, as quais foram preparadas em cinco replicatas ($n=5$) independentes no mesmo dia, pelo mesmo analista e analisadas no mesmo equipamento. A precisão inter-dia foi realizada da mesma forma, porém, em um outro dia com mais cinco replicatas ($n=10$).

A equação de *Horwitz* foi utilizada para determinar o coeficiente de variação (CV) interlaboratorial. Para as concentrações de 0,10 ng mL⁻¹ e 1,0 ng mL⁻¹, a equação de *Horwitz* preconiza um CV de 64,0 e 45,2%, respectivamente. No entanto, esses valores são determinados para ensaios realizados em diferentes laboratórios. Devido ao fato dessas análises terem sido realizadas em um mesmo laboratório, 2/3 do valor calculado pela equação de *Horwitz* foi estabelecido como critério de aceitação. Esse valor representa um CV de 42,7% para a concentração de 0,10 ng mL⁻¹ e 30,3% para a concentração de 1,0 ng mL⁻¹, sendo considerados adequados ao objetivo do presente trabalho. A precisão intra-dia da NMEA ficou pouco acima do valor estabelecido, 37%, no entanto essa *N*-nitrosamina não tem seu próprio PI, o que pode ter afetado o resultado, além do mais esse analito não é um dos mais importantes para esse trabalho. Para os demais analitos, pode-se dizer que o método apresentou repetitividade, pois os valores ficaram abaixo do estabelecido pela equação de *Horwitz*. Os resultados estão expressos como as estimativas dos desvios padrão relativo (RSD) na Tabela 8.

4.2.2.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação de dois níveis de concentração das *N*-nitrosaminas (0,10 ng mL⁻¹ e 1,0 ng mL⁻¹) adicionadas nas amostras branco, as quais foram preparadas em cinco replicatas (n=5).

Os resultados estão expressos em porcentagem de recuperação na Tabela 8. Com exceção da NMEA, NDBA e NPYR as demais *N*-nitrosaminas apresentaram uma faixa de exatidão variando entre 83,5 e 131,1% considerando o processo de preparo de amostras e a concentração dos analitos nas amostras. A NMEA e NDBA não possuem seus próprios PI na solução mix utilizada, o que pode ter afetado a quantificação desses analitos. Embora a NPYR tenha apresentado exatidão de 146%, esse analito não é de relevância para esse trabalho. De modo geral, foi possível diminuir os LOQ quando comparado com o Procedimento A. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros de validação do método de determinação de *N*-nitrosaminas em água (com concentração no SPE, Procedimento B).

Parâmetro	NDELA	NDMA	NDEA	NMEA	NMOR	NPIP	NPYR	NDBA	NDPLA
Faixa linear (ng mL⁻¹)	1-2,0	0,1-2,0	0,1-2,0	1-2,0	0,1-2,0	0,5-2,0	0,1-2,0	1-2,0	0,1-2,0
Linearidade (r)	0,9996	0,9998	0,9999	0,9997	0,9999	0,9997	0,9999	0,9995	0,9999
Precisão intra-dia (%)									
0,1 ng mL ⁻¹	*	16,8	18,1	*	2,1	*	13,1	*	13,0
1 ng mL ⁻¹	8,6	6,3	7,1	37,6	2,3	4,1	3,5	13,6	6,1
Precisão inter-dia (%)									
1 ng mL ⁻¹	1,6	1,8	4,9	7,0	1,5	2,2	3,0	10,3	2,6
Exatidão (%)									
0,1 ng mL ⁻¹	*	131,1	98,5	*	116,2	*	146,1	*	114,9
1 ng mL ⁻¹	84,4	95,6	83,5	54,5	103,8	108,4	102,6	19,6	88,7
LOQ (ng mL⁻¹)	1	0,1	0,1	1	0,1	0,5	0,1	1	0,1
Sinal-ruído no LOQ	626	107	236	1289	464	22	18	15	677
LOD (ng mL⁻¹)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

* Não foi possível estabelecer a precisão e exatidão para essas *N*-nitrosaminas nas concentrações adotadas.

Após a validação do método empregando para a quantificação dos analitos curvas em que os analitos em cada nível de concentração foram percolados em cartucho SPE (curva matrizada), foi preparada uma curva no solvente sem realizar a concentração no cartucho. O objetivo foi avaliar a possibilidade de usar a padronização interna em solvente para a quantificação das amostras concentradas em cartuchos, uma vez que os padrões internos iriam corrigir as perdas ou variações no preparo de amostras. Isso seria vantajoso pois iria melhorar a frequência analítica e ao mesmo tempo requerer menor quantidade de consumíveis o que reduz custos.

A faixa de concentração avaliada foi de 0,10 a 2,0 ng mL⁻¹ para cada *N*-nitrosamina (fator de concentração de 100 vezes) e PI na concentração de 1,0 ng mL⁻¹ (Procedimento B). Essas concentrações representariam a curva no solvente com a concentração de 10 a 200 ng mL⁻¹ e 100 ng mL⁻¹ do PI. Ao comparar as inclinações das curvas (Tabela 9), não foram encontradas diferenças significativas para os coeficientes angulares das curvas analíticas no solvente e percoladas no cartucho a um nível de confiança de 95% (teste t pareado) para a NDELA, NDMA, NDEA, NMOR, NPIP, NDPLA e NDBA. Para a NPYR e NMEA a diferença foi significativa. No caso da NMEA a falta do padrão deuterado deve causar essa diferença.

Considerando os resultados de forma global, conclui-se que as curvas no solvente podem ser utilizadas para quantificar as *N*-nitrosaminas nas amostras de água que foram concentradas por SPE *off-line*, agilizando o processo e reduzindo o uso de solventes e consumíveis. No entanto, cabe destacar que esse procedimento é apenas viável quando se usa a padronização interna com o PI do analito (*surrogate*).

Tabela 9: Coeficientes angular, linear e de correlação linear para as curvas analíticas usando LC-UHPLC-MS/MS (Curva analítica) e SPE+ LC-UHPLC-MS/MS (Procedimento B).

Curva analítica - Faixa de concentração de 10 a 200 ng mL ⁻¹									
Parâmetro	NDELA ^a	NDMA ^a	NDEA ^a	NMEA ^c	NMOR ^a	NPIP ^a	NPYR ^c	NDBA ^a	NDPLA ^a
m	0,0593	0,0052	0,0061	0,0118	0,0092	0,0129	0,0538	0,0470	0,0052
b	-0,1917	0,0136	0,0112	0,0290	0,0014	0,0296	-0,0328	-0,0445	0,0005
r	0,9981	0,9994	0,9998	0,9995	0,9999	0,9991	0,9998	0,9992	0,9999
s_{y/x}	0,2731	0,0130	0,0093	0,0279	0,0091	0,0407	0,0659	0,1434	0,0659
Procedimento B – Faixa de concentração de 0,10 a 2,0 ng mL ⁻¹ (fator de concentração 100 vezes = 10 a 200 ng mL ⁻¹)									
m/100	0,0562	0,0054	0,0061	0,0148	0,0089	0,0122	0,0559	0,0497	0,0045
b	-0,1094	0,0153	0,0129	0,0561	-0,0026	0,0772	0,0248	-0,1556	0,1248
r	0,9773	0,9997	0,9999	0,9971	0,9999	0,9998	0,9998	0,9884	0,9790
s_{y/x}	1,068	0,0117	0,0057	0,0989	0,0094	0,0184	0,0816	0,6706	0,0820

m: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r: coeficiente de regressão linear; s_{y/x}: erro padrão da curva. a: inclinações das curvas analíticas não diferem significativamente a um nível de confiança de 95%; c: inclinações das curvas analíticas diferem significativamente a um nível de confiança de 95%.

4.3. Esmaltes de unhas

A matriz dos esmaltes de unhas é complexa e muito variada. O número de substâncias e a quantidade na composição da formulação varia de acordo com o fabricante e tipo de esmaltes de unhas.

Neste trabalho foi realizado um levantamento com 30 esmaltes pertencentes a 12 diferentes marcas foram encontradas no total 131 diferentes matérias primas. Todas as informações foram retiradas dos rótulos nas embalagens. Uma amostra de esmalte tinha a informação no rótulo da presença de 31 diferentes compostos químicos.

Algumas matérias primas são comumente encontradas nos esmaltes de unhas, independentemente do tipo do esmalte, pois geralmente se trata de matérias primas base para a formação do produto. Nos 30 esmaltes avaliados essas matérias primas foram as seguintes (quantidade de esmaltes): acetato de etila (29), acetato de butila (29), álcool isopropílico (28), nitrocelulose (28) acetiltributylcitrato (21) e estercônio de hectorita (17). Os dados do levantamento completo estão apresentados no Anexo II.

Nas Tabelas 10 a 12 estão apresentadas as matérias primas presentes nos esmaltes de unhas analisados, dentre esses, o Esmalte A é o que possui maior quantidade de matérias primas em sua composição, totalizando 23 substâncias diferentes. Esse resultado evidencia a necessidade do *clean-up* durante o preparo das amostras. Na Tabela 13 consta o número de substâncias presentes em cada um desses esmaltes.

Tabela 10: Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes de unhas analisados.

Codificação do esmalte	Acetato		Ácido		Álcool			Alumina	BHT	Cetona		Citrato		Copolímero		Esteralcônio de Hectorita	Etilcelulose	Extrato de Flor Orchis Masculina	Flogopita Sintética
	ETILA	BUTILA	MÁLICO	CÍTRICO	ÁLCOOL	DIACETONA	ISOPROPÍLICO			ACETONA	BENZOPHENONE-1	ACETIL TRIBUTIL	TRIBUTIL	ACRILATO	GLICERINA GLICIDIL DECANOATO				
A	X	X	-	X	-	-	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X
C	X	X	-	-	X	-	X	-	-	PC	-	X	-	PC	-	X	-	-	-
D	X	X	-	-	X	X	X	-	X	-	-	X	-	-	-	-	X	X	-
E	X	X	X	-	X	X	X	-	-	-	-	X	-	PC	-	X	PC	-	PC

Tabela 11: Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes de unhas analisados (continuação).

Codificação do esmalte	Ftálico		Hidróxido de Alumínio	Neopentil Glicol	Nitrocelulose	Óleo de Semente Girassol	Óleo de Soja	Óxido de Estanho	Pigmentos	Polietileno Oxidado	Resina			
	ANIDRIDO FTÁLICO	TEREFTALATO DE POLIETILENO									COLOFÔNIO	EPÓXI	ETIL TOSILAMIDA	TOSILAMIDA/FORMALDEÍDO
A	X	-	X	X	X	-	-	-	PC	X	X	-	X	-
C	-	-	PC	-	X	-	-	-	PC	-	-	-	-	X
D	-	-	-	-	X	X	X	-	X	-	-	-	-	X
E	-	PC	-	PC	X	-	-	X	X	-	-	-	-	X

Tabela 12: Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes de unhas analisados (continuação).

Codificação do esmalte	Rosmarinus Officinalis Leaf	Sílica					Tolueno
		ALUMÍNIO, CÁLCIO E SÓDIO	BOROSILICATO DE CÁLCIO E SÓDIO	BOROSILICATO DE CÁLCIO E ALUMÍNIO	DIMETIL SILILATO	SÍLICA	
A	-	-	X	X	-	X	-
C	-	x	-	-	X	-	X
D	X	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	X	PC	-

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Tabela 13: Quantidade de substâncias presentes nos esmaltes analisados (informações de rótulo).

Codificação do esmalte	Quantidade de substâncias
A	23
C	11
D	15
E	13

4.3.1. Preparo de amostras de esmaltes de unhas usando extração com solvente

Para o preparo de amostras foram realizados diversos testes (Testes 1 a 5, vide 3.8.3.1), os quais estão sumarizados a seguir. Todos os ensaios foram realizados com amostras fortificadas com as *N*-nitrosaminas com 100 ng g^{-1} e 100 ng g^{-1} de PI. As análises foram realizadas em duplicata.

Teste 1: massa da amostra $0,5 \pm 0,02 \text{ g}$ (Esmalte D), solvente extrator: solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v;

Teste 2: massa da amostra 0,3, 0,4 ou $0,5 \pm 0,02 \text{ g}$ (Esmalte D), solvente extrator: solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v;

Teste 3: massa da amostra $0,5 \text{ g} \pm 0,02$ (Esmalte D), solvente extrator: solução água:metanol:ácido fórmico 89:10:1 v/v/v ou solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v;

Teste 4: massa da amostra $0,5 \text{ g} \pm 0,02$ (Esmalte D), solvente extrator: solução água:metanol 95:5 v/v ou solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v;

Teste 5: massa da amostra $0,5 \text{ g} \pm 0,02$ (Esmalte D), solvente extrator: água ou solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v.

A seguir são apresentados os resultados.

Teste 1: Os resultados da eficiência de extração (recuperação, %) obtidos para cada *N*-nitrosamina estão apresentados na Figura 18. A curva analítica foi construída no solvente água e a faixa de concentração foi de 25 a 150 ng g^{-1} , com a adição de 100 ng g^{-1} do PI.

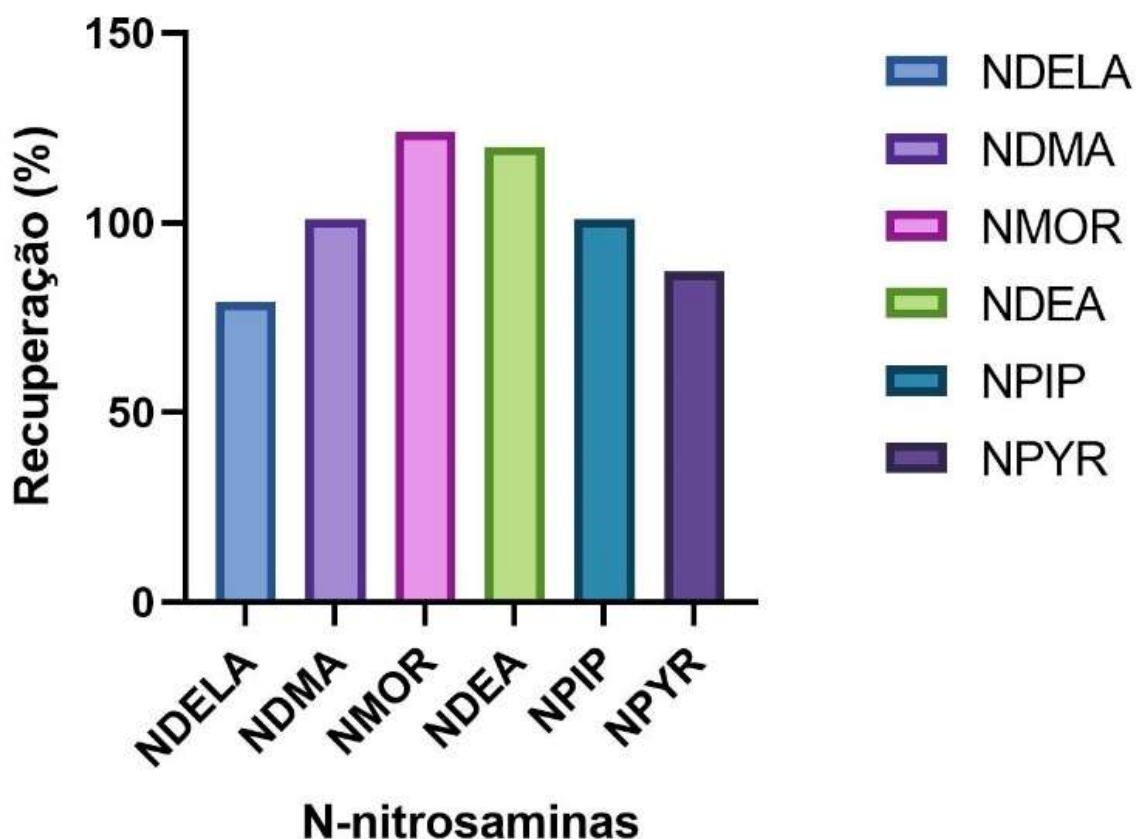


Figura 18: Recuperação (%) dos analitos nas amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g^{-1} de cada *N*-nitrosamina e 100 ng g^{-1} do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.

As *N*-nitrosaminas mais importantes de serem controladas em esmaltes de unhas são a NDELA, NDMA, NMOR e NDEA, uma vez que existem relatos da presença destas em esmaltes e foram, portanto, o foco principal neste trabalho. A NDELA apresentou recuperação de 79%, a NDMA 101%, NMOR 124% e NDEA 120%. As demais *N*-nitrosaminas apresentaram as seguintes recuperações: NPIP 101% e NPYR 87%. Não foi possível recuperar a NDPLA, NDPA e NMEA com as condições empregadas nestes testes. Em relação ao formato dos picos, a NDELA apresentou ruídos na linha de base na transição de quantificação e uma leve deformação do pico. As demais *N*-nitrosaminas apresentaram picos simétricos e adequados para a quantificação.

Esse primeiro ensaio foi adaptado da referência disponível na literatura (EUROPEAN NETWORK OF OFFICIAL COSMETICS CONTROL LABORATORIES - OCCLS, 2020). Alguns testes adicionais foram realizados na tentativa de melhorar a

recuperação e formato de pico da NDELA. Sendo assim, foram realizados mais quatro testes alterando a composição do solvente extrator ou massa de amostra.

Teste 2: realizado com o Esmalte D e diferentes quantidades de amostra: 0,3; 0,4 ou 0,5 g. Como solvente extrator foi empregada uma solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1v/v/v. Os resultados (recuperação, %) obtidos para cada *N*-nitrosamina estão apresentados na Figura 19.

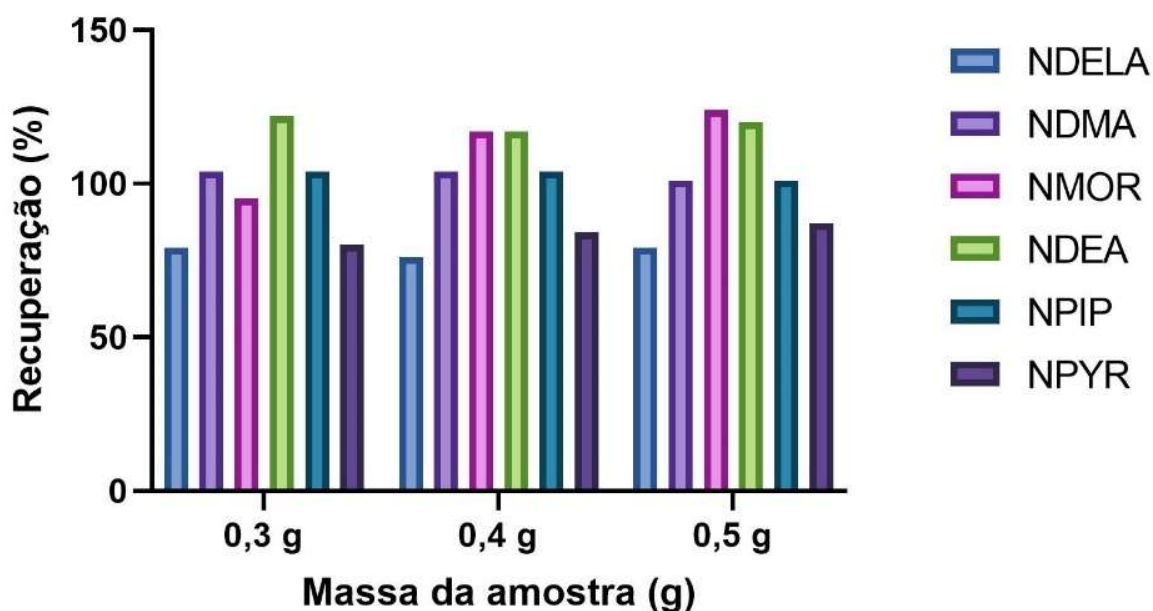


Figura 19: Recuperação (%) dos analitos em função da variação da massa das amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g⁻¹ de cada *N*-nitrosamina e 100 ng g⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.

Ao variar a massa da amostra 0,3; 0,4 e 0,5 ($\pm 0,02$) g, a NMOR apresentou as maiores variações de recuperação: 95, 117 e 124%, respectivamente. As recuperações para as demais *N*-nitrosaminas não variaram de forma significativa, o que indica que a massa da amostra neste intervalo não afeta a eficiência de extração dos analitos alvos.

As recuperações (%) obtidas foram as seguintes, variando a massa da amostra em 0,3; 0,4 e 0,5 ($\pm 0,02$) g, respectivamente: NDELA (79, 76 e 79%), NDMA (104, 104 e 101%), NDEA (122, 117 e 120%), NPIP (104, 104 e 101%) e NPYR (80, 84 e 87%). Os formatos dos picos não apresentaram variações significativas ao variar

a massa das amostras. Dessa forma, foi selecionada a massa de 0,5 ($\pm$ 0,02) g de amostra para permitir alcançar limites de quantificação menores.

Teste 3: realizado com o Esmalte D e como solvente extrator foi empregada uma solução água:metanol:ácido fórmico 89:10:1v/v/v ou uma solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1 v/v/v. Os resultados (recuperação, %) obtidos para cada *N*-nitrosamina estão apresentados na Figura 20.

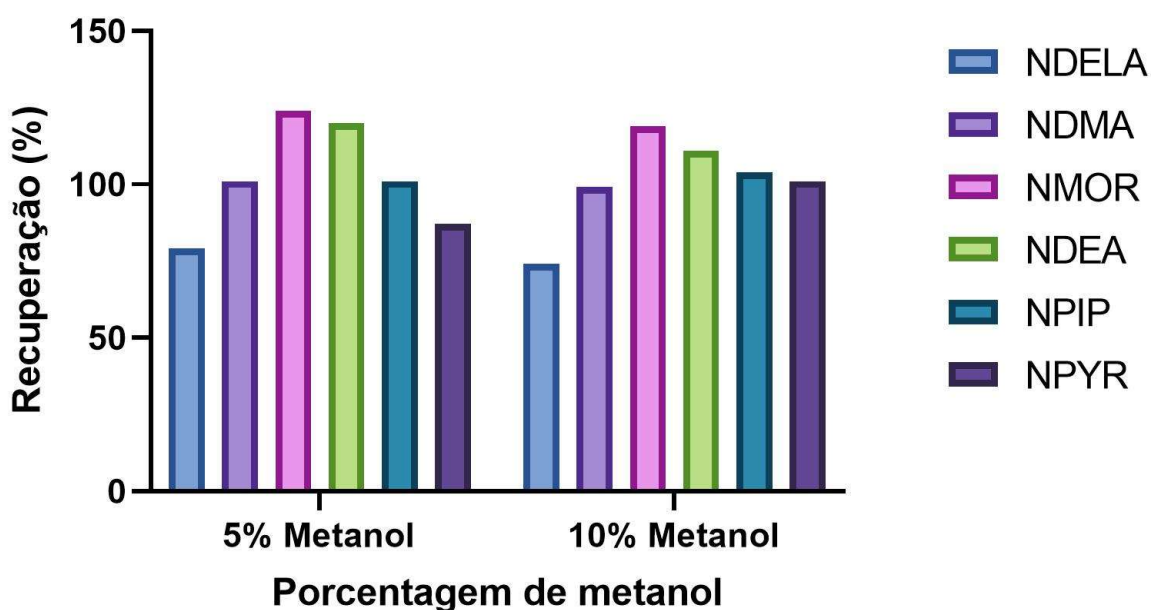


Figura 20: Recuperação (%) dos analitos em função da variação da porcentagem de metanol na solução extratora. Amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g⁻¹ de cada *N*-nitrosamina e 100 ng g⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.

A variação de 5 para 10% de metanol na solução extratora não causou variações consideráveis nas recuperações dos analitos. As recuperações obtidas foram: NDELA (79 e 74%), NDMA (101 e 99%), NMOR (124 e 119%), NDEA (120 e 111%), NPIP (101 e 104%) e NPYR (87 e 101%) ao usar 5 e 10% de metanol, respectivamente. Em relação aos formatos dos picos, a NDELA apresentou muitos ruídos na linha de base quando 10% de metanol foi utilizado na extração, o que pode ser decorrente da coextração de compostos da matriz com as mesmas transições *m/z* do analito. Portanto, dentre as duas situações avaliadas, o uso de 5% de metanol na solução extratora apresentou as melhores condições.

Teste 4: realizado com o Esmalte D e como solvente extrator foi empregada uma solução água:metanol 95:5 v/v ou solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1v/v/v. Os resultados (recuperação, %) obtidos para cada *N*-nitrosamina estão apresentados na Figura 21.

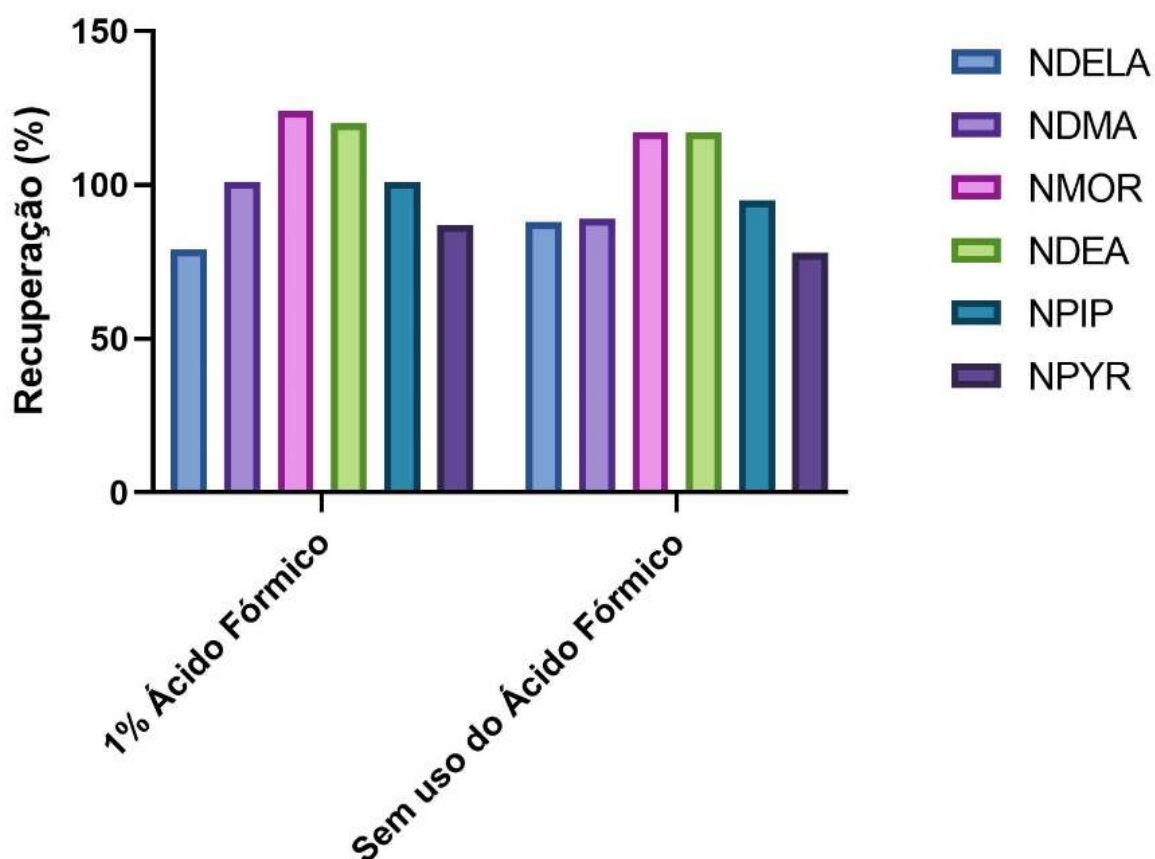


Figura 21: Recuperação (%) dos analitos em função do uso do ácido fórmico na solução extratora. Amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g⁻¹ de cada *N*-nitrosamina e 100 ng g⁻¹ do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.

A solução extratora sem o uso do ácido fórmico não afetou a recuperação dos analitos. Os resultados de recuperação com ou sem o uso do ácido fórmico foram os seguintes, respectivamente: NDELA (79 e 88%), NDMA (101 e 89%), NMOR (124 e 117%), NDEA (120 e 117%), NPIP (101 e 95%) e NPYR (87 e 78%). Em relação ao formato dos picos, a NDELA apresentou ruídos na linha de base ao utilizar o ácido fórmico na extração, portanto a extração sem ácido fórmico foi considerada a melhor condição para a NDELA.

Teste 5: realizado com o Esmalte D, massa da amostra $0,5 (\pm 0,02)$ g e o solvente extrator foi água ou uma solução água:metanol:ácido fórmico 94:5:1v/v/v. Os resultados (recuperação, %) obtidos para cada *N*-nitrosamina estão apresentados na Figura 22.

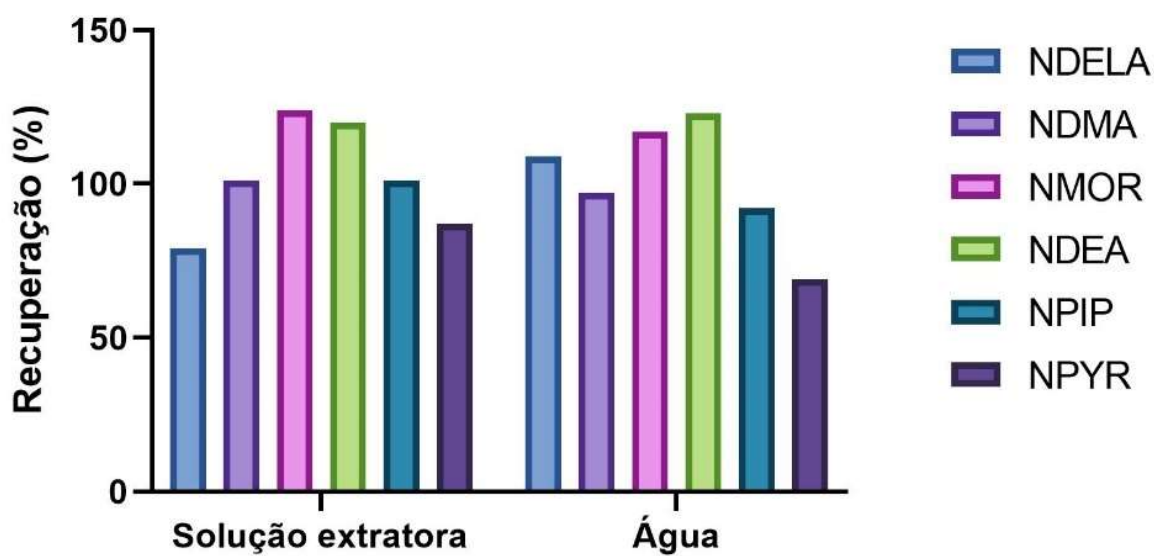


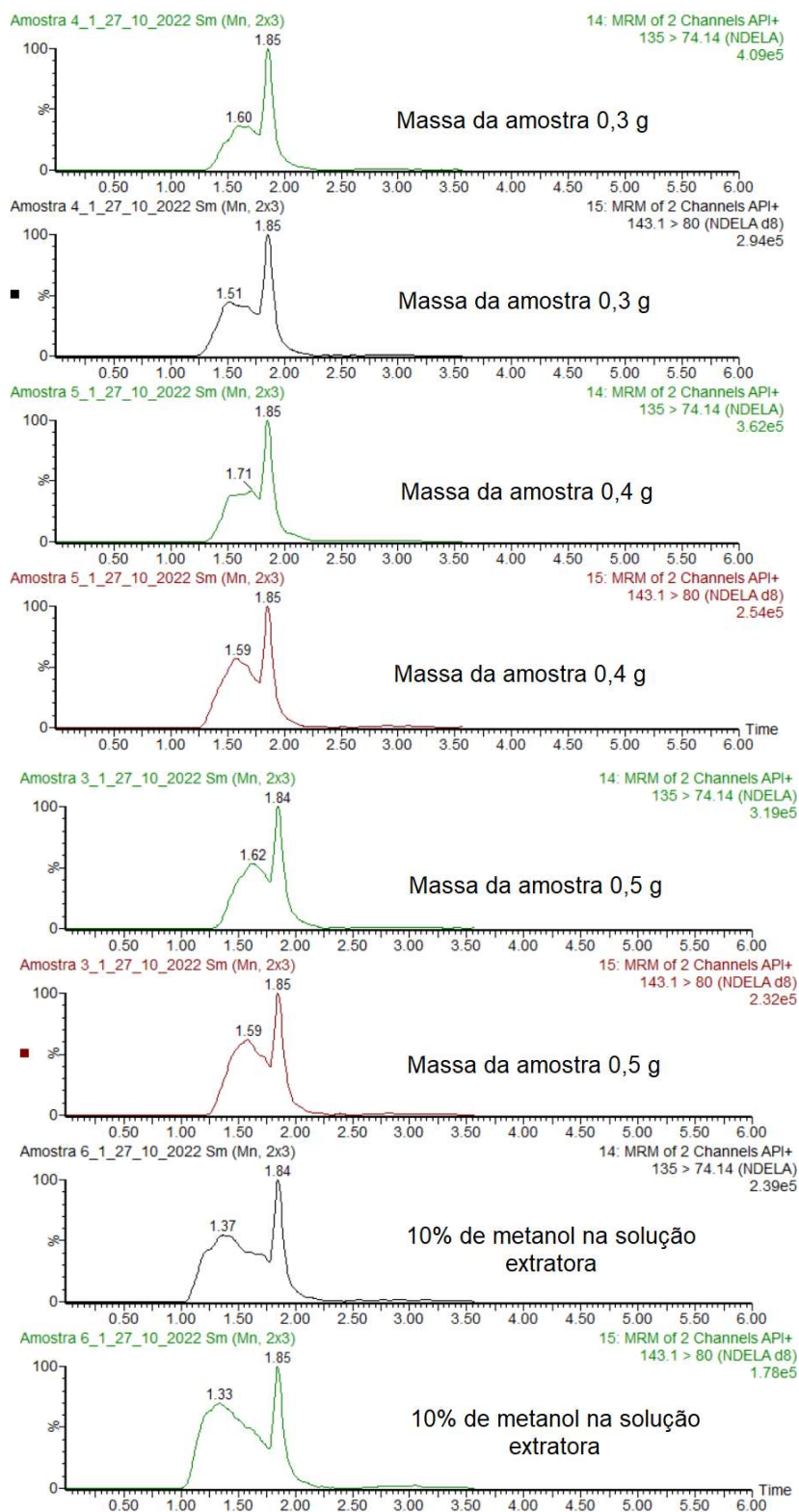
Figura 22: Recuperação (%) dos analitos em função do uso do solvente de extração. Amostras do Esmalte D fortificadas com 100 ng g^{-1} de cada *N*-nitrosamina e 100 ng g^{-1} do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito no item 3.7.

Os resultados de recuperação (%) utilizando a solução extratora ou água, respectivamente, foram os seguintes: NDELA (79 e 109%), NDMA (101 e 97%), NMOR (124 e 117%), NDEA (120 e 123%), NPIP (101 e 92%) e NPYR (87 e 69%).

Dentre as *N*-nitrosaminas avaliadas, a NDELA foi a única detectada no Esmalte D, na concentração estimada de 23 ng g^{-1} . A *N*-nitrosamina mais comumente encontrada em cosméticos é a NDELA e geralmente em maiores concentrações em relação as demais, portanto é a *N*-nitrosamina de maior interesse.

As extrações realizadas com a solução extratora variando metanol e ácido fórmico mantiveram a recuperação da NDELA em torno de 79 a 90%. A extração utilizando água (solvente mais polar) além de aumentar a recuperação da NDELA de 79 para 109%, promoveu melhora no formato do pico cromatográfico quando comparado com o uso da solução extratora contendo metanol. O uso de metanol e

ácido fórmico na solução extratora pode ter extraído além dos analitos, alguns interferentes presentes na matriz. Na Figura 23 estão apresentados os cromatogramas da NDELA referente aos testes.



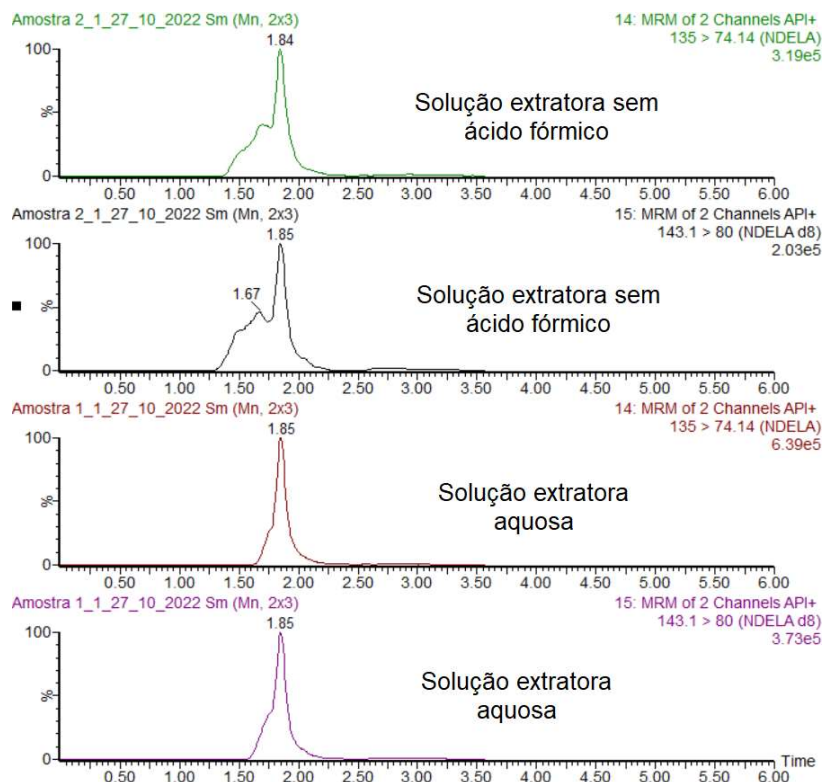


Figura 23: Cromatogramas de recuperação da NDELA e NDELA-d8 no Esmalte D em função da variação da composição da solução extratora.

Um preparo adicional da amostra utilizando a SPE também foi avaliado com o intuito de realizar um *clean-up* e, conseqüentemente, minimizar a coeluição de concomitantes nos tempos de retenção dos analitos, além de reduzir o LOQ.

4.3.2. Preparo de amostras de esmaltes de unhas usando extração com solvente seguido de SPE

Na literatura não foram encontradas referências do uso da SPE para o preparo de amostras de esmaltes de unhas. Dessa forma, o preparo das amostras foi baseado no preparo das amostras de água.

As amostras de esmaltes de unhas selecionados para avaliar esse preparo de amostras foram esmaltes comerciais: uma base com coloração (Esmalte B), escolhido por ter composição mais simples que os demais, porém, com coloração. Uma base incolor (Esmalte D), esmalte do pool no qual foram realizados os demais testes e um esmalte infantil a base de água com coloração (Esmalte F).

Uma alíquota do esmalte ($0,5 \pm 0,02$ g, com precisão de $\pm 0,0001$ g) foi fortificada com 20 ng g^{-1} das *N*-nitrosaminas e 20 ng g^{-1} do PI. Foi realizada uma extração líquido-líquido assistida por ultrassom (tempo de 10 min) utilizando como solvente extrator 25 mL de água:metanol 80:20 v/v. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4186 g durante 10 min. O sobrenadante foi percolado no cartucho de carvão SPE, conforme descrito no item 3.8.1.2. A curva analítica foi construída no solvente água. A faixa de concentração foi de $1,0$ a 20 ng mL^{-1} com 10 ng mL^{-1} do PI. Os resultados das recuperações para cada *N*-nitrosamina estão apresentados na Figura 24.

Pela análise da Figura 24 é possível verificar que a composição do esmalte afeta a recuperação dos analitos. Os valores de recuperação (%) para cada analito estão apresentados na Tabela 14.

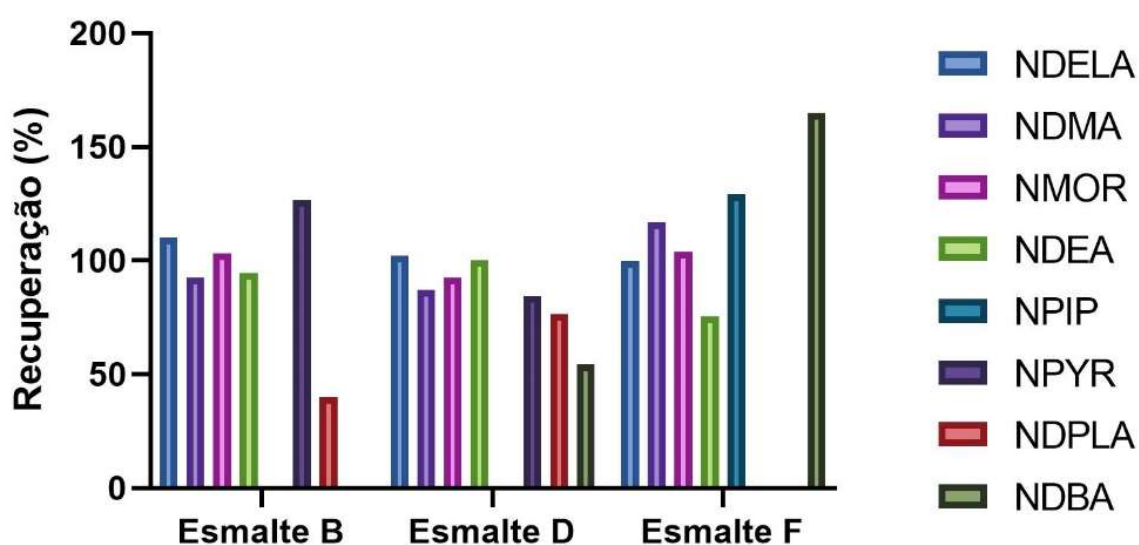


Figura 24: Recuperação (%) dos analitos em diferentes esmaltes de unhas. Amostras dos esmaltes B, D e F fortificadas com 20 ng g^{-1} das *N*-nitrosaminas e 20 ng g^{-1} do PI. Condições do LC-UHPLC-MS/MS conforme descrito em 3.7.

Tabela 14: Valores de recuperação (%) das *N*-nitrosaminas para os Esmaltes B, D e F

	Recuperação (%)							
	NDELA	NDMA	NMOR	NDEA	NPIP	NPYR	NDPLA	NDBA
Esmalte B	110,0	92,4	103,2	94,4	*	126,5	40,2	nd
Esmalte D	102,0	87,2	92,3	100,3	*	84,6	76,5	54,4
Esmalte F	99,8	116,7	103,7	75,5	129,2	*	*	165,1

*Não foi possível recuperar o analito na concentração adicionada. nd = não detectada.

O ensaio realizado com três diferentes esmaltes teve o intuito de avaliar o comportamento das diferentes matrizes diante do preparo de amostras utilizando a SPE. Dentre as *N*-nitrosaminas de interesse, as recuperações ficaram dentro do esperado, próximo de 100%, com exceção da NDEA no Esmalte F que teve uma recuperação de 75,5%. Em relação aos demais analitos, só foi possível recuperar a NPIP no Esmalte F, no entanto a recuperação de 129,2% indica que possivelmente um concomitante da matriz possa ter levado a um incremento da ionização da molécula na fonte de ionização. O mesmo foi observado para a NPYR no Esmalte B, em que a recuperação foi de 126,5%. Já no Esmalte F não foi possível recuperar esse analito. Menos da metade da concentração adicionada de NDPLA foi recuperada no Esmalte B (40,2%) e, no Esmalte F, não foi possível recuperar esse analito. A recuperação de NDBA foi de 54,4% no Esmalte D, 165,1% no Esmalte F e no esmalte B não foi recuperada. Esses resultados indicam que a composição do esmalte afeta na quantificação e cabe ressaltar que não se tem o padrão deuterado dessa *N*-nitrosamina que prejudica a quantificação, mesmo usando duas transições para confirmação de identidade. Não foi possível recuperar a NMEA em nenhuma das três amostras de esmaltes de unhas analisadas. Essa *N*-nitrosamina também foi quantificada por um PI de estrutura diferente o que compromete a quantificação. Não foi detectada a presença de qualquer uma das *N*-nitrosaminas em estudo nos esmaltes B e F. No entanto, foi detectada a presença da NDELA no Esmalte D na concentração de 23 ng g⁻¹. Os resultados indicam que o método desenvolvido apenas é confiável para a determinação de NDELA, NDMA, NDEA e NMOR em esmaltes de unhas e, portanto, foi validado para esses analitos.

4.3.3. Validação do método - esmalte de unhas usando a extração por solvente seguida de SPE e quantificação por LC-UHPLC-MS/MS

A validação do método LC-UHPLC-MS/MS para a determinação de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA em esmaltes de unhas compreendeu na avaliação dos seguintes parâmetros de validação: faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra- e inter-dia e exatidão. Devido à ausência de uma matriz branco de esmalte de unhas que fosse representativa, foi necessário escolher um esmalte para realizar os ensaios. Para tanto, foi selecionado o Esmalte D por esse possuir menor quantidade de matérias primas em sua composição. Na validação cada *N*-nitrosaminas alvo foi quantificada usando seu padrão isotopicamente marcado (*surrogate*) e a curva analítica no solvente água (sem o preparo de amostra usando o cartucho SPE).

4.3.3.1. Faixa linear e linearidade

Para avaliar a linearidade e faixa linear da curva analítica para a quantificação, o esmalte foi substituído por água. As curvas analíticas foram construídas em cinco níveis de concentração: 20,0 – 30,0 – 40,0 – 50,0 – 80,0 ng g⁻¹, utilizando 40,0 ng g⁻¹ do PI para avaliação da linearidade. As curvas analíticas foram construídas plotando as razões das áreas dos picos nas *N*-nitrosaminas e das *N*-nitrosaminas deuteradas em função da concentração do analito (ng mL⁻¹). As Figuras 25 e 26 ilustram os respectivos gráficos da curva no solvente e gráficos de resíduos para a NDELA, NMOR, NDMA, NDEA.

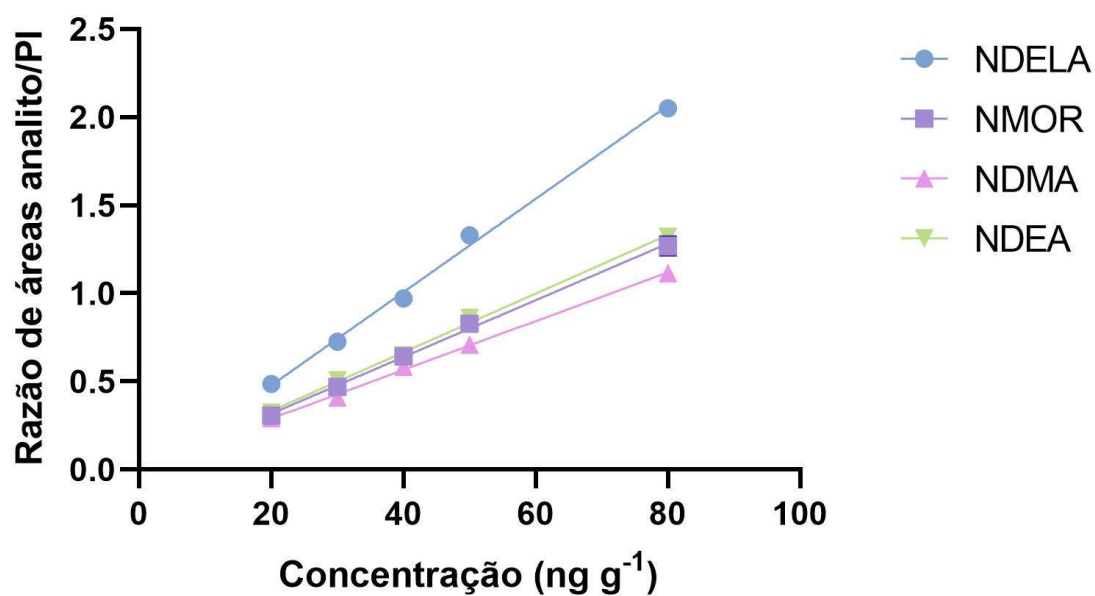


Figura 25: Curvas analíticas para as *N*-nitrosaminas (20 – 80 ng g⁻¹) com adição do PI na concentração de 40 ng g⁻¹.

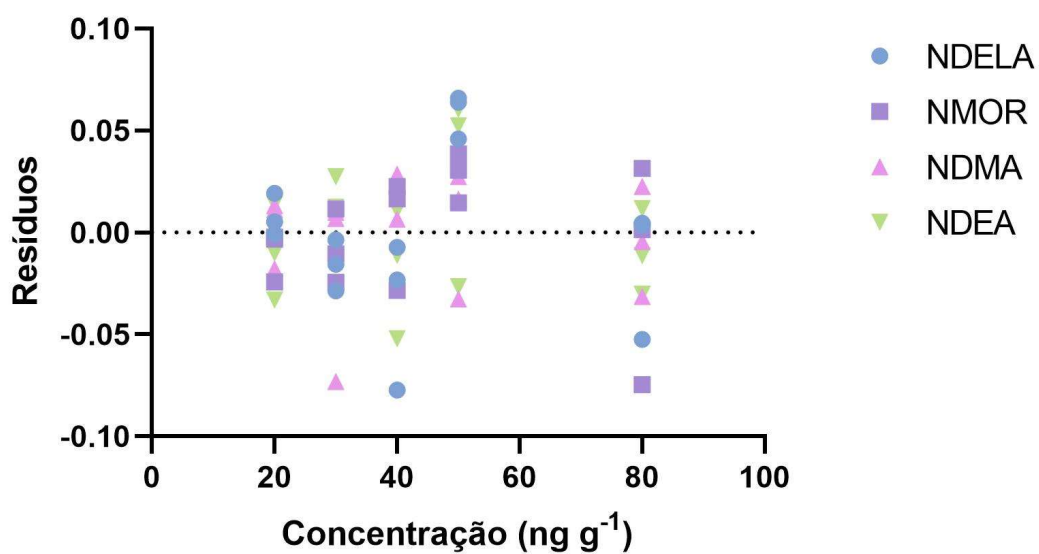


Figura 26: Gráfico de resíduos das curvas analíticas para as *N*-nitrosaminas (20 - 80 ng g⁻¹) com adição do PI na concentração de 40 ng g⁻¹.

Os parâmetros estatísticos das curvas analíticas estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Parâmetros estatísticos das curvas analíticas

Parâmetro	NDELA	NDMA	NDEA	NMOR
m	0,0530	0,0277	0,0333	0,0322
b	-0,0571	0,0132	- 1,887x10 ⁻⁵	0,0048
r	0,9976	0,9956	0,9961	0,9963
S_{y/x}	0,0405	0,0289	0,0325	0,0367

m: coeficiente angular; b: coeficiente linear; r: coeficiente de regressão linear; s_{y/x}: erro padrão da curva.

4.3.3.2. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada uma das *N*-nitrosaminas foram estimados a partir da razão sinal/ruído 3:1 e 10:1, respectivamente e estão apresentados na Tabela 16.

O LOD estimado para o Esmalte D foi de 7 ng g⁻¹, no entanto, esse valor precisa ser avaliado para cada amostra devido a influência da matriz. Na Figura 27 estão apresentados os cromatogramas da NDELA, NMOR, NDMA, NDEA e seus respectivos PI na concentração do LOQ (20 ng g⁻¹) para o esmalte D. O LOQ de 20 ng g⁻¹ foi adotado como adequado para o método, mesmo tendo uma razão sinal-ruído maior do que 10 para todos os analitos. O pico cromatográfico da NDEA foi circulado para evidenciá-lo dos concomitantes que foram coeluídos da matriz do esmalte de unhas.

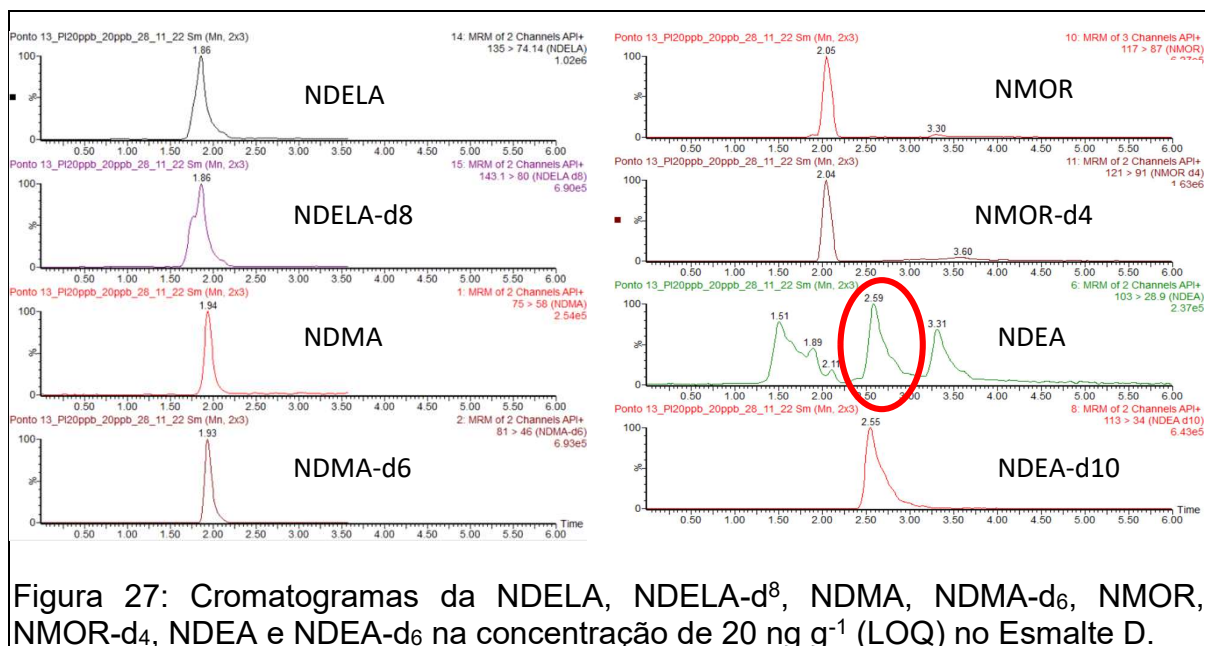


Figura 27: Cromatogramas da NDELA, NDELA-d⁸, NDMA, NDMA-d₆, NMOR, NMOR-d₄, NDEA e NDEA-d₆ na concentração de 20 ng g⁻¹ (LOQ) no Esmalte D.

4.3.3.3. Precisão

A precisão intra-dia foi avaliada para dois níveis de concentração 20 ng g⁻¹ e 40 ng g⁻¹ para cada uma das *N*-nitrosaminas através da fortificação do Esmalte D com NDELA, NDMA, NMOR e NDEA. As amostras foram preparadas em cinco replicatas (n=5) independentes no mesmo dia, pelo mesmo analista e analisadas no mesmo equipamento. A precisão inter-dia foi realizada da mesma forma, porém, em um segundo dia não consecutivo e em três replicatas (n=8).

A equação de *Horwitz* foi utilizada para determinar o coeficiente de variação (CV) interlaboratorial. Para as concentrações de 20 ng g⁻¹ e 40 ng g⁻¹, a equação de *Horwitz* preconiza CV de 28,8 e 26,0%, respectivamente. No entanto, esses valores são determinados para ensaios realizados em diferentes laboratórios. Devido ao fato dessas análises terem sido realizadas em um mesmo laboratório, 2/3 do valor calculado pela equação de *Horwitz* foi estabelecido como critério de aceitação. Esse valor representa CV de 19,2% para a concentração de 20 ng g⁻¹ e 17,3% para a concentração de 40 ng g⁻¹, sendo considerados adequados ao objetivo do presente trabalho. Os resultados dos coeficientes de variação ficaram dentro do valor preconizado pela equação de *Horwitz*, indicando que o método possui repetitividade apropriada para os objetivos a que se propõe. Os resultados estão expressos como as estimativas dos desvios padrão relativo (RSD) e estão apresentados na Tabela 16.

4.3.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação de dois níveis de concentração das *N*-nitrosaminas (20 ng g⁻¹ e 40 ng g⁻¹) adicionadas no Esmalte D. As amostras foram preparadas em cinco replicatas independentes.

Os resultados estão expressos em porcentagem de recuperação na Tabela 16. A exatidão ficou em uma faixa de 87,3 a 137,5% para as *N*-nitrosaminas avaliadas. Considerando a complexidade da matriz e os níveis de concentração, pode-se afirmar que os valores são aceitáveis.

Tabela 16: Parâmetros de validação do método de determinação de *N*-nitrosaminas em esmaltes de unhas.

Parâmetro	NDELA	NDMA	NDEA	NMOR
Faixa linear (ng g ⁻¹)	20,0-80,0	20,0-80,0	20,0-80,0	20,0-80,0
Linearidade (r)	0,9999	0,9958	0,9987	0,9977
Precisão intra-dia (%)				
20 ng g ⁻¹	10,3	5,2	7,4	4,7
40 ng g ⁻¹	5,5	1,5	4,6	3,7
Precisão inter-dia (%)				
20 ng g ⁻¹	10,6	7,2	6,9	4,1
40 ng g ⁻¹	5,1	3,8	10,3	2,9
Exatidão (%)				
20 ng g ⁻¹	90,2	137,5	119,4	110,5
40 ng g ⁻¹	87,3	118,7	110,5	107,1
LOQ (ng g ⁻¹)	20	20	20	20
LOD (ng g ⁻¹)	7	7	7	7

Após análise dos resultados, o método desenvolvido foi considerado adequado para a determinação de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA no Esmalte D.

5. Análises das amostras de esmaltes de unhas

O método validado para o Esmalte D (descrito no item 3.9.3.) foi usado para a análise de mais cinco amostras de esmaltes de unhas. Devido ao possível efeito matriz, foi avaliada a exatidão mediante fortificação das amostras e um nível de concentração (40 ng g⁻¹) e calculada a recuperação. As amostras foram preparadas em quatro replicatas, sendo duas fortificadas com 40 ng g⁻¹ de *N*-nitrosaminas para avaliar a recuperação. A padronização interna (usando *surrogate*) foi utilizada para a quantificação dos analitos.

Alguns critérios foram adotados para realizar a quantificação das *N*-nitrosaminas nas amostras. Além da necessidade do padrão interno deuterado também foi utilizado um íon de confirmação de identidade para cada analito. Um resultado é considerado positivo quando o formato dos picos do íon de quantificação, íon de confirmação de identidade e íon de quantificação do padrão deuterado possuem o mesmo perfil cromatográfico, mesmo tempo de retenção e a razão de áreas do íon de quantificação/ íon de confirmação de identidade deverá ser constante entre o nível de concentração no solvente e nas amostras. Os cromatogramas das amostras estão apresentados no Anexo III.

Os resultados das análises dos esmaltes foram expressos como o valor médio $\pm$ incerteza expandida (U). A incerteza expandida foi calculada conforme Equações 3, 4 e 5 descritas no item 3.8.3.3. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Concentração média ($n=2$) de *N*-nitrosaminas em $\text{ng g}^{-1} \pm$ incerteza expandida (U) com um fator de abrangência ($k=2$) e um nível de confiança de 95%.

Amostra	Concentração média $\pm$ U (ng g^{-1})			
	NDELA	NDMA	NMOR	NDEA
Esmalte A	77 ± 14	102 ± 8	<LOQ	nd
Esmalte C	29 ± 15	26 ± 8	<LOQ	nd
Esmalte E	<LOD	95 ± 8	nd	nd
Esmalte H	<LOD	17 ± 8	nd	nd
Esmalte G	<LOD	<LOQ	nd	nd

LOD: limite de detecção (7 ng g^{-1}). LOQ: limite de quantificação (20 ng g^{-1}). nd: não detectado.

O Esmalte A apresentou maiores concentrações de *N*-nitrosaminas: 77 ng g^{-1} de NDELA e 102 ng g^{-1} de NDMA. A NMOR foi detectada, mas em uma concentração menor do que o LOQ. No Esmalte C também foram determinadas essas duas *N*-nitrosaminas, porém, em concentrações mais baixas para NDELA (29 ng g^{-1}) e NDMA (26 ng g^{-1}). A NMOR foi detectada nesta amostra, mas em concentrações menores do que o LOQ. No Esmalte E foi verificada a presença de NDMA em concentração de 95 ng g^{-1} . Em relação aos esmaltes produzidos em laboratório, no Esmalte H foi determinada a presença da NDMA na concentração de 17 ng g^{-1} e concentração menor que o LOQ ($< 20 \text{ ng g}^{-1}$) no Esmalte G. A NDEA não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas.

Os parâmetros de LOD e LOQ adotados foram os estimados para o Esmalte D.

Considerando o possível efeito matriz e para avaliar a exatidão dos resultados reportados, todas as amostras foram fortificadas com as quatro *N*-nitrosaminas na concentração de 40 ng g⁻¹. As amostras foram analisadas e a recuperação calculada. Os resultados expressos em porcentagem de recuperação estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Recuperação média (n=2) das *N*-nitrosaminas adicionadas às amostras.

Amostra	Recuperação (%)			
	NDELA	NDMA	NMOR	NDEA
Esmalte A	96	131	103	112
Esmalte C	86	111	107	105
Esmalte E	96	103	117	99
Esmalte H	97	107	115	105
Esmalte G	96	99	119	103

A recuperação variou de 86 a 97% para a NDELA, 99 a 131% para a NDMA, 103 a 119% para a NMOR e 99 a 112% para a NDEA e foi considerado adequado ao objetivo que se propõe o método e, portanto, o método se aplica para a determinação de NDELA, NDMA, NDEA e NMOR nestes esmaltes.

Capítulo 5

CONCLUSÃO

A técnica de cromatografia bidimensional acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-UHPLC-MS/MS) é adequada e vantajosa para a determinação de *N*-nitrosaminas em água e esmaltes de unhas. Na primeira dimensão cromatográfica é possível selecionar a fração de interesse com os analitos e um *clean-up* do extrato/amostra e na segunda dimensão é possível realizar a separação dos analitos, embora não seja necessário uma separação completa uma vez que está se realizando a quantificação pelo MS/MS no modo de reações selecionadas.

Na análise de amostras de água foi verificado que apenas fazendo uma filtração das amostras e adição dos padrões internos deuterados é possível alcançar limites de quantificação de 0,10 a 5,0 ng mL⁻¹, dependendo da *N*-nitrosamina. Os menores LOQ foram obtidos para a NDELA e NMOR. No caso da necessidade da determinação de concentrações menores se faz necessário uma etapa adicional de concentração, o que pode ser conseguida usando a extração em fase sólida em cartuchos de carvão de casca de coco. Percolando 100 mL da amostra os LOQ ficaram na faixa de 0,10 a 1,0 ng mL⁻¹. Se concentrações menores ainda necessitam ser determinadas, pode-se aumentar o volume da amostra e com isso o LOQ pode ser reduzido. Cabe destacar que o uso adicional da extração em fase sólida aumenta o tempo e custo por análise. Além disso requer uma etapa adicional de remoção do solvente de eluição (diclorometano/acetona) que é uma etapa crítica do processo tanto pelo tempo como perda dos analitos.

Embora existam métodos publicados para a determinação de *N*-nitrosaminas em água usando a SPE em cartuchos de carvão, esses não visam a determinação de NDELA.

Cabe destacar que o método desenvolvido (SPE + LC-UHPLC-MS/MS) para água e esmaltes requer o uso de padrões internos deuterados das próprias moléculas (*surrogates*). Padrões internos deuterados de estruturas diferentes do analito não corrigem de forma apropriada as perdas ocorridas durante o preparo de amostras, em especial na etapa de concentração (remoção do solvente).

A padronização interna da NMEA e NDBA foi realizada com o uso da NMOR-d₄. Nas amostras de água foi possível quantificar esses analitos, no entanto, ao mudar a matriz para esmaltes de unhas a quantificação foi prejudicada devido aos interferentes da matriz. As transições *m/z* das *N*-nitrosaminas são muito próximas e

as m/z dos fragmentos são baixas, podendo levar a interpretação de resultados errôneos. Na interpretação dos resultados devem ser levados em consideração os seguintes parâmetros: os íons de quantificação, confirmação de identidade e íon de quantificação do padrão interno devem apresentar mesmo tempo de retenção, assim como, mesmos formatos de picos. Os íons de quantificação e confirmação de identidade devem apresentar a mesma intensidade de sinal e a razão entre esses dois íons deve ser constante.

Em relação aos esmaltes de unhas, o preparo sem a SPE *off-line* mostrou-se eficiente para as quatro *N*-nitrosaminas de interesse (NDELA, NMOR, NDMA e NDEA) e para a NPIP e NPYR no esmalte analisado (Esmalte D). Com esse preparo de amostra, foi possível detectar esses analitos em concentrações de 100 ng g^{-1} no esmalte em questão. O preparo de amostra sem a SPE é muito mais rápido, envolve menor gasto de consumíveis e solventes. No entanto, esse procedimento encontrado na literatura se mostra eficaz para realizar uma análise preliminar das amostras, pois os solventes polares utilizados na extração possuem afinidade com concomitantes da matriz e como consequência são coextraídos com os analitos, afetando a separação e a quantificação das *N*-nitrosaminas. Cabe destacar, que não é possível se delinear um preparo único para a análise de amostras de esmaltes, pois a escolha do procedimento de preparo de amostras vai depender da complexidade e composição da matriz.

O preparo de amostras com a SPE *off-line* mostrou-se a melhor opção para a análise de esmaltes de unhas, embora seja um procedimento mais demorado, foram observadas melhoras em relação a eliminação de concomitantes que afetam a simetria dos picos cromatográficos devido ao *clean-up* realizado com os cartuchos de carvão. A validação do método desenvolvido mostrou a possibilidade de quantificar a NDELA, NDMA, NMOR e NDEA em concentração de até 20 ng g^{-1} . Na legislação Brasileira não há regulamentação específica para o teor máximo permitido de *N*-nitrosaminas em cosméticos. A especificação é de $50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (ng g^{-1}) de *N*-nitrosaminas por matérias primas específicas, podendo levar a concentrações maiores no produto acabado. Dessa forma o método desenvolvido atende a especificação da ANVISA.

É necessário pontuar que a matriz dos esmaltes é muito complexa e além do mais, a composição dos esmaltes de unhas possui variações entre os diversos

tipos de esmaltes e entre os diversos fabricantes, tornando o processo de preparo de amostra um desafio devido a essas variações encontradas. Em resumo, cada esmalte apresentou um comportamento único diante dos preparos de amostra apresentados.

Dentre as amostras de esmaltes analisadas foram determinadas NDELA, NMOR e NDMA, essa última encontrada na concentração de 100 ng g^{-1} no Esmalte A. A NDEA não foi detectada em nenhuma amostra. A presença desses contaminantes evidenciam a necessidade não somente do monitoramento como também o estabelecimento através de agências regulatórias de um limite máximo de *N*-nitrosaminas em produtos cosméticos acabados.

Capítulo 6

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

ABEDI, G.; TALEBPOUR, Z. Modified QuEChERS as a novel sample preparation method for analysis of: N -nitrosodiethanolamine in shampoo by high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 9, n. 35, p. 5165–5173, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 3, de 18 de janeiro de 2012. **RDC Nº 3 de 18 de janeiro de 2012**, p. 2–13, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada. **RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015**, p. 1–10, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada. **RDC nº 83, de 17 de junho de 2016**, p. 1–15, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada. **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**, p. 1–13, 2017.

AGLIO, T. DE C. *et al.* N-nitrosaminas em medicamentos: um problema atual, uma realidade antiga. **Química Nova**, v. 45, n. 8, p. 959–976, 2022.

BARNES, J. M.; MAGEE, P. N. Some Toxic Properties of Dimethylnitrosamine. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 11, p. 167–174, 1954.

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

BARTSCH, H.; OHSHIMA, H.; PIGNATELLI, B. Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. **Mutation Research**, v. 202, p. 307–324, 1988.

BIAN, Y. *et al.* Progress in the pretreatment and analysis of N-nitrosamines: an update since 2010. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 21, p. 3626–3660, 2021.

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

CHISVERT, A. *et al.* Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. **Talanta**, v. 166, p. 81–86, 2017.

CHOI, N. R. *et al.* Identification and quantification of seven volatile n-nitrosamines in cosmetics using gas chromatography/chemical ionization-mass spectrometry coupled with head space-solid phase microextraction. **Talanta**, v. 148, p. 69–74, 2016.

CHOU, H. J. Determination of diethanolamine and N-nitrosodiethanolamine in fatty acid diethanolamides. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 5, p. 943–947, 1998.

CONSDEN, R.; GORDON, A. H.; MARTIN, A. J. P. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. **Biochemical Journal**, v. 38, n. 3, p. 224–232, 1944.

CROSBY, N. T.; SAWYER, R. N-Nitrosamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. **Advances in Food Research**, v. 22, n. C, p. 1–71, 1976.

DAVARANI, S. S. H. *et al.* Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by headspace solid phase microextraction using a novel aluminum hydroxide grafted fused silica fiber followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 105, p. 347–353, 2013.

DONG, H. *et al.* A salting out-acetonitrile homogeneous extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of thirteen N-nitrosamines in skin care cosmetics. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 82–88, 2015.

DOUGLASS, M. L. *et al.* The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 29, p. 581–606, 1978.

DRUCKREY, H. *et al.* Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. **Zeitschrift für Krebsforschung**, v. 69, p. 103–201, 1967.

ERNI, F.; FREL, R. W. Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. **Journal of Chromatography**, v. 149, p. 561–569, 1978.

EUROPEAN NETWORK OF OFFICIAL COSMETICS CONTROL LABORATORIES - OCCLS. Determination of polar N-nitrosamines in cosmetic products using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare**, p. 1–16, 2020.

FAN, T. Y. *et al.* N-nitrosodiethanolamine in cosmetics, lotions and shampoos. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, p. 423–430, 1977.

FRANZ, T. J. *et al.* Percutaneous Penetration of N-nitrosodiethanolamine through Human Skin (in Vitro): Comparison of Finite and Infinite Dose Applications from Cosmetic Vehicles. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 21, p. 213–221, 1993.

HAURI, U. Nail varnishes, colourants, preservatives, nitrosamines, formaldehyde, phenol, ethyl pyrrolidone, hydroquinones and phthalates. **Department of Health of the Canton of Basel-Stadt**, p. 1–7, 2016.

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

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. v. 3

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, n. 6, p. 1344–1354, 1980.

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Q. E T. **Guia para a expressão da incerteza de medição**. Rio de Janeiro: ABNT: INMETRO, 2012. v. 4ª Edição Brasileira

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-nitroso compounds. **World Health Organization**, v. 17, p. 15–35, 1978.

JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Cromatografia Líquida Bidimensional. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 73–82, 2009.

JOO, K. M. *et al.* Determination of N-nitrosodiethanolamine, NDELA in cosmetic ingredients and products by mixed mode solid phase extraction and UPLC-tandem mass spectrometry with porous graphitic carbon column through systemic sample pre-cleanup procedure. **Talanta**, v. 137, p. 109–119, 2015.

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

LIM, D. S. *et al.* Risk assessment of N-nitrosodiethylamine (NDEA) and N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 81, n. 12, p. 465–480, 2018.

LIU, F. *et al.* Determination of eleven volatile: N -nitrosamines in skin care cosmetics using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive clean-up sorbent and ultrahigh-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 21, p. 4245–4253, 2016.

MA, Q. *et al.* Determination of ten volatile nitrosamines in cosmetics by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1201–1207, 2011.

MAGEE, P. N.; BARNES, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **British Journal of Cancer**, v. X, n. 1, p. 114–122, 1956.

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

MATYSKA, M. T.; PESEK, J. J.; YANG, L. Screening method for determining the presence of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics by open-tubular capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 887, p. 497–503, 2000.

MIRALLES, P. *et al.* Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-metal organic framework composite: Determination of N-nitrosamines in cosmetic products. **Journal of Chromatography A**, v. 1604, 2019.

MIRALLES, P.; CHISVERT, A.; SALVADOR, A. Determination of N-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography with mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 15, p. 3143–3151, 2018.

MIRVISH, S. S. Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 325–351, 1975.

MOGOLLÓN, N. G. S. *et al.* O estado da arte da cromatografia líquida bidimensional: Conceitos fundamentais, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1680–1691, 2014.

MUNCH, J. W.; BASSETT, M. V. Method 521: Determination of nitrosamines in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography with large volume injection and chemical ionization tandem mass spectrometry (MS/MS). **Environmental Protection Agency**, v. 1, p. 1–47, 2004.

NASCIMENTO, H. D. L. **Desenvolvimento de método para determinação de nitrosaminas em águas de interesse à saúde pública**. Tese de Doutorado—São Paulo: Universidade de São Paulo, 5 dez. 2003.

NITRO QUÍMICA. Manual Técnico da Nitrocelulose. p. 1–55, 2012.

PIROK, B. W. J.; STOLL, D. R.; SCHOENMAKERS, P. J. Recent developments in two-dimensional liquid chromatography: Fundamental improvements for practical applications. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 240–263, 2019.

PREUSSMANN, R. *et al.* Carcinogenicity of N-nitrosodiethanolamine in rats at five different dose levels. **Cancer Research**, v. 42, p. 5167–5171, 1982.

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

QIU, Y. *et al.* Quantitative analysis of source and fate of N-nitrosamines and their precursors in an urban water system in East China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 415, 2021.

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

REIGER, M. M. **Harry's Cosmeticology**. Eighth Edition ed. New York: Chemical Publishing Co, 2000. v. 2

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIPOLLÉS, C. *et al.* Determination of eight nitrosamines in water at the ngL-1 levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 1, p. 62–71, 2011.

ROSENBERG, I. E. *et al.* Analysis of nitrosamines in cosmetic raw materials and finished product by high pressure liquid chromatography. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 31, n. 5, p. 237–252, 1980.

SANTOS, A. T. F. **Determinação de N-nitrosodietanolamina em shampoo por extração em fase sólida on-line à cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (SPE-UHPLC-MS/MS)**. Dissertação de mestrado —Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2018.

SCANLAN, R. A. N-nitrosamines in foods. **C R C Critical Reviews in Food Technology**, v. 5, n. 4, p. 357–402, 1975.

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

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Esmalterias: oportunidade diferenciada para empreender**. Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/esmalterias-um-negocio-em-franca-expansao-no-brasil,1fe8d62b2b886410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>. Acesso em: 11 maio. 2022.

SILVA, R. DE O. **Estudo comparativo das fontes de ionização ESI e APCI em sistema LC-MS/MS para validação de método multirresíduo de agrotóxicos em hortaliças**. Tese de doutorado—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2020.

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

SUPELCO. Solid phase extraction products. 2004.

TADA, A.; RODRIGUES-SILVA, C.; RATH, S. On-line solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of N-nitrosodiethanolamine in baby shampoo. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 202, 2021.

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

TETZNER, N. F. *et al.* On-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1452, n. 2016, p. 89–97, 2016.

TRICKER, A. R.; PREUSSMANN, R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3–4, p. 277–289, 1991.

VIZIOLI, B. D. C.; HANTAO, L. W.; MONTAGNER, C. C. Drinking water nitrosamines in a large metropolitan region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 25, p. 32823–32830, 2021.

WANG, C. *et al.* Detecting N-nitrosamines in water treatment plants and distribution systems in China using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Frontiers of Environmental Science and Engineering in China**, v. 6, n. 6, p. 770–777, 2012.

WANG, W. *et al.* Occurrence of nine nitrosamines and secondary amines in source water and drinking water: Potential of secondary amines as nitrosamine precursors. **Water Research**, v. 45, n. 16, p. 4930–4938, 2011.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Harry's Cosmeticology**. Seventh Edition ed. New York: Chemical Publishing Co, 1982. v. 2

YURCHENKO, S.; MÖLDER, U. Volatile N-nitrosamines in various fish products. **Food Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 325–333, 2006.

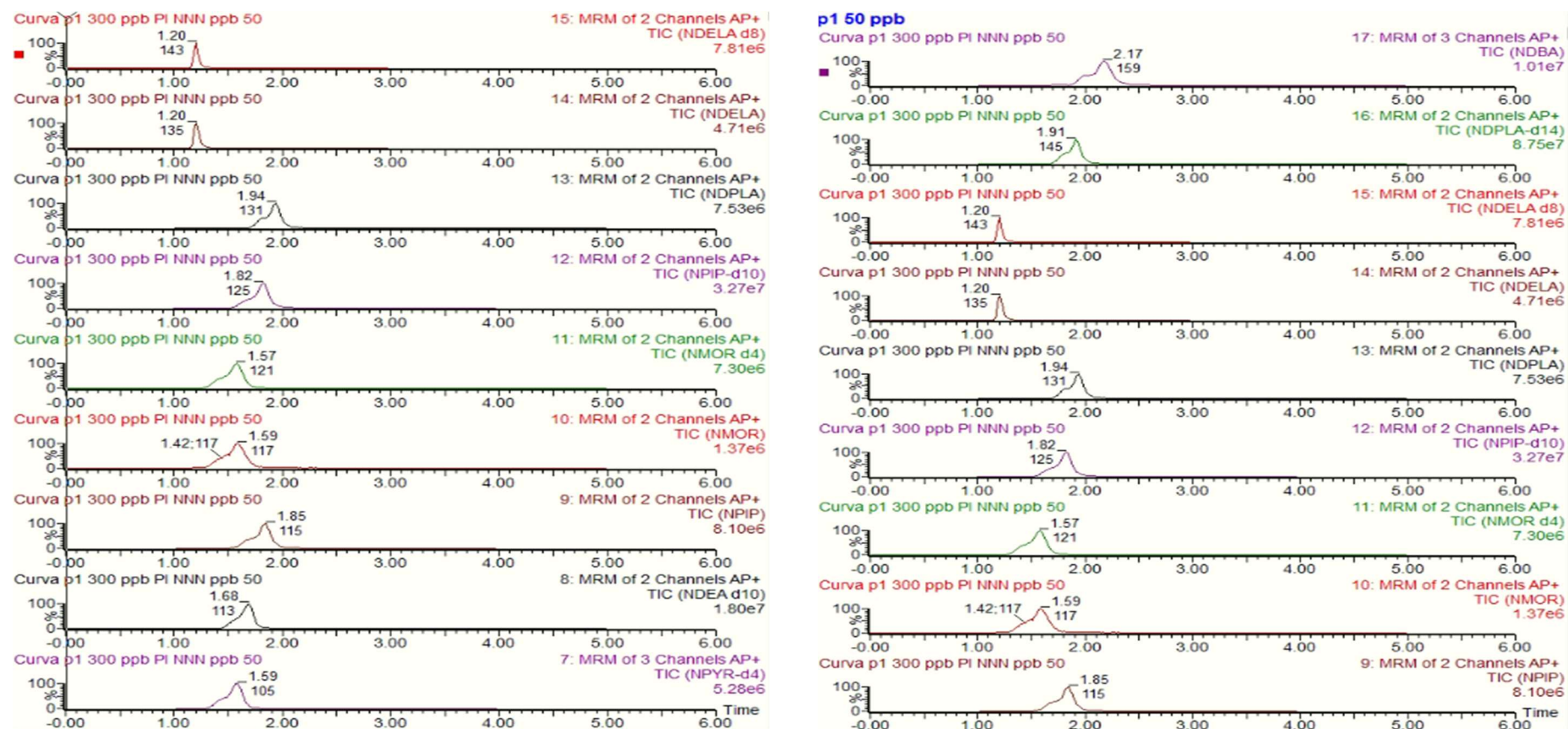
ZHONG, Z.; LI, G. Current trends in sample preparation for cosmetic analysis. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 1, p. 152–169, 2017.

Capítulo 7

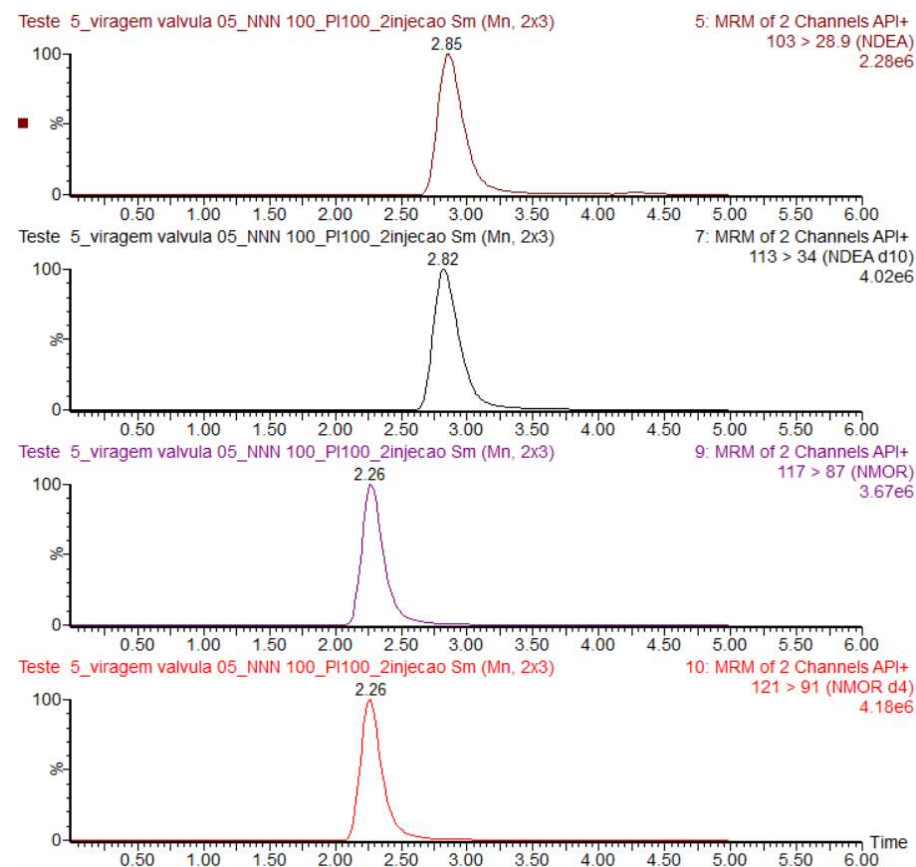
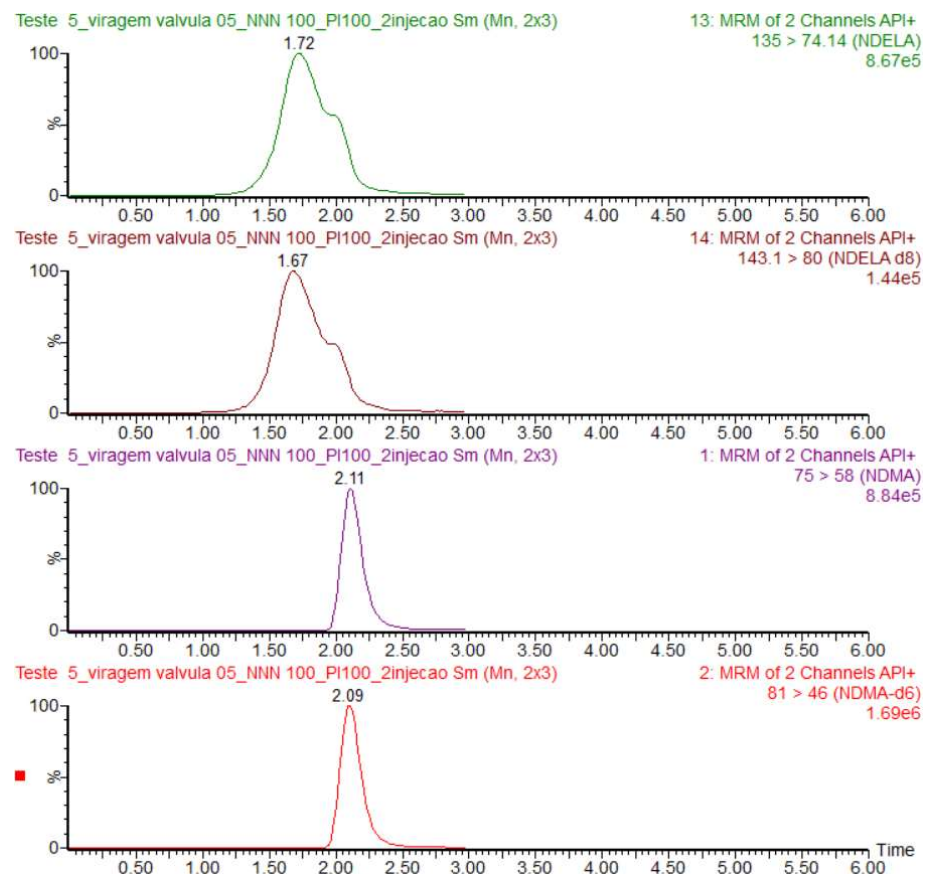
ANEXOS

Anexo I - Cromatogramas do desenvolvimento/otimização do método LC-UHPLC-MS/MS

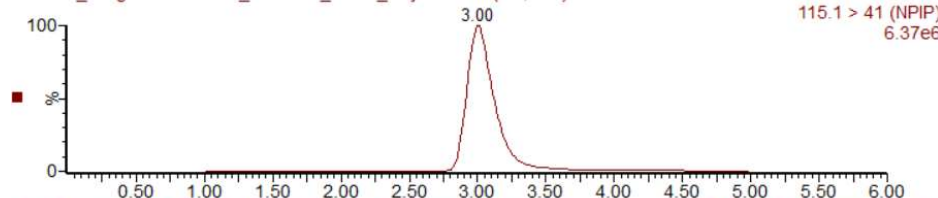
1) Condição inicial. Coluna HLB OASIS (20 μm) na primeira dimensão, coluna analítica Acquity UPLC® HSS T3 na segunda dimensão. Gradiente de eluição da BSM (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (80:20), 0,27 min (80:20), 1,00 min (10:90), 2,60 min (10:90), 2,70 min (80:20), 7,00 min (80:20); vazão da BSM: 0,30 mL min⁻¹. Gradiente da QSM (água:metanol, v/v): inicial (100:0), 0,27 min (100:0), 2,70 min (0:100), 4,60 min (0:100), 4,61 min (100:0), 7,00 min (100:0); vazão da QSM: 0,87 mL min⁻¹, tempo de carregamento da amostra 0,27 min; volume de injeção 50 μL



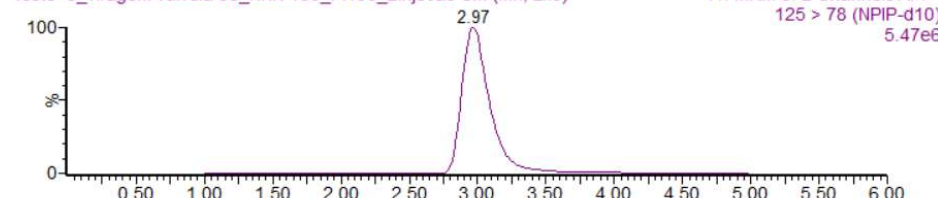
2) Ensaios com coluna SPE Atlantis (3 μm), coluna analítica Acquity UPLC[®] HSS T3, Gradiente de eluição da BSM (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (60:40), 0,50 min (60:40), 3,00 min (5:95), 4,50 min (5:95), 5,00 min (60:40); vazão da BSM: 0,45 mL min⁻¹. Gradiente da QSM (água:metanol, v/v): inicial (95:5), 4,50 min (95:5), 4,51 min (20:80), 5,00 min (20:80), 5,10 min (95:5); vazão da QSM: 1,25 mL min⁻¹, tempo de carregamento da amostra 0,40 min; volume de injeção 200



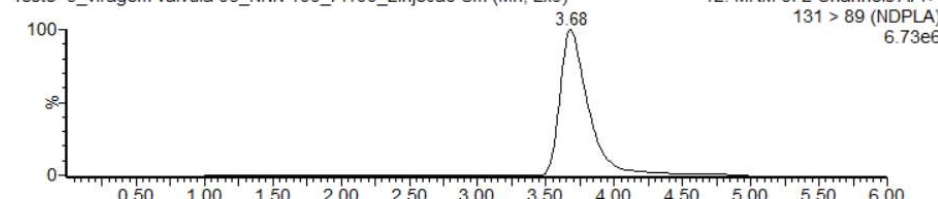
Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

8: MRM of 2 Channels API+
115.1 > 41 (NPIP)
6.37e6

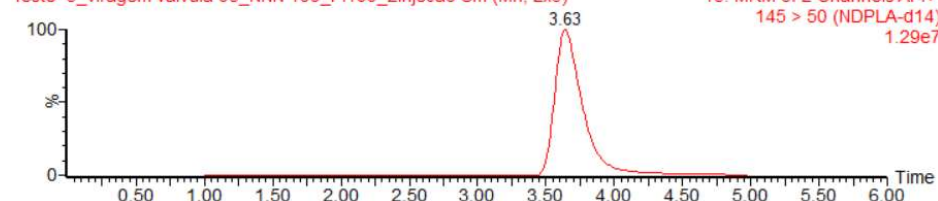
Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

11: MRM of 2 Channels API+
125 > 78 (NPIP-d10)
5.47e6

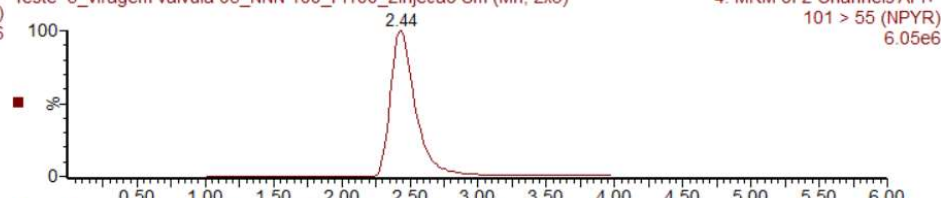
Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

12: MRM of 2 Channels API+
131 > 89 (NDPLA)
6.73e6

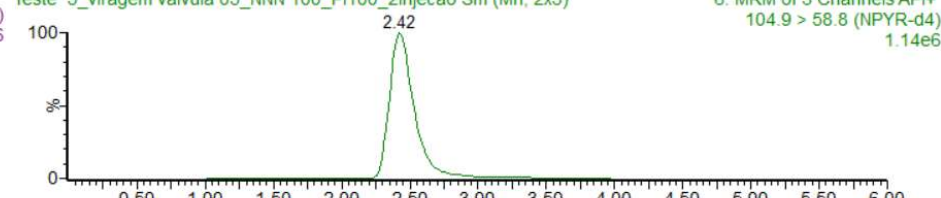
Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

15: MRM of 2 Channels API+
145 > 50 (NDPLA-d14)
1.29e7

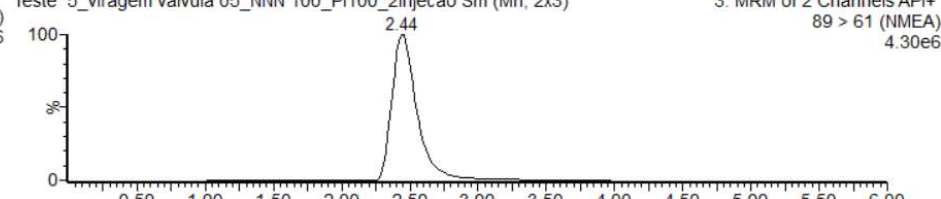
Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

4: MRM of 2 Channels API+
101 > 55 (NPYR)
6.05e6

Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

6: MRM of 3 Channels API+
104.9 > 58.8 (NPYR-d4)
1.14e6

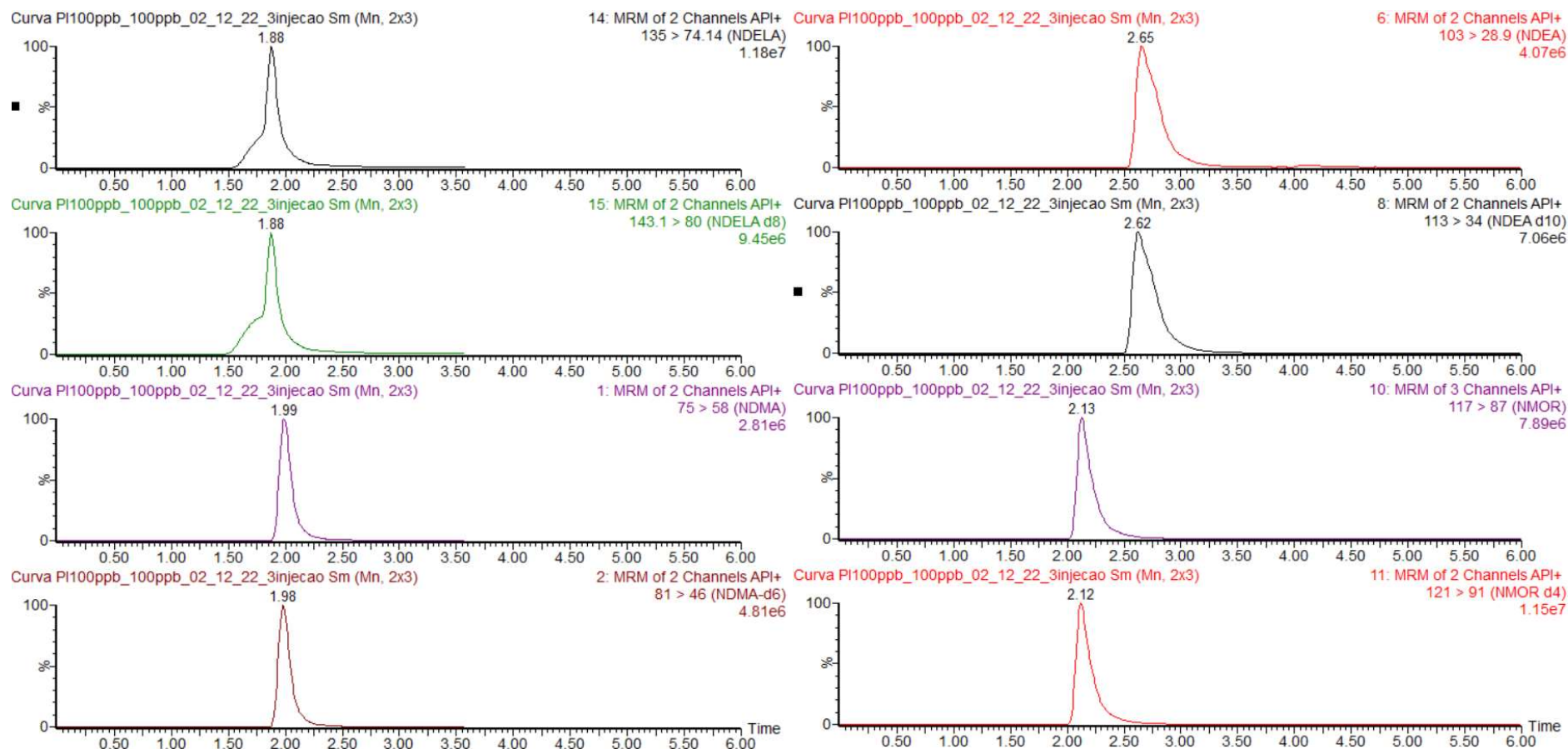
Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

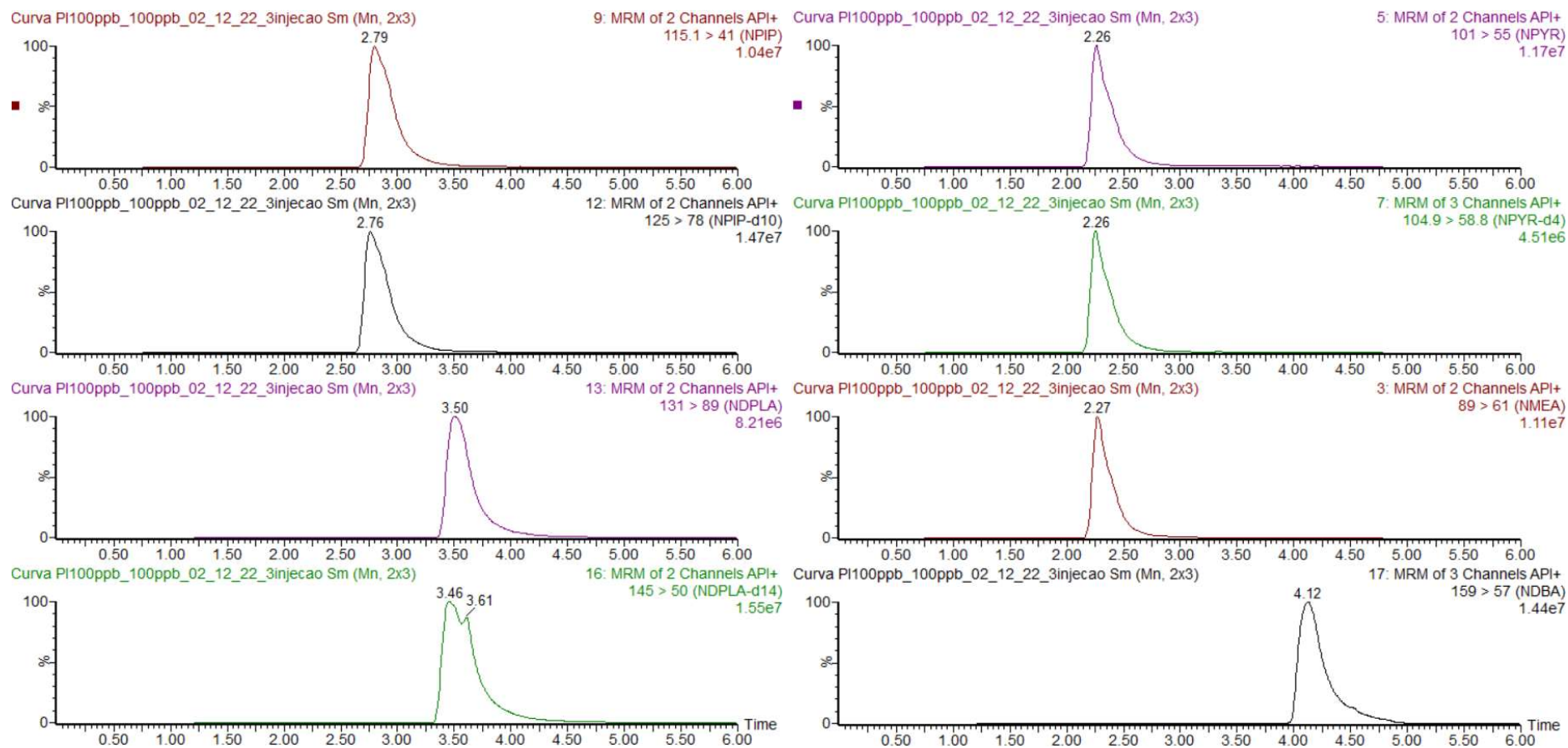
3: MRM of 2 Channels API+
89 > 61 (NMEA)
4.30e6

Teste_5_viragem_valvula_05_NNN_100_PI100_2injecao Sm (Mn, 2x3)

16: MRM of 3 Channels API+
159 > 57 (NDBA)
1.33e7

3) Condição final. Coluna SPE Atlantis (3 μm), coluna analítica Acquity UPLC® HSS T3, Gradiente de eluição da BSM (0,1% ácido fórmico em água:metanol, v/v): inicial (60:40), 0,50 min (60:40), 3,00 min (5:95), 4,50 min (5:95), 5,00 min (60:40); vazão da BSM: 0,45 mL min⁻¹. Gradiente da QSM (água:metanol, v/v): inicial (95:5), 4,50 min (95:5), 4,51 min (20:80), 5,00 min (20:80), 5,10 min (95:5); vazão da QSM: 1,25 mL min⁻¹, tempo de carregamento da amostra 0,40 min; volume de injeção 200 μL





Anexo II – Matérias primas presentes na formulação dos esmaltes avaliados.

Codificação do esmalte	Acetato						Acetilmetionina	Ácido					Água	Álcool						Aldeído		
	ETILA	BUTILA	BUTIRATO CELULOSE	POLIVINILA	PROPILA	TOCOFEROL		ADÍPICO	MÁLICO	CÍTRICO	FOSFÓRICO	GLICÓLICO		ÁLCOOL	DESNATURADO	DIACETONA	ISOPROPANOL BENZOÍLA	ISOPROPÍLICO	N-BUTIL	POLIVINÍLICO	BUTILFENIL METILPROPIONAL	HEXANAL
A	X	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
B	X	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
C	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-
D	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	-
E	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	-
F	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	X	X	-
1	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
2	X	X	-	-	-	X	-	X	-	-	X	-	X	-	-	X	-	X	-	-	-	-
3	X	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-
4	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	X	-	X	X	-	-	X
5	X	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
6	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
7	X	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
8	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
9	X	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
10	X	X	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-

Codificação do esmalte	Acetato						Acetilmetionina	Ácido					Água	Álcool						Aldeído		
	ETILA	BUTILA	BUTIRATO CELULOSE	POLIVINILA	PROPILA	TOCOFEROL		ADÍPICO	MÁLICO	CÍTRICO	FOSFÓRICO	GLICÓLICO		ÁLCOOL	DESNATURADO	DIACETONA	ISOPROPANOL BENZOÍLA	ISOPROPÍLICO	N-BUTIL	POLIVINÍLICO	BUTILFENIL METILPROPIONAL	HEXANAL
11	X	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	
12	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	
13	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	
14	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	
15	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	
17	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	
18	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	-	X	-	X	-	X	-	-	-	-	
19	X	X	-	-	-	-	-	PC	X	PC	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	
20	X	X	-	-	-	-	-	PC	X	X	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	
21	X	X	-	-	-	-	-	PC	X	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	
22	X	X	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	
23	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	X	-	-	-	X	X	-	-	-	
24	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	X	X	X	-	-	X	
Incidência da substância	29	29	3	1	2	2	1	12	9	6	4	1	4	9	1	8	1	28	3	1	1	2

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Alumina	Aminometilpropanol	Benzoato de Sacarose	BHT	Biotina	Butil Metoxidibenzoilmetano	Cetona			
							ACETONA	BENZOPHENONE	BENZOPHENONE-1	BENZOPHENONE-3
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Incidência da substância	3	1	1	1	1	1	3	1	8	1

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Citrato			Copolímero						Crosopolímero PG	Cumarina	Dibenzoato de Trimetil Pentanediol	Dietil-hexil Sulfosuccinato de Sódio
	TRIBUTIL	ACETIL TRIBUTIL	SÓDIO	ACRILATO	ANIDRIDO TRIMELÍTICO	ESTIRENO/ ACRILATO	GLICERINA GLICIDIL DECANOATO	GLICIDIL DECANOATO	VINILPIRROLIDONA/ ACETATO DE VINILA (VPVA)				
A	X	X	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-
B	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	X	-	PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	X	-	PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	PC	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X
1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	X	-	X	X	X	-	-	-	-	-	X	-
3	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-
4	-	X	-	X	X	X	-	-	-	-	-	X	-
5	X	X	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-
6	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	X	X	-	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-
8	X	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-
9	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-
11	X	X	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-

Codificação do esmalte	Cittrato			Copolímero						Crospolímero PG	Cumarina	Dibenzoato de Trimetil Pentanediol	Dietil-hexil Sulfosuccinato de Sódio
	TRIBUTIL	ACETIL TRIBUTIL	SÓDIO	ACRILATO	ANIDRIDO TRIMELÍTICO	ESTIRENO/ ACRILATO	GLICERINA GLICIDIL DECANOATO	GLICIDIL DECANOATO	VINILPIRROLIDONA/ ACETATO DE VINILA (VP/VA)				
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-
19	-	X	-	-	PC	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	X	-	-	PC	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	X	-	PC	PC	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-
24	-	X	-	X	X	X	-	-	-	X	-	-	-
Incidência da substância	7	21	PC	10	11	3	4	1	1	1	1	4	1

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Diisobutirato de Trimetil Pentanil	Diisocianato de Isoforona	Dimeticona	Dimetil Sulfona	EDTA	Esteralcônio de Bentonita	Esteralcônio de Hectorita	Etilcelulose
A	-	-	-	-	-	-	X	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	X	-
D	-	-	-	-	-	-	-	X
E	-	-	-	-	-	-	X	PC
F	-	-	-	-	X	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	X	-
2	-	-	-	-	-	X	-	-
3	X	-	X	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	X	PC	-
5	-	-	-	X	-	-	X	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	X	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	X	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	X	-
12	-	-	-	-	-	-	X	-
13	-	-	-	-	-	-	X	-
14	-	-	-	-	-	-	X	-
15	-	-	-	-	-	-	X	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	X	-
18	-	-	X	-	-	X	X	-

Codificação do esmalte	Diisobutirato de Trimetil Pentanil	Diisocianato de Isoforona	Dimeticona	Dimetil Sulfona	EDTA	Esteralcônio de Bentonita	Esteralcônio de Hectorita	Etilcelulose
19	-	-	-	-	-		X	PC
20	-	-	-	-	-	-	X	PC
21	-	-	-	-	-	-	X	PC
22	-	-	-	-	-	-	X	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	X	-	-	-	X	-	-
Incidência da substância	1	1	2	2	1	4	17	1

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Etocrileno	Extrato de Algas Calcáreas	Extrato de Flor Orchis Masculina	Extrato de Folha de Camellia Sinensis	Extrato de Panax Ginseng	Fenoxietanol	Flogopita Sintética	Fosfato de Ascorbil Magnésio	Fosfato de Trifenila
18	-	-	-	-	-	-	X	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	PC	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	X	-	-	-	-	PC	-	-
Incidência da substância	1	1	1	1	1	1	5	1	1

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Ftálico					Glicerina	Goma Xantana	HEA	Hidroxibenzoato de Tetrabutyl Fenila	Hidróxido de Alumínio	Lauril Sulfato de Sódio	Manitol	Metoxicinamato de Etilexila
	ANIDRIDO FTÁLICO	FTALATO DE POLIETILENO	DIBUTILFTALATO	TEREFTALATO DE POLIETILENO	POLIBUTILENO TEREFTALATO								
13	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-
Incidência da substância	5	2	4	0	1	1	PC	1	1	4	PC	1	1

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Monoterpenos				Neopentil Glicol	Nitrocelulose	Octocrileno	O-Fenilfenol	2-Oleamido-1,3-octadecanediol	Óleo de Argan	Óleo de Coco	Óleo de Prunus Armeniaca Kernel
	CITRONELAL	GERANIOL	LIMONENO	LINALOL								
A	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
B		-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	PC	X	-	-	-	-	-	-
F	X	X	X	X	-	-	-	PC	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	X	-
2	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X
4	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7		-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
8		-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-
10		-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
15	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-

Codificação do esmalte	Monoterpenos				Neopentil Glicol	Nitrocelulose	Octocrileno	O-Fenilfenol	2-Oleamido-1,3-octadecanediol	Óleo de Argan	Óleo de Coco	Óleo de Prunus Armeniaca Kernel
	CITRONELAL	GERANIOL	LIMONENO	LINALOL								
18	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
19		-	-	-	PC	X	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	PC	X	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	PC	X	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-
Incidência da substância	1	1	1	1	13	28	2	PC	1	1	2	1

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Óleo de Semente Girassol	Óleo de Soja	Óxido		Pantenol	Pantotenato de Cálcio	PEG-40 Óleo de Rícino Hidrogenado	Perfume (Fragrância)	Pigmentos
			ALUMÍNIO	ESTANHO					
A	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
B	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
D	X	X	-	-	-	-	-	-	X
E	-	-	-	X	-	-	-	-	X
F	-	-	-	PC	-	-	X	X	PC
1	-	-	-	-	X	-	-	-	PC
2	-	-	-	-	-	-	-	-	X
3	-	-	-	-	X	X	-	-	X
4	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
5	-	-	-	-	-	-	-	-	X
6	-	-	-	-	-	-	-	-	X
7	-	-	X	X	-	-	-	-	X
8	-	-	-	-	-	-	-	-	X
9	X	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	X
11	-	-	-	X	-	-	-	-	X
12	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
13	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
14	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	X	-	-	-	PC

Codificação do esmalte	Óleo de Semente Girassol	Óleo de Soja	Óxido		Pantenol	Pantotenato de Cálcio	PEG-40 Óleo de Rícino Hidrogenado	Perfume (Fragrância)	Pigmentos
			ALUMÍNIO	ESTANHO					
18	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
19	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
20	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
21	-	-	-	PC	-	-	-	-	PC
22	-	-	-	-	-	-	-	-	PC
23	-	-	-	-	-	-	-	-	X
24	-	-	-	PC	-	-	-	-	PC
Incidência da substância	2	1	1	3	3	1	1	1	12

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Polietileno Oxidado	Poliuretano-11	Poliuretano-33	Polivinil Butiral	Proteína do Trigo Hidrolisada	Propilenoglicol	PPG-2 Dimeticona	PPG-26-Buteth-3
A	X	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	PC	-	-	-	-	-	X
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	X	-	-	-
4	-	-	PC	-	-	-	-	-
5	X	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	X	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	X	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	X	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	X	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-

Codificação do esmalte	Polietileno Oxidado	Poliuretano-11	Poliuretano-33	Polivinil Butiral	Proteína do Trigo Hidrolisada	Propilenoglicol	PPG-2 Dimeticona	PPG-26-Buteth-3
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	X	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
Incidência da substância	4	PC	PC	1	1	1	1	1

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Resina				Rosmarinus Officinalis Leaf	Salicilato		Sérica em pó	Sílica											
	COLOFÔNIO	EPÓXI	ETIL TOSILAMIDA	TOSILAMIDA/ FORMALDEÍDO		BENZILA	ETILEXILA		ALUMÍNIO, CÁLCIO E SÓDIO	BOROSILICATO DE CÁLCIO E SÓDIO	BOROSILICATO DE CÁLCIO E ALUMÍNIO	CICLOPENTASILOXANO	DIMETIL SILILATO	MERCAPTOPROPILTRIME-TOXISILANO	METACRILATO PROPIL TRIMETOXISILANO	METIL TRIETOXISILANO	MICA	SÍLICA	GLICIDOXIPROPIL-TRIMETOXISILANO	TRISILOXANO DE DROMETRIZOL
11	X	-	X	-		-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-
12	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
13	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
14	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
16	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-		-	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	PC	X	-	-
19	-	X	-	X		-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	X		-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
Incidência da substância										3	1	5	15	1	1	1	1	10	1	3

PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Sulfato de Zinco	Talco	Terra Diatomáceas	Triacetina	Tribenzoato de Glicerol	Trímero de Isocianurato	Tolueno
A	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	X
C	-	-	-	-	-	-	X
D	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	X
2	-	X	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	X
13	-	-	-	-	-	-	X
14	-	-	-	-	-	-	X
15	-	-	-	-	-	-	X
16	-	-	-	-	-	-	X
17	-	-	-	-	-	-	X
18	-	-	-	X	X	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-

Codificação do esmalte	Sulfato de Zinco	Talco	Terra Diatomáceas	Triacetina	Tribenzoato de Glicerol	Trímero de Isocianurato	Tolueno
20	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-
24	X	-	X	-	-	X	-
Incidência da substância	1	1	1	1	1	1	9

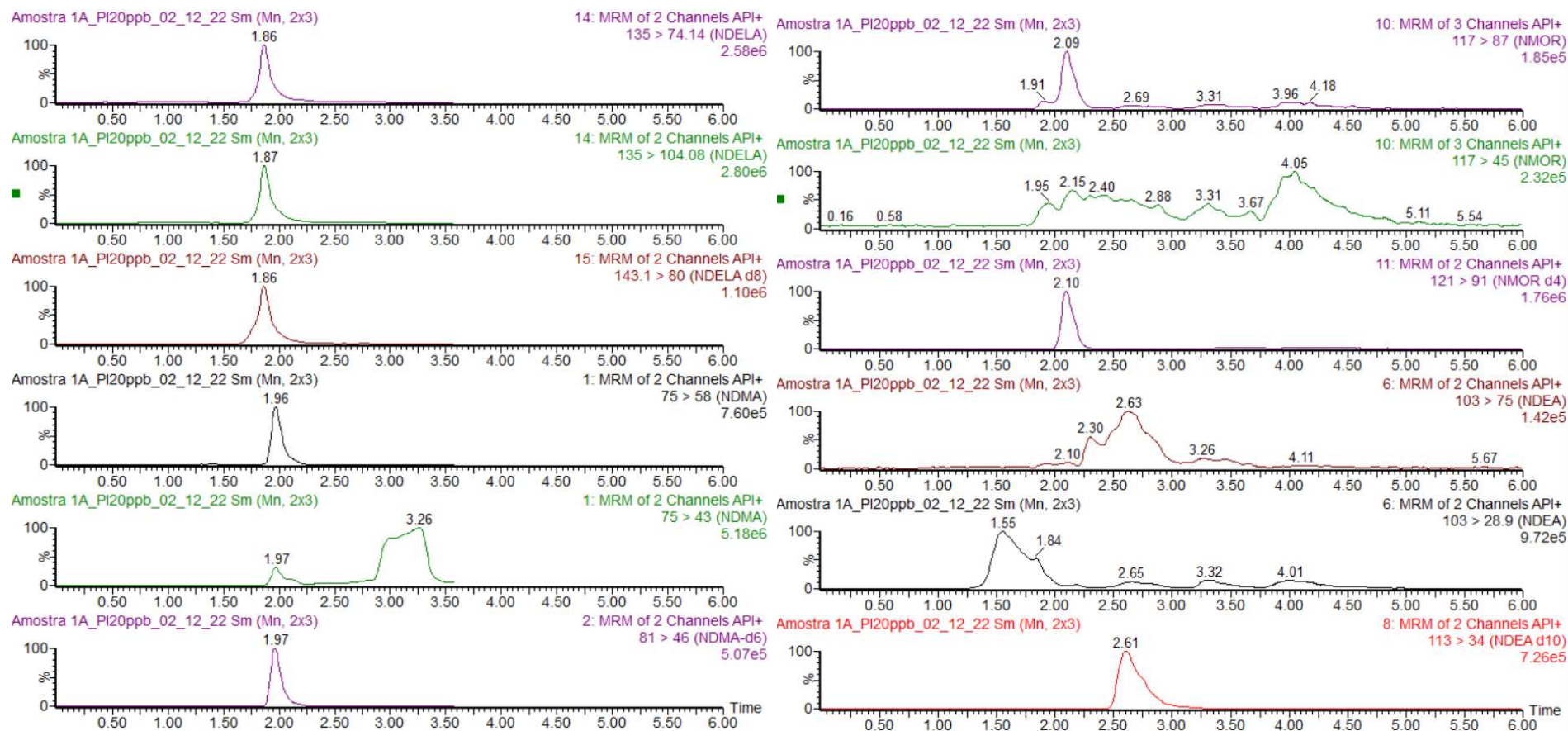
PC: pode conter; X: possui a substância; -: não possui a substância

Codificação do esmalte	Quantidade de substâncias
	131
A	23
B	18
C	11
D	15
E	13
F	21
1	11
2	21
3	21
4	20
5	18
6	10
7	27
8	13
9	16
10	12
11	26
12	10
13	10
14	9
15	10
16	7
17	9
18	31
19	12
20	12
21	11

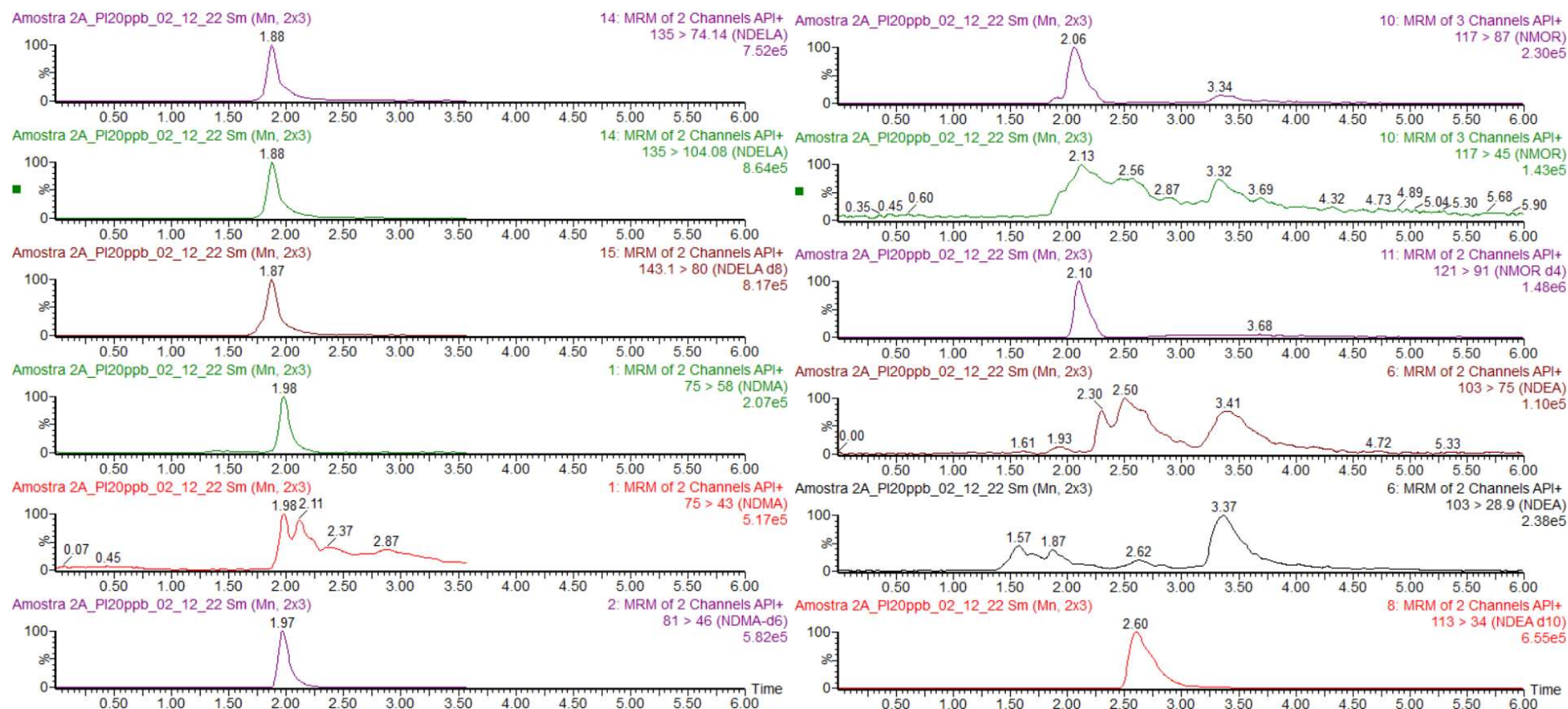
Codificação do esmalte	Quantidade de substâncias
	131
22	11
23	15
24	25

Anexo III Cromatogramas das amostras de esmaltes de unhas analisados

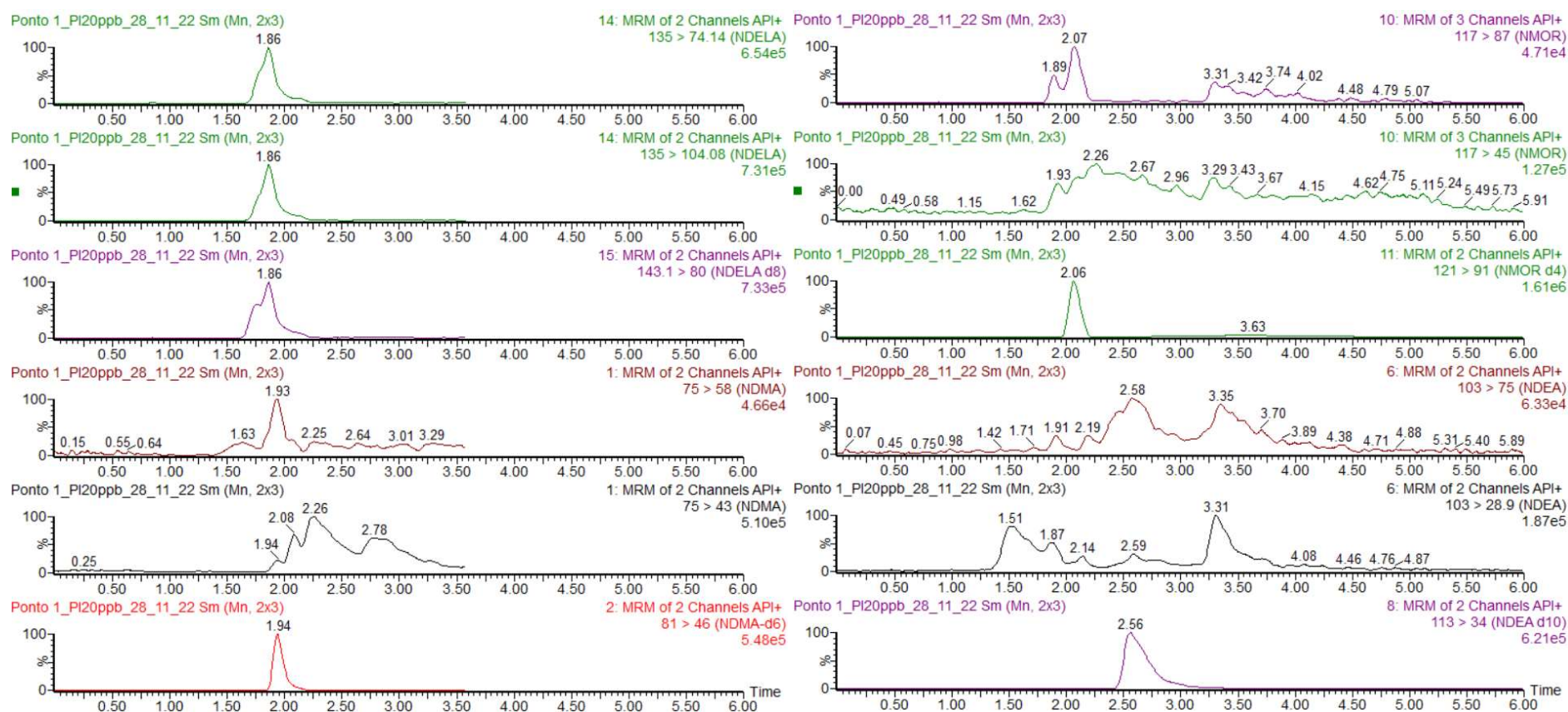
1) Cromatogramas do Esmalte A fortificado com 40 ng g⁻¹ de NDELA-d₈, NDMA-d₆, NMOR-d₄ e NDEA-d₁₀



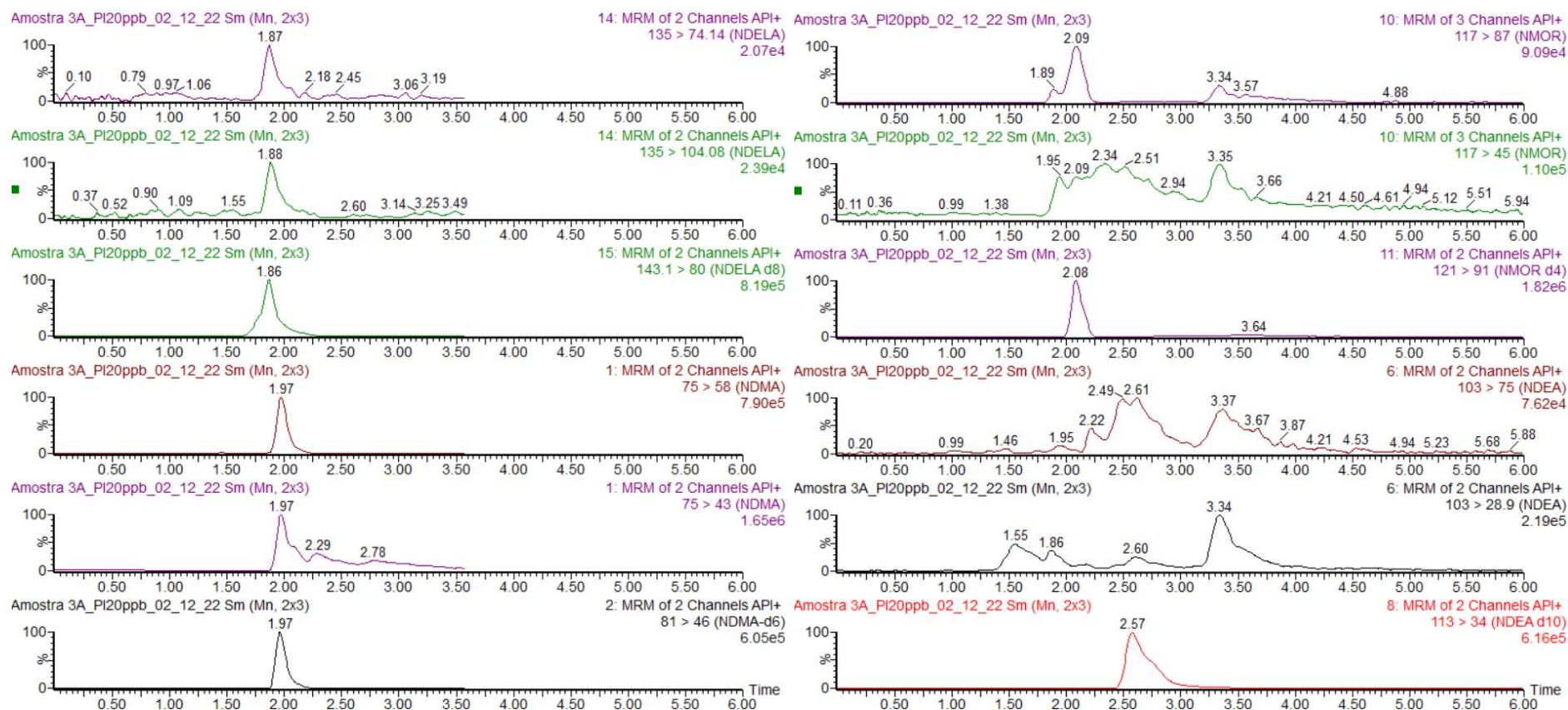
2) Cromatogramas do Esmalte C fortificado com 40 ng g⁻¹ de NDELA-d₈, NDMA-d₆, NMOR-d₄ e NDEA-d₁₀



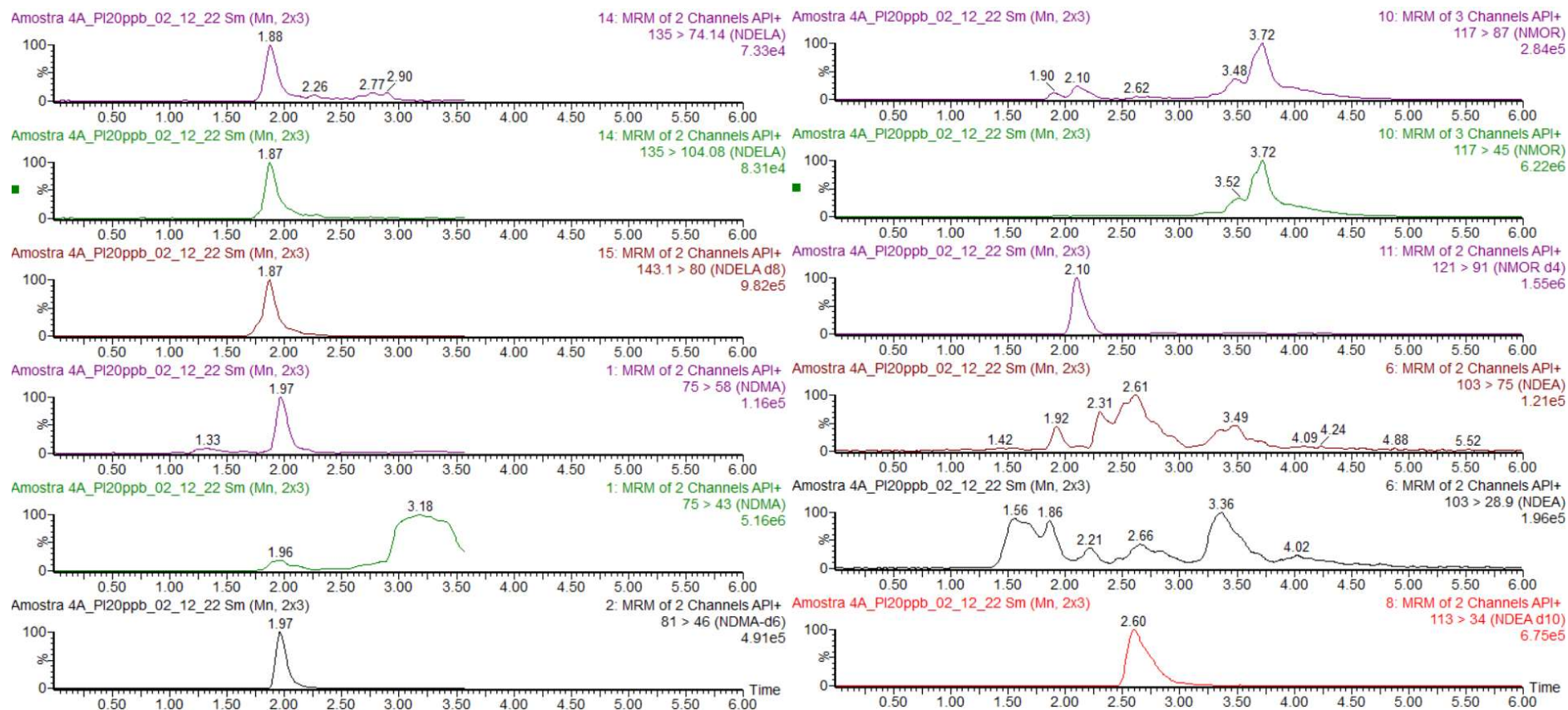
3) Cromatogramas do Esmalte D fortificado com 40 ng g⁻¹ de NDELA-d₈, NDMA-d₆, NMOR-d₄ e NDEA-d₁₀



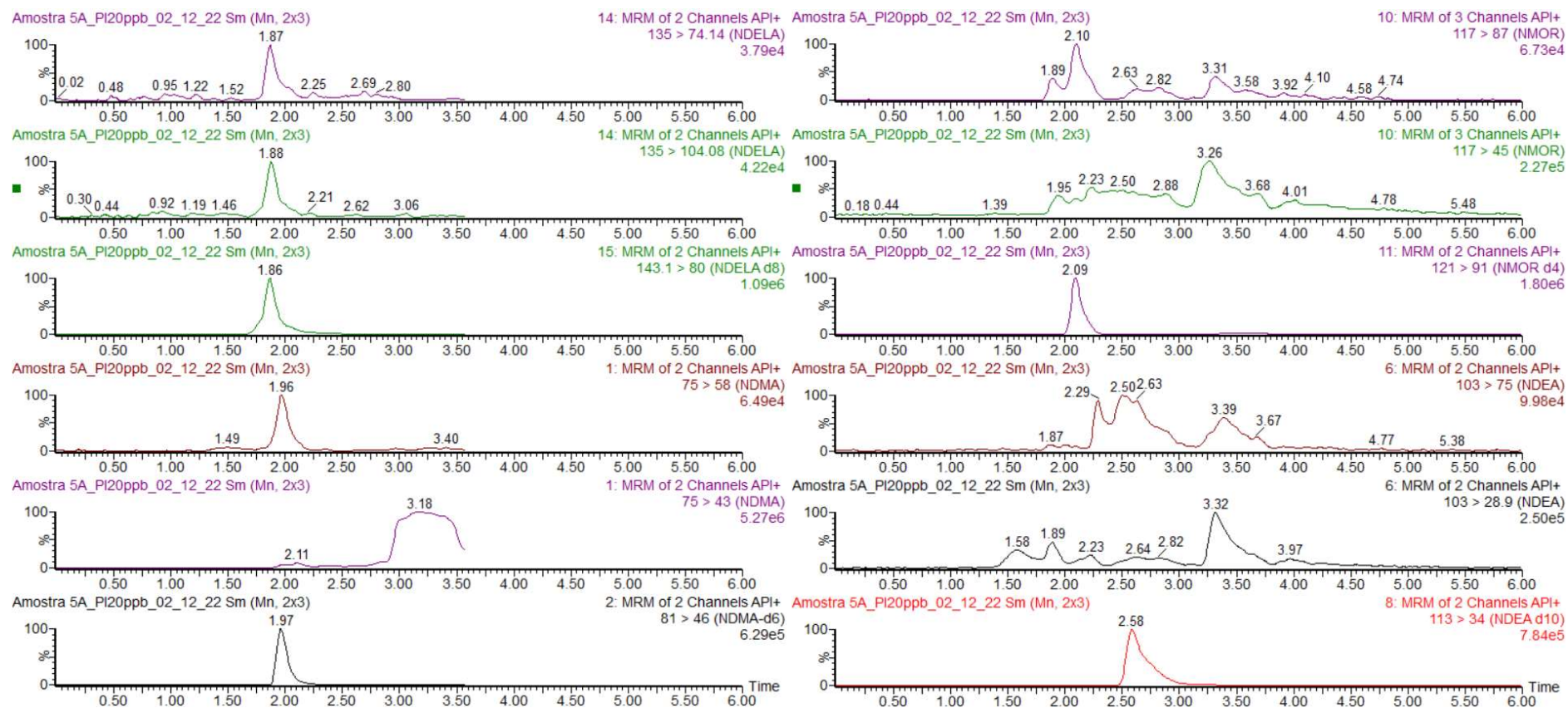
4) Cromatogramas do Esmalte E fortificado com 40 ng g⁻¹ de NDELA-d₈, NDMA-d₆, NMOR-d₄ e NDEA-d₁₀



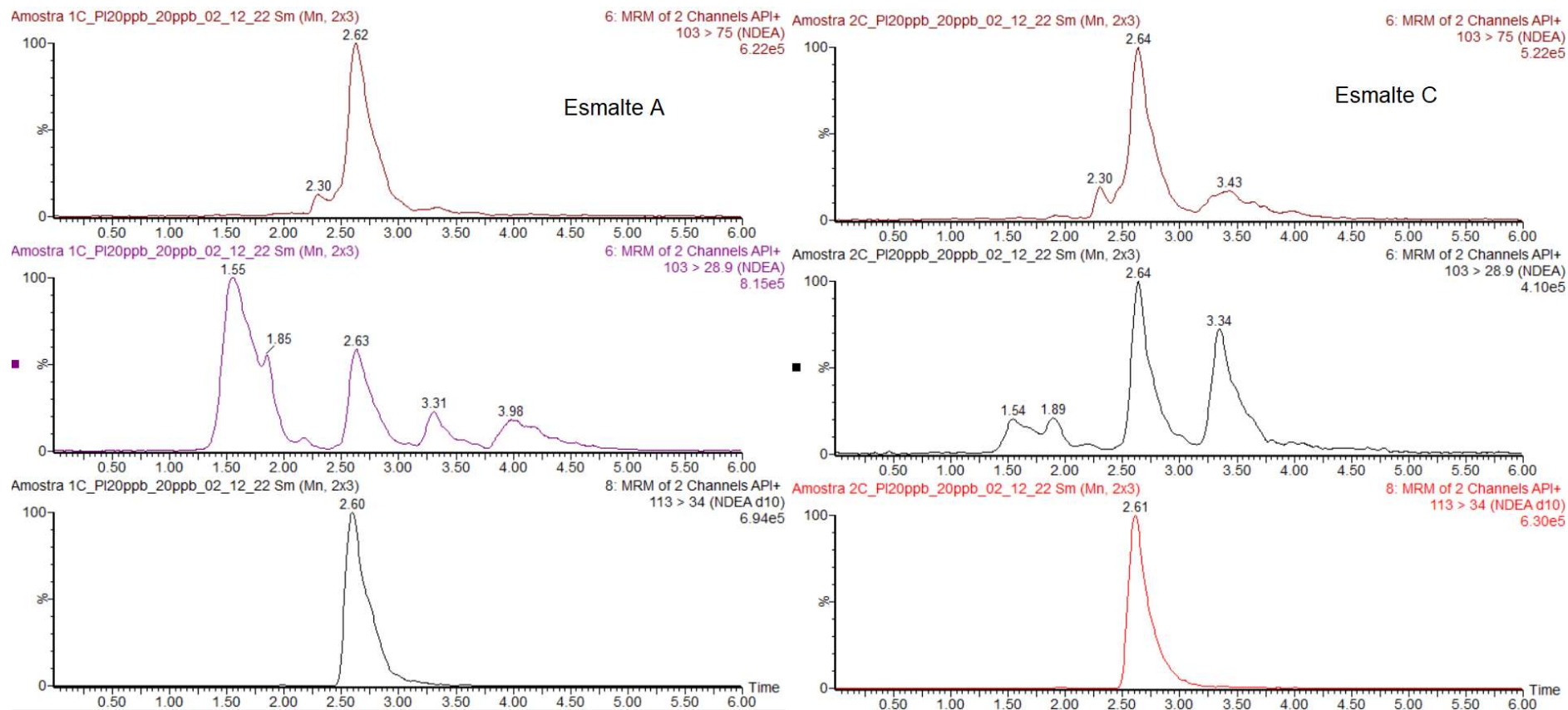
5) Cromatogramas do Esmalte H fortificado com 40 ng g⁻¹ de NDELA-d₈, NDMA-d₆, NMOR-d₄ e NDEA-d₁₀



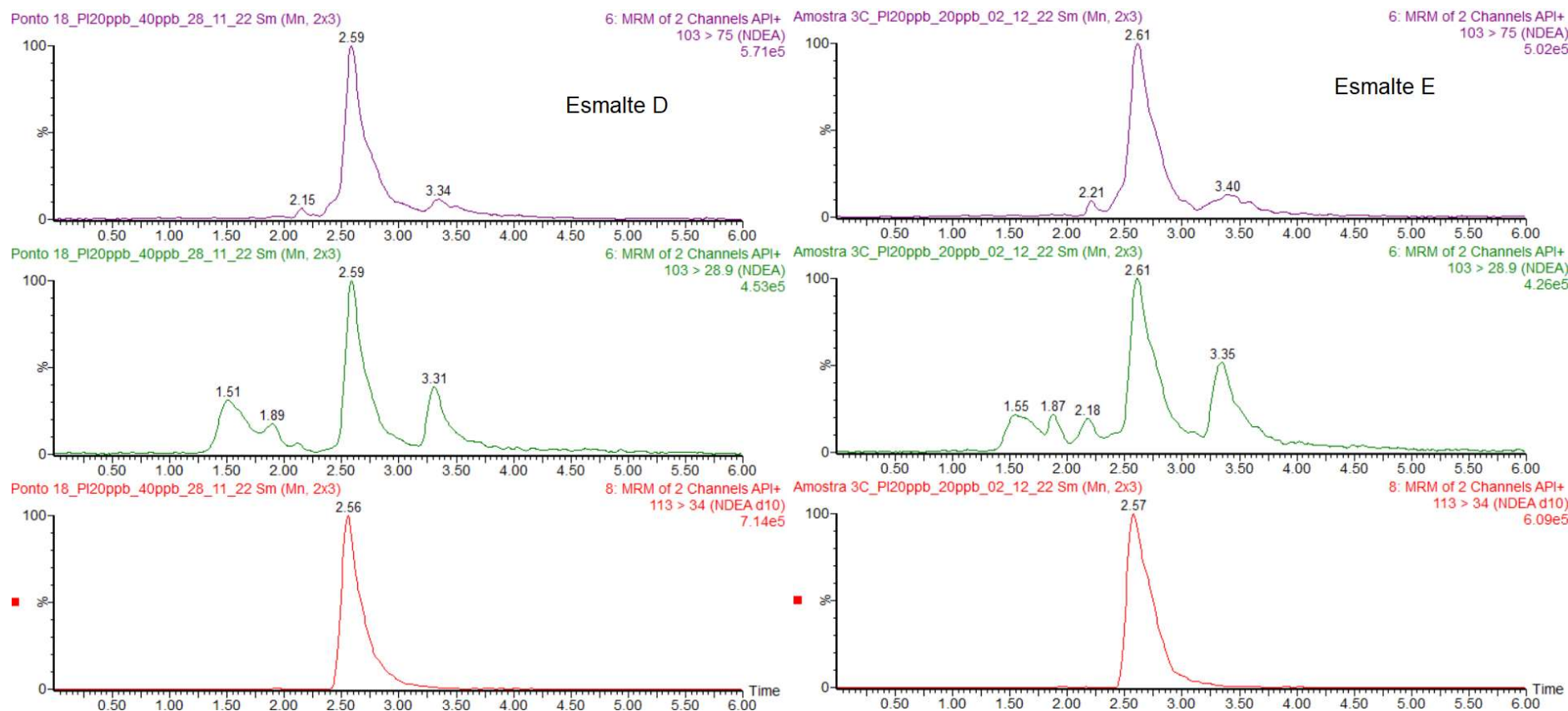
6) Cromatogramas do Esmalte G fortificado com 40 ng g⁻¹ de NDELA-d₈, NDMA-d₆, NMOR-d₄ e NDEA-d₁₀



7) Cromatograma de recuperação dos Esmaltes A e C. Fortificação com 40 ng g⁻¹ de NDEA e 40 ng g⁻¹ de NDEA-d₁₀



8) Cromatograma de recuperação dos Esmaltes D e E. Fortificação com 40 ng g⁻¹ de NDEA e 40 ng g⁻¹ de NDEA-d₁₀



9) Cromatograma de recuperação dos Esmaltes G e H. Fortificação com 40 ng g⁻¹ de NDEA e 40 ng g⁻¹ de NDEA-d₁₀

