



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE OURO PRETO**

**Instituto de Ciências Exatas e
Biológicas**



Dissertação

**Desenvolvimento e Validação de um
Método para Determinação de Formaldeído
em Esmaltes Utilizando QuERChES/SPE e
GC/MS**

Isabela Cristina Matos Cunha

**Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQUIM**

Ouro Preto

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Química



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM ESMALTES UTILIZANDO QUERCHES/SPE E GC/MS

Autora: **Isabela Cristina Matos Cunha**

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Fabiana Aparecida Lobo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação Química da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração:

Química Analítica

Ouro Preto/MG

Agosto de 2016

C972d

Cunha, Isabela .

Desenvolvimento e validação de um método para determinação de formaldeído em esmaltes utilizando QUERCERS/SPE e GC/MS. [manuscrito] / Isabela Cunha. - 2016.

91f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Fabiana Aparecida Lobo.

Coorientador: Prof. Dr. Karla Moreira Vieira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Universidade Federal de Ouro Preto. Química. Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Ouro Preto.

Área de Concentração: Química Analítica.

1. Amostragem - QuEChERS/SPE. 2. Formaldeído. 3. Esmaltes. 4. Amostragem - GC/MS. I. Lobo, Fabiana Aparecida. II. Vieira, Karla Moreira. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 543



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Química



**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
PARA DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM ESMALTES
UTILIZANDO QUERCHES/SPE E GC/MS.”**

Autora: Isabela Cristina Matos Cunha

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, em 19 de agosto de 2016, pela comissão examinadora composta pelos membros:

Prof.^a Dr.^a Renata Pereira Lopes Moreira
UFV

Prof.^a Dr.^a Gilmare Antônia da Silva
UFOP

Prof.^a Dr.^a Fabiana Aparecida Lobo
UFOP

*Aos meus amados pais, **Saulo e Celina**,
pela referência paterna, de porto seguro e de fé.*

*Às minhas irmãs e amigas, **Rafaela e Gabriela**.*

*Aos meus **amigos e familiares**,
por sempre me incentivarem, pelo carinho e amor incondicional,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e fé, aos meus pais, Saulo e Celina, por serem meu sustento, por acreditarem em meu sucesso mesmo quando

Às minhas irmãs, Rafaela e Gabriela, por serem minhas melhores amigas e companhias. Às minhas amigas Lívia, Erika, Marina, Lorena e Karine que apesar de trilharem caminhos diferentes sempre estiveram comigo. Ao meu príncipe lindo, João Pedro, que me alegra sempre. eu achei que tudo estaria perdido. Amo muito vocês.

As orientadoras Fabiana Aparecida Lobo e Karla Moreira Vieira, que acreditaram em meu sucesso e que me acolheram quando eu optei fazer mestrado. Agradeço imensamente pelas oportunidades, orientações, amizade, companheirismo, ensinamentos, por terem acreditado em meu potencial e por me ajudar a crescer profissionalmente.

Agradeço à República Saia Justa, por toda amizade, amparo e rocks, por terem sido meu apoio quando eu quis desistir de Ouro Preto. Amo muito vocês e que venha meu quadrinho como homenageada.

À República Chanel que foi me cativando e me acolhendo com muito carinho! Obrigada meninas por tudo! Espero que a nossa república tenha vida longa.

O meu muito obrigada, às Repúblicas Alforria e Katapulta, pela amizade e por dividirem momentos de boas risadas em Ouro Preto. À República BlackJack, pela amizade, carinho, por me acolherem tão bem. Adoro vocês!

Ao Júnior Chagas pelas orientações, amizade, companheirismo e ensinamentos durante estes anos de convivência e por dividir a sua sabedoria e experiência, muitíssima obrigada!

Agradeço ao Thiago, Aline, Elisandra, Luana e Thamires, pelas horas divididas no laboratório de cromatografia, pelas risadas, histórias e pela ajuda nos experimentos deste trabalho.

A Prof^a Dra. Gilmare A. da Silva e Prof. Dr. Mauricio X. Coutrim pela grande atenção concedida sempre que necessária e por destacarem ideias e conselhos no exame de qualificação. Obrigada!

Aos docentes e funcionários do Departamento de Química da UFOP e do ICEA em João Monlevade, em especial Viviane, pela amizade e consideração durante estes dois anos de convivência.

Em especial ao André Barros e Amanda Quaresma pelas discussões e auxílios que foram de suma importância ao desenvolvimento deste trabalho. À técnica Ananda L. Sanson e a todo o Laboratório de Caracterização Molecular - Espectrometria de Massas/ UFOP, sob a coordenação dos professores Robson José de Cássia Franco Afonso e Maurício Xavier Coutrim, pelo empréstimo de materiais e ajuda de sempre.

À Universidade Federal de Ouro Preto, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Departamento de Química e Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade, experiência e bolsa concedida.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

"Qualquer um que nunca tenha cometido um erro nunca tentou algo novo. "
Albert Einstein.

RESUMO

O formaldeído é utilizado como agente firmador/endurecedor em esmaltes para unha, porém, segundo as agências internacionais de controle do câncer e de proteção ambiental, esse composto possui propriedades físico-químicas que o tornam carcinogênico. Assim, no Brasil o seu controle é feito pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que estabelece que os produtos cosméticos comerciais devem apresentar uma concentração máxima de 0,2% m/m deste composto e identificar a presença dele com concentrações superiores a 0,05% m/m. Devido ao seu uso constante por uma grande parte da população, os esmaltes para unha podem se tornar uma fonte de preocupação, uma vez que a grande maioria possuem formaldeído em sua composição. Assim, este trabalho propôs a extração do formaldeído derivatizado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) de amostras de esmalte para unha, pelo hifenamento dos métodos de extração de QuEChERS e SPE, para a posterior análise por GC/MS. E devido ao grande número de variáveis que podem influenciar diretamente no sinal analítico deste trabalho, utilizou-se planejamentos experimentais multivariados para a obtenção de uma possível condição ótima de extração de formaldeído das amostras de esmalte de unha. Para avaliar sistematicamente a influência das variáveis no sistema proposto, utilizou-se um planejamento fatorial 2^4 , como triagem. As variáveis estudadas foram: tempo, massa de derivatizante, massa de esmalte e massa de sal ($MgSO_4$) no sistema de extração. Os resultados indicaram que somente a massa de derivatizante não é significativa, mas suas interações com as demais variáveis mostraram-se significativas. Assim, foram reestudadas todas as variáveis da triagem em um planejamento composto central 2^4 esférico para a superfície de resposta. Tal estudo confirmou a significância de todas as variáveis estudadas na triagem. Não foi possível obter um modelo quadrático sem falta de ajuste, no entanto, encontrou-se uma condição ótima que proporcionou um aumento de 10.000 vezes na área de pico cromatográfico por análise em GC/MS em relação aos estudos sem planejamento experimental multivariado. As melhores condições de extração foram: tempo de 5 min; 118,00 mg de massa de derivatizante; 730,00 mg de massa de esmalte e 2500,00 mg de massa de sal ($MgSO_4$). O método foi validado e apresentou os seguintes parâmetros: LOD (Limite de detecção) de 0,0005% m/v (massa de formaldeído/massa de esmaltes), LOQ (Limite de quantificação) de 0,005% m/v, e

valores de recuperação entre 90,00 - 99,33%. Até o momento não se tem o conhecimento de métodos similares ao proposto aqui na literatura, embora esse estudo apresente acentuada relevância, uma vez que possibilitará informações ao consumidor e agências regulamentadoras sobre uma substância potencialmente tóxica, o formaldeído, em amostras de esmaltes para unha, produto altamente consumido pela população. Assim este trabalho apresenta um método analítico relativamente simples, de baixo gasto de reagentes para a análise de amostras de esmalte para unha.

Palavras-Chave: Formaldeído, Esmaltes para Unha, GC/MS, Otimização Multivariada, Hifenamento QuEChERS/SPE.

ABSTRACT

Formaldehyde is used as a firming agent/hardener in nail polish, however, according to international agencies cancer control and environmental protection, this compound has physicochemical properties that make it carcinogenic. Thus, in Brazil its control is done by ANVISA (National Sanitary Inspection Agency), which establishes that the commercial cosmetic products must carry a maximum concentration of 0.2% of this compound. Due to its constant use by a large part of the population, the nail polish can become a problem. However, it does not have the knowledge of sample preparation strategies for the formaldehyde in the literature analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). This research proposed the extraction of formaldehyde derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) in hypoallergenic nail polish samples (no formaldehyde in the final product), using hyphenate extraction methods of QuEChERS and SPE, for further analysis by GC/MS. Due to the large number of variables that can directly influence this method, was used a multivariate experimental design to obtain an optimum condition of formaldehyde extraction of nail polish samples. To evaluate systematically the influence of the variables in the proposed system, as tools for screening, was used a factorial design 2^4 with triplicate at the midpoint. The studied variables were: time, mass derivatizing, mass of nail polish and mass of salt ($MgSO_4$) in the extraction system. The results indicated that only the mass derivatizing is not significant in the system, but their interactions with the other variables were. So they were restudied all variables of screening in a central composite design 2^4 with triplicates the central point for the response surface. This study confirmed the significance of all the variables studied in the screening. For the analysis of ANOVA (analysis of variance) could not get a quadratic model without lack of fit. However, was found a great condition that provided an increase of 10,000 times the peak area chromatographic analysis by GC/MS in relation to studies without multivariate experimental design. Better extraction conditions were: 5 min, 118.00 mg of derivatizing mass, 730.00 mg of nail polish mass and 2500.00 mg of salt mass ($MgSO_4$). The method was validated for a single sample R1, and presented the following parameters: LOD (Detection of limit) = 0.0005%, LOQ (limit of quantification) = 0.005%, cause this with% and recovery values between 90,00 - 99.33%. Until nowadays there is no knowledge about similar methods as the one proposed on this research in the literature,

although this study presents relevance since it will enable information to consumers and regulators agency about a potentially toxic substance (formaldehyde) in nail polish samples constantly used by population. So, this research becomes of immeasurable importance of presenting a relatively simple analytical method, low consumption of reagents for the analysis of nail polish samples.

Keywords: Formaldehyde, nail polish, GC/MS, Optimization, hyphenated methods QuEChERS/SPE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de um cromatógrafo a gás de coluna capilar, acoplado com um espectrômetro de massas.	30
Figura 2	Esquema de um analisador de massas do tipo quadrupolo mostrando a trajetória dos íons se dirigindo até o detector.	32
Figura 3	Reação de derivatização do formaldeído com a 2,4-Dinitrofenilhidrazina, onde se obtém como produto uma hidrazona (FA-DNPHo) estável.	33
Figura 4	Esquema do método de extração de formaldeído derivatizado com 2,4-DNPH de amostras de esmalte para unha utilizando QuEChERS/SPE.	48
Figura 5	Mecanismo da reação de derivatização de carbonilo com 2,4-DNPH, obtendo como produto uma hidrazona estável e de baixa volatilidade.	55
Figura 6	Cromatograma do FA-DNPHo obtido no estudo da otimização das condições da análise da solução padrão de concentração 0,8% m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte).	57
Figura 7	Espectro de massa do pico de FA-DNPHo, com análise no modo SCAN, com a identificação dos íons fragmento $m/z = 180$ e 150 e íon precursor $m/z = 210$.	58
Figura 8	Perfis dos cromatogramas no modo SIM do FA-DNPHo. A) íon precursor $m/z 210$; íons fragmentos B) $m/z 180$ e C) $m/z 152$ respectivamente obtido da análise da alíquota após clean-up com cartucho Florisil®.	61
Figura 9	Áreas cromatográficas obtidas para FA-DNPHo nos ensaios realizados do planejamento fatorial completo, sendo os ensaios 17, 18 e 19 as replicatas no ponto central.	65
Figura 10	Gráfico de probabilidade normal no estudo da triagem das variáveis de extração de formaldeído em amostras de esmalte de unha.	66
Figura 11	Gráfico de valores observados <i>versus</i> valores estimados para a área de pico cromatográfico pela metodologia de superfície de resposta.	72
Figura 12	Áreas cromatográficas obtidas para FA-DNPHo, para os ensaios realizados do planejamento Composto Central, sendo os ensaios 25, 26 e 27 as replicatas no ponto central.	72
Figura 13	Gráfico de probabilidade normal das variáveis estudadas na extração de formaldeído em amostras de esmalte para unha obtido pela RSM. O ponto em vermelho se apresenta uma possível tendência de não distribuição normal da variável $2 =$ massa de 2,4 DNPH em relação às demais variáveis e suas interações, confirmando significância desta variável para o	73

sistema estudado.

- Figura 14** Variação da área de pico cromatográfico entre ensaios sem e com o uso de planejamentos experimentais multivariados. CCD = planejamento experimental composto central **74**
- Figura 15** Cromatograma dos íons fragmentados de $m/z = 180$ e 152 e íon percurso de $m/z = 210$ monitorados no modo SIM para análise da área cromatográfica do pico d6 FA-DNPHo. **76**
- Figura 16** Curvas analíticas para avaliar a influência do efeito de matriz na quantificação de FA-DNPHo. A = curvas ajustadas em seis diferentes matrizes de esmaltes; B = curvas das amostras de marca R; C = curvas das amostras de marca C. **77**
- Figura 17** Curva analítica preparada em diluições sequenciais da solução padrão de formaldeído 37% em mistura de solvente acetonitrila/metanol (7:3 v/v). **78**

LISTA DE TABELA

- Tabela 1:** Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^4 no estudo do preparo de amostras de esmalte com QuERChERS/SPE para análise por GC/MS. Os valores -1 e +1 representam os níveis codificados, sendo as variáveis t = tempo de agitação (min), $m_{2,4\text{-DNPH}}$ = massa de derivatizante (mg), m_{es} = massa de esmalte (mg) e m_{sal} = massa de sal MgSO_4 (mg). **50**
- Tabela 2:** Fatores e níveis do planejamento composto central, sendo o nível 0, composto dos valores das variáveis estudadas na triagem e que proporcionaram melhor área para o pico de formaldeído. Sendo as variáveis t = tempo de agitação (min), $m_{2,4\text{-DNPH}}$ = massa de derivatizante (mg), m_{es} = massa de esmalte (mg) e m_{sal} = massa de sal MgSO_4 (mg). **51**
- Tabela 3:** Íons utilizados para a identificação e quantificação do formaldeído-DNPHo, no modo SIM. **57**
- Tabela 4:** Resultados (área de pico cromatográfico) dos ensaios experimentais do planejamento fatorial completo 2^4 , com três replicatas no ponto central (ensaios 17 a 19), para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha: tempo de agitação (t / min), massa de derivatizante ($m_{2,4\text{-DNPH}}$ / mg), massa de esmalte (m_{es} / mg) e massa de sal (m_{sal} / mg). Os valores em parênteses representam os níveis decodificados. A última coluna corresponde aos valores de área de pico cromatográfico m/z 210 (A) obtidos para cada ponto experimental do planejamento. **63**
- Tabela 5:** Valores dos efeitos e do parâmetro p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento fatorial completo 2^4 para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha. Os valores em negrito são os que se mostraram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$). 1 = t , 2 = $m_{2,4\text{-DNPH}}$, 3 = m_{es} , 4 = m_{sal} . **64**
- Tabela 6:** Tabela ANOVA para o modelo matemático obtido pelo planejamento fatorial 2^4 para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha. FV = Fonte de variação, SQ = soma quadrática, nGL = número de graus de liberdade, F_{calc} = valor do teste F calculado, SG = significativo e p = parâmetro estatístico p . **68**
- Tabela 7:** Resultados (área de pico cromatográfico) dos ensaios experimentais do planejamento composto central, com três replicatas no ponto central (ensaios 25 a 27), para a otimização das condições experimentais do sistema de **70**

extração de formaldeído de esmalte para unha: tempo de agitação (t / min), massa de derivatizante ($m_{2,4\text{-DNPH}}$ / mg), massa de esmalte (m_{es} / mg) e massa de sal (m_{sal} / mg). Os valores em parênteses representam os níveis decodificados. A última coluna corresponde aos valores de área de pico cromatográfico m/z 210 (A) obtido para cada ponto experimental do planejamento.

Tabela 8:	Tabela ANOVA para o modelo matemático obtido pelo planejamento composto central para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha. FV = Fonte de variação, SQ = soma quadrática, nGL = número de graus de liberdade, F_{calc} = valor do teste F calculado, SG = significativo e p = parâmetro estatístico p .	71
Tabela 9:	Condição experimental otimizada para a extração de formaldeído de amostras de esmalte unha.	74
Tabela 10:	Contrastes entre as médias dos coeficientes angulares que não se diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.	78
Tabela 11	Valores do coeficiente de variação (CV) das septuplicatas em dois níveis de concentração para a matriz de esmalte R1.	79
Tabela 12	Valores dos níveis de concentração em % m/m FA-DNPHo determinados para avaliação da recuperação.	80
Tabela 13	Valores dos coeficientes das curvas analíticas das amostras R1, R2, R2, C1, C2, C3 e do padrão de FA-DNPHo em meio de solvente acetonitrila/metanol 7:3, obtidos a partir da dispersão dos dados gerando equações e coeficientes de regressão quadrática c = Intercepto; a = coeficiente quadrático, b = coeficiente angular e valores das concentrações de formaldeído encontradas através das equações nas amostras de esmaltes (C_{amostra}).	81
Tabela 14	Concentração das nove diferentes tipos e coloração das amostras de esmaltes para unha.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ABIHPEC	Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ANOVA	Análise de Variância (do inglês, <i>Analysis of Variance</i>)
CCD	Composto central (do inglês, <i>Central Composite Designs</i>)
CE	Electroforese capilar (do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i>)
C_{2,4-DNPH}	Concentração da solução de 2,4-DNPH (do inglês, <i>Concentration of 2,4-DNPH Solution</i>)
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
CV	Coeficiente de variação (do inglês, <i>Coefficient of Variation</i>)
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (do inglês, <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
2,4-DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina (do inglês, <i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i>)
ECL	Eletroquimioluminescência (do inglês, <i>Electrochemiluminescence</i>)
EI	Impacto de Elétrons (do inglês, <i>Electrons Impacts</i>)
USA	Estados Unidos da America (do inglês, <i>United States of America</i>)
FA	Formaldeído
FA-DNPHo	Formaldeído-2,4-dinitrofenilidrazona
FI	Injeção em Fluxo (do inglês, <i>Flow Injection</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica em chama (do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GC	Cromatografia a gás (do inglês, <i>Gas Chromatograph</i>)
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometer</i>)
HPLC/UV-VIS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria UV- visível (do inglês, <i>Liquid Chromatography High Performance Coupled with Ultraviolet-Visible</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
INCA	Instituto Nacional de Câncer

ID/MS	diluição isotópica por espectrometria de massa (do inglês, <i>Isotope Dilution Mass Spectrometry</i>)
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
INMETRO	Instituto de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LLE	Extração Líquido-Líquido (do inglês, <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LOD	Limite de Detecção (do inglês, <i>Detection Of Limit</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (do inglês, <i>Quantification Of Limit</i>)
MBTH	hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolinona (do inglês, <i>3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone</i>)
m_{esm}	Massa de esmaltes para unha
m_{2,4-DNPH}	Massa de 2,4-DNPH
m_{sal}	Massa do sal MgSO ₄
MS	Espectrômetro de massa (do inglês, <i>Mass Spectrometer</i>)
NTP	Programa Nacional de Toxicologia dos USA (do inglês, <i>National Toxicology Program</i>)
OSHA	Associação de Saúde e Segurança Ocupacional dos EUA (do inglês, <i>Association of Health and the Us Occupational Safety</i>)
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno
PFBHA	2,3,4,5,6-Pentafluoro Benzilo Hidroxilamina Cloridrato
PIB	Produto Interno Bruto
POA	Processo Oxidativo Avançado
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro (do inglês, <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta (do inglês, <i>Response Surface Methodology</i>)
SIM	Monitoramento de íons selecionados (do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>)

SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês, Solid Phase Microextraction)
T	Tempo de agitação
V	Vanádio
ATV	Analisador de Tempo de Vôo
Sb	Antimônio
Cr	Cromo
Mn	Manganês
Pb	Chumbo
CG/DCE	Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1. Formaldeído: utilização <i>versus</i> toxicidade	24
3.1.1. Métodos publicados para a determinação de formaldeído	26
3.2 Cromatografia	29
3.2.1. Cromatografia gasosa	29
3.2.2. Espectrometria de massas	30
3.3. Derivatização	33
3.4. Preparo de amostra	34
3.4.1. Extração QuERChERS	34
3.4.2. Extração em fase sólida	35
3.5. Otimização experimental multivariada	36
3.6. Figuras de mérito	40
3.6.1. Seletividade	40
3.6.2 Curva analítica	41
3.6.3 Precisão	41
3.6.4 Recuperação	41
3.6.5. Limite de detecção	42
3.6.6. Limite de quantificação	43
3.6.7. Efeito matriz	43
4. PARTE EXPERIMENTAL	46
4.1. Reagentes , soluções e amostras	46
4.2. Equipamentos e acessórios	46
4.3 Derivatização com 2,4-Dinitrofenilhidrazina	47
4.4. Hifenamento QuERChERS/SPE	47
4.5. Condições cromatográficas	48
4.6. Planejamento experimental multivariado	49

4.6.1. Triagem -----	49
4.6.2. Superfície de resposta -----	51
4.7. Figuras de mérito-----	52
4.7.1 Seletividade -----	52
4.7.2. Curva analítica -----	52
4.7.3. Faixa de trabalho -----	52
4.7.4. Efeito matriz-----	53
4.7.6. Limite de quantificação e limite de detecção -----	53
4.4.6. Precisão-----	53
4.4.7 Recuperação -----	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES -----	55
5.1. Condições cromatográficas de detecção -----	56
5.2. Extração QuERChERS e clean-up com SPE-----	58
5.3. Planejamento experimental fatorial completo -----	62
5.4. Planejamento composto central-----	68
5.5. Figuras de mérito -----	75
5.5.1. Seletividade -----	75
5.5.2. Efeito de matriz-----	76
5.5.3. Precisão-----	79
5.5.4. Recuperação-----	80
5.5.5. Curva analítica -----	80
5.5.6. Limite de detecção e limite de quantificação-----	82
6. CONCLUSÃO -----	84
REFERÊNCIAS -----	85

1. INTRODUÇÃO

O mercado oferece a cada dia novos produtos de beleza, sendo a indústria de perfumaria e cosméticos um dos setores que mais se destaca no Brasil. Segundo a Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), este setor cresceu 10% em 2015¹. Atualmente, esse mercado nacional é o terceiro maior do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Com um faturamento na ordem de R\$ 40 bilhões, as empresas de cosméticos brasileiras são responsáveis por mais de 1,8% do PIB (Produto Interno Bruto) nacional e representam 9,4% do consumo mundial².

Segundo a Resolução RDC 211, de 14 de julho de 2005 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)³, cosméticos são produtos constituídos por substâncias naturais ou sintéticas, de uso nas diversas partes superficiais do corpo humano como epiderme, unhas, lábios, dentes, cabelos, dentre outras. Podem ter vários objetivos como promover a limpeza, perfumar, proteger e/ou modificar temporariamente, sem ação ou fins terapêuticos³.

Da grande variedade de produtos cosméticos existentes e comercializados, os esmaltes estão entre um dos mais usados no mundo⁴. O Brasil ocupa o segundo lugar na venda desse produto, ficando apenas atrás dos Estados Unidos⁵. Tal fato pode ser justificado pela mídia brasileira, que divulga periodicamente uma variedade enorme de marcas/cores/fórmulas de esmaltes, o que contribui cada vez mais para o aumento do consumo do produto, que já é considerado por muitos, um acessório de moda, podendo combinar com roupas, com a tendência atual ou com o próprio estilo de vida²⁻⁵.

Os esmaltes são substâncias líquidas, aplicados nas unhas, tanto das mãos como dos pés, para uso estético, mas também podem ser usados como produto de proteção. A sua composição consiste em uma mistura de reagentes como solventes, diluentes, agentes formadores de filmes, corantes e pigmentos (sintéticos ou naturais) que, quando aplicados sobre a superfície das unhas, formam uma película plástica brilhante ou fosca pela evaporação dos solventes, criando uma camada protetora contra agressões externas^{6,7}.

Destaca-se que os rótulos desses produtos, no geral, são incompletos, ilegíveis e muitas vezes não relatam a presença de compostos potencialmente tóxicos em sua composição, como é caso do formaldeído. Isto se torna um

agravante frente a ampla utilização deste cosmético pela população, que pode estar sendo expostas a concentrações de formaldeído consideradas críticas por órgãos competentes, além de que tal concentração pode ser cumulativa, devido à alta frequência do uso desse tipo de produto⁴⁻⁸. Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de procedimentos para a determinação deste composto em amostras de esmalte.

Uma das etapas cruciais para avaliação do formaldeído é realização de reações de derivatização. Essas reações modificam os grupos funcionais deste composto, melhoram a sua estabilidade, possibilitando sua detecção e, conseqüentemente sua quantificação por técnicas cromatográficas. Portanto, metodologias de derivatização e a posterior extração de formaldeído em amostras de esmaltes para unha, que apresentam uma matriz complexa, são indispensáveis para a quantificação correta desta substância^{9,10}.

Existem vários procedimentos de extração de formaldeído para os diferentes tipos de amostras, no entanto é inexistente até o presente momento o uso de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) para extração de formaldeído derivatizado. O QuEChERS^{11,12} é um método de extração relativamente novo, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Uma das etapas do QuEChERS consiste no clean-up^{11,12}, que tem como objetivo a remoção de substâncias indesejadas, para que na sequência possa se realizar a análise por cromatografia. Para essa função, destaca-se a extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de fase sólida com propriedades específicas, que melhor removam interferentes de matrizes. Assim, o QuEChERS/SPE poderá ser aplicado na extração de formaldeído previamente derivatizado em amostras de esmalte para unha, para posterior quantificação por GC/MS.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um método de fácil aplicação e baixo gasto de reagentes, para a extração de formaldeído e quantificação por GC/MS com o auxílio de métodos experimentais de otimização multivariada, em matrizes de esmalte para unha

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar o procedimento de preparo das amostras de esmaltes utilizando a técnica de derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), extração QuERCHERS e clean-up em fase sólida.
- Validar o método analítico para análise do formaldeído por GC/MS.
- Avaliar a concentração de formaldeído em algumas amostras de esmalte de unha comercializada na região de Ouro Preto/MG e João Monlevade/MG.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Formaldeído: utilização *versus* toxicidade

O formaldeído, cujo nome popular é formol, é um composto carbonílico, classificado como o aldeído mais simples, possui fórmula molecular H_2CO , densidade igual à $1,081 \text{ g.cm}^{-3}$ e massa molecular $30,03 \text{ g.mol}^{-1}$. Nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP), é encontrado no estado gasoso, sendo incolor e inflamável^{13,14}. Apresenta odor irritante, é solúvel na maior parte dos solventes orgânicos e bastante solúvel em água¹³. Pode ser produzido por oxidação do metanol com o ar, na presença de um catalizador.

As características químicas deste composto, em especial a sua reatividade e ação bactericida e germicida, tornam a sua utilização muito diversificada e um produto importante para a economia global¹⁵. Além do citado, possui aplicação tanto na área médica (medicina, laboratórios, hospitais) como em diversos setores industriais, como a construção civil, madeireiras, fábrica de tecidos, conservante no ramo alimentar e de cosméticos, entre outros^{15,16}.

Na indústria de cosméticos, o formaldeído está presente na formulação de shampoos, cremes de cabelo, desodorantes, produtos de banho, cremes e loções para pele. Pode ser encontrado também em máscaras e maquiagens para os olhos, refrescantes bucais, removedores de cutículas, esmaltes, endurecedores de unha, e outros¹⁷⁻¹⁹.

No entanto, na exposição dérmica, o formaldeído é absorvido pela pele e mucosas, sendo rapidamente metabolizado, reagindo com o ácido clorídrico ou outros cloretos inorgânicos para formar éter bis(clorometílico), substância que apresenta propriedades cancerígenas para o homem^{19,20}. Tal fato resulta em dermatites de contato, podendo ter aparecimento breve ou após vários anos. Essa substância também apresenta propriedades corrosivas quando ingerido, ocasionando lesão na mucosa gástrica. Desta forma ele é classificado por diversas agências e órgãos de controle tais como: (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC)²⁰, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)¹⁶, Associação de Saúde e Segurança Ocupacional dos EUA (Estados Unidos da America) (Osha)²¹ e Programa Nacional de Toxicologia dos USA (National Toxicology Program) (NTP)²² como carcinógeno humano, podendo apresentar

atividade mutagênica/teratogênica e/ou efeitos ao sistema endócrino do ser humano^{13,17,19}.

A problemática em relação a este composto é tão agravante que no Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu a Resolução nº 162, de 2001, na área da indústria de produtos cosméticos, que tem por intuito restringir o uso do formaldeído apenas como matéria prima (agente conservante) nos diversos produtos de higiene/cosméticos, estabelecendo uma concentração máxima de 0,2%. Em 2013 criou-se outra Resolução de nº 15, complementar a Resolução nº 162, que estabelece que o produto cosmético que contém formaldeído, somente deverá constar a presença do mesmo em seus rótulos, quando presente em concentrações superiores a 0,05% de formaldeído no produto final^{23,24}.

A ANVISA também restringiu o uso do formaldeído especificamente nos cremes de alisantes de cabelo (produto usado nas chamadas “escovas progressivas”), desde 17 de junho de 2009, publicada na Resolução RDC 36 (Diário Oficial da União, 2012)^{3,17,18}. Esta resolução (uso permitido apenas como conservante a uma concentração de 0,2%) foi elaborada principalmente devido a relatos de vários problemas de intoxicação pelo formaldeído por parte de usuários brasileiros¹⁶⁻¹⁸.

Os órgãos de controle têm focado o problema do formaldeído principalmente para os cremes de cabelo. Mas o uso do esmalte contendo esta substância pode ser tão ou mais agravante que nos cremes alisantes, em vista do uso por uma parte maior da população e com mais frequência^{7,8}. Além disto, as mulheres que costumam usar este produto o fazem em média, semanalmente, e assim a exposição ao formaldeído, pode se tornar igual, ou maior, que em comparação à exposição ao formaldeído em alisamentos (que em média é feita a cada 3 ou 4 meses)⁶⁻⁸.

Devido à presença de formaldeído na maior parte dos esmaltes encontrados no comércio em geral e à falta de informação acessível aos consumidores (rótulos no geral são ilegíveis)^{6,7}, é necessário o desenvolvimento de metodologias capazes de avaliar a concentração desta substância, verificando se está de acordo com a normatização existente e assim poder se informar/orientar tanto o público consumidor desses produtos quanto as agências regulamentadoras^{3,4}.

Diante dos problemas ocasionados pela presença do formaldeído no organismo humano, encontram-se na literatura alguns trabalhos referentes à determinação desta substância em diferentes tipos de amostras. A seguir são listados alguns trabalhos recentes, citando alguns tipos de metodologias e procedimentos para a determinação dessa substância.

3.1.1. Métodos publicados para a determinação de formaldeído

No ano de 2004, RIVERO & TOPIWALA²⁵, em um estudo para a análise de formaldeído em produtos cosméticos (shampo, creme de cabelo, maquiagem, esmalte, etc), utilizaram como preparo de amostra o método de microextração em fase sólida (SPME). O formaldeído presente na amostra foi derivatizado in situ com hidrazina pentafluorofenilo e analisado no cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS). O método forneceu desvios padrão relativos (RSD) inferiores a 10% e recuperações entre 89,00 e 101,23%. O limite de detecção (LOD) foi de 0,39 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Esses parâmetros, em comparação com outras técnicas, mostraram que o método aplicado é simples, rápido e confiável para a análise de formaldeído nos produtos cosméticos citados acima²⁵.

BIANCHI et al. em 2005²⁶ analisaram o teor de formaldeído em 12 tipos diferentes de peixes, sendo eles de água doce e água salgada. A metodologia adotada foi baseada em uma microextração em fase sólida utilizando uma fibra de poldimetilsiloxano, 75 μm de espessura, e que continha o derivatizante cloridrato de pentafluorobenzilohidroxilamina. O método proporcionou LOD de 28 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, precisão de 9,7% e recuperação média de 94,8%. Esses parâmetros mostraram então a boa eficiência do método adotado²⁶.

Um estudo com o objetivo de desenvolver um método para a quantificação da formação de formaldeído em um processo oxidativo avançado (POA) em águas residuais destinadas para reutilização, foi proposto por TRENHOLM et al.²⁷, no ano de 2008. Esse método se baseou em microextração em fase sólida com a fibra de poldimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) de espessura 65 μm contendo o derivatizante 2,3,4,5,6-pentafluorobenzilohidroxilamina cloridrato (PFBHA). Após a extração, a fibra era colocada no injetor do GC/MS para análise. O método resultou em LOD de 3,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e precisão em 23% de RSD. Com esses resultados, este

método se mostrou eficiente para a quantificação de formaldeído em amostras de água²⁷.

No ano de 2009, CHEN et al.²⁸ estudaram um método para a determinação de formaldeído em produtos utilizados em meios aquáticos. Na técnica desenvolvida o formaldeído foi extraído com água, em seguida, a solução foi transferida para um reservatório que continha o derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina. A solução foi então levada para análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por ultravioleta-visível (HPLC/UV-Vis) a 352 nm. A técnica forneceu LOD de 0,27 mg Kg⁻¹, a precisão expressa como RSD foi de 3,5% e recuperações no intervalo de 70,0% - 105,0%. Os resultados mostraram a eficiência deste método na determinação de formaldeído com pouco consumo de amostras e reagentes, quando comparados a outros métodos existentes na literatura²⁸.

LAVILLA et al. em 2010²⁹ desenvolveram um novo método para a determinação de formaldeído em produtos cosméticos à base de água, tais como shampo, condicionador e gel. Este método fez a microextração utilizando um sistema trifásico que se baseava em um sistema composto da amostra de cosmético, sem qualquer pré-tratamento (uma emulsão), a fase aquosa com reagentes para derivatização e o solvente orgânico como fase extratora. O trabalho resultou em LOD de 0,02 µg.g⁻¹ e RSD de 5,9%. Esses dados mostraram uma melhoria importante na quantificação de formaldeído em produtos cosméticos à base de água²⁹.

Um método que utilizou a microextração líquido-líquido foi proposto por XU et al., em 2011³⁰, para a derivatização in situ com 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) com extração e pré-concentração de formaldeído em amostras de bebidas e posterior determinação por HPLC/UV-Vis. Vários parâmetros foram avaliados para comprovar a eficiência do método. As recuperações de formaldeído foram obtidas no intervalo de 84,9 a 95,1% e apresentaram RSD inferiores a 8,4% e LOD de 0,12 ng mL⁻¹. Com os resultados observou-se que o método adotado mostrou-se eficiente para a determinação de formaldeído em amostras de bebidas³⁰.

No ano de 2012, DENG et al.³¹, desenvolveram um método para a determinação e monitoramento de formaldeído no ar em tempo real. O método foi considerado novo, pois a reação de derivatização do formaldeído in situ com sulfato de amônio para ser monitorado no ar utilizando eletroforese capilar de

eletroquimioluminescência não havia sido relatada antes. O trabalho obteve LOD de $0,15 \mu\text{g m}^{-3}$ e RSD entre 0,9%. As recuperações obtidas de formaldeído variaram entre 99,3% e 101%. Por se tratar de um método novo, pode-se dizer com os resultados, que ele pode ser adotado para a análise de formaldeído no ar³¹.

Um trabalho realizado por SILVEIRA, et al. em 2015³², estudou a avaliação de formaldeído em amostras de ar em ambientes fechados. O estudo avaliou o desempenho de três diferentes métodos colorimétricos, MBTH (hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolinona), acetilacetona (acetilacetona solução / amoníaco) e solução de 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole / solução de hidróxido de sódio. Os parâmetros analíticos, tais como a estabilidade da cor do produto formado, a eficiência da amostragem e condições de reação foram comparadas para as metodologias. Foram analisados os parâmetros de validação do método, para os três métodos colorimétricos, sendo eles seletividade, linearidade, precisão, precisão intermediária, LOD, LOQ e estabilidade do cromóforo formado. O método MBTH mostrou melhores resultados, sendo o coeficiente de correlação (r) = 0,9996; LOD (mg L^{-1}) de 0,02 (mg L^{-1}); LOQ (mg L^{-1}) de 0,06; desvio padrão da resposta de 0,932 %; precisão (CV%) de 0,67 e precisão intermediária (CV%) de 0,77, tendo sido o utilizado para a determinação de formaldeídos em ambientes interiores³².

Um recente trabalho publicado por LOBO, et al., em 2015³³, foi baseado no desenvolvimento de um método analítico para a determinação de formaldeído em amostras de cremes alisantes de cabelo por GC/MS. O método baseou-se na solubilização das amostras e adição de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) em acetonitrila e injeção direta das amostras preparadas. Com esse procedimento obteve LOD de $0,0165 \text{ mg L}^{-1}$. Deste modo o método desenvolvido obteve resultados satisfatórios na determinação formaldeído em cremes de alisamento capilar³³.

Pode-se observar um relativo número de trabalhos encontrados na literatura, envolvendo a determinação de formaldeído em diferentes amostras. A maior parte dos trabalhos usa a técnica de cromatografia para tais estudos. Assim, torna-se interessante utilizar tal técnica para a análise de formaldeído em amostras de esmalte para unha.

3.2 Cromatografia

A cromatografia constitui um conjunto de técnicas de separação que pode ser aplicada em diversas áreas do conhecimento nas quais a análise qualitativa e/ou quantitativa de espécies químicas orgânicas são realizadas³⁴.

O processo cromatográfico consiste na passagem de uma fase móvel sobre uma fase estacionária, em que ocorre distribuição dos componentes da mistura entre as duas fases, de tal forma que cada componente é seletivamente retido pela fase estacionária³⁴⁻³⁶. A fase móvel pode ser encontrada em diferentes formas, sendo a gasosa e a líquida as mais usadas em trabalhos científicos³⁴.

3.2.1. Cromatografia gasosa

Na cromatografia gasosa, uma pequena quantidade de amostra é injetada no topo de uma coluna cromatográfica através de uma válvula de injeção, onde é vaporizada e arrastada pela fase móvel através da coluna até o detector. A fase móvel é o próprio gás de arraste (não interage com a amostra) que é bombeado sob alta pressão a uma vazão controlada, sendo a sua única função o transporte através da coluna³⁴. Esta técnica é muito utilizada para análises de misturas cujos constituintes são termicamente estáveis e possam ser volatilizados, e tenham pontos de ebulição de até 300 °C^{34, 36}.

Esse tipo de cromatografia apresenta diversas vantagens, destacando-se: rapidez, eficiência de detecção/quantificação, sensibilidade, acoplamento ao espectrômetro de massas, alta precisão, uso de pequena quantidade de amostras e confiabilidade³⁵.

Atualmente, a cromatografia gasosa é amplamente utilizada e as amostras que são analisadas por esta técnica necessitam de técnicas de preparo de amostras, pois esta etapa permite a melhoria na determinação dos componentes, elimina impurezas e interferentes das amostras³⁶ e garantem também o não comprometimento do equipamento. Comumente, a etapa de preparo de amostras para análise cromatográfica envolve técnicas como a extração do analito desejado e/ou a transformação deste analito em um composto adequado ao sistema de separação e detecção (derivatização)⁹.

Além disto, a cromatografia pertence à área de técnicas de separação, devido ao seu alto poder de separação dos componentes das misturas, assim ela é

hifenada a técnicas de detecção dos analitos separados, principalmente à técnicas espectroscópicas, como a espectrometria de massas³⁴⁻³⁶.

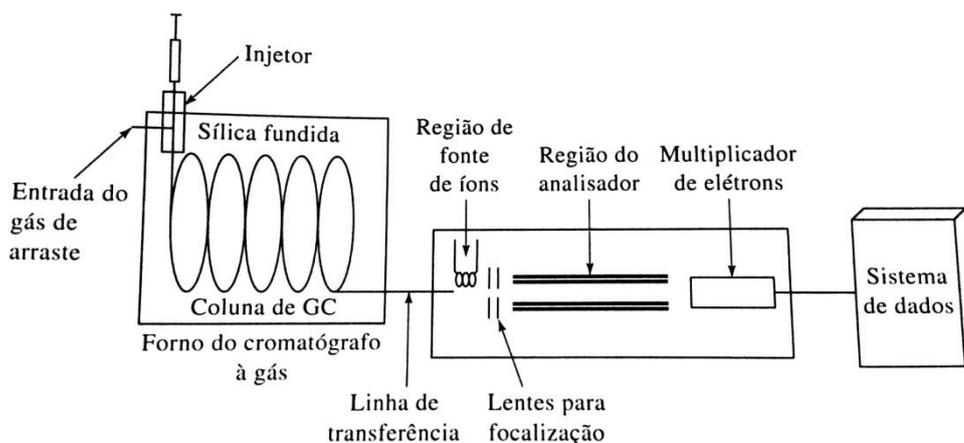
3.2.2. Espectrometria de massas

A detecção por espectrometria de massas (MS) é feita mais comumente por uma fonte de ionização de impactos por elétrons (EI), a qual emprega um filamento aquecido para gerar elétrons com energia suficiente para provocar a ionização dos analitos de interesse. Assim os íons formados nesse processo são direcionados para o analisador onde são aceleradas por um campo elétrico, cuja função é separar de acordo com sua relação massa/carga (m/z)³⁴⁻³⁶.

Um espectrômetro de massas é constituído de unidades fundamentais como: uma fonte de ionização, um analisador e um detector, sendo o analisador também conhecido como filtro de massas. É nos analisadores de massas que ocorre à separação dos íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z ³⁷.

Seu acoplamento com o cromatógrafo a gás (GC) se dá pela interface direta, sendo a saída da coluna ligada diretamente à câmara de ionização do espectrômetro de massas³⁷. O esquema de um sistema típico está representado na Figura 1.

Figura 1: Esquema de um cromatógrafo a gás de coluna capilar, acoplado com um espectrômetro de massas.



Fonte: Skoog, 2010³⁷.

Os instrumentos de cromatografia gasosa/espectrometria de massa têm sido usados na identificação de centenas de compostos, como o formaldeído, presentes em diversas matrizes²⁸⁻³¹.

3.2.2.1. Analisadores de massas

Os analisadores de massas mais comuns e utilizados em cromatografia são: analisadores de tempo de voo, ion-trap e quadrupolo.

a) Analisador de tempo de voo

No analisador de massas de tempo de voo, os íons produzidos na fonte de ionização do espectrômetro são acelerados através de um “tubo de voo” para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a razão m/z de cada íon. Esse espectrômetro de massa tem como princípio, os íons serem acelerados com a mesma energia e suas velocidades serem inversamente proporcionais às raízes quadradas de suas massas. Os íons mais leves e de alta velocidade chegam ao detector antes do que os íons mais pesados e de baixa velocidade³⁶. Este equipamento possui alta sensibilidade, varreduras rápidas (importantes para picos cromatográficos estreitos) e boa resolução, porém exige uma eletrônica bastante sofisticada^{34,35}.

b) Ion-trap

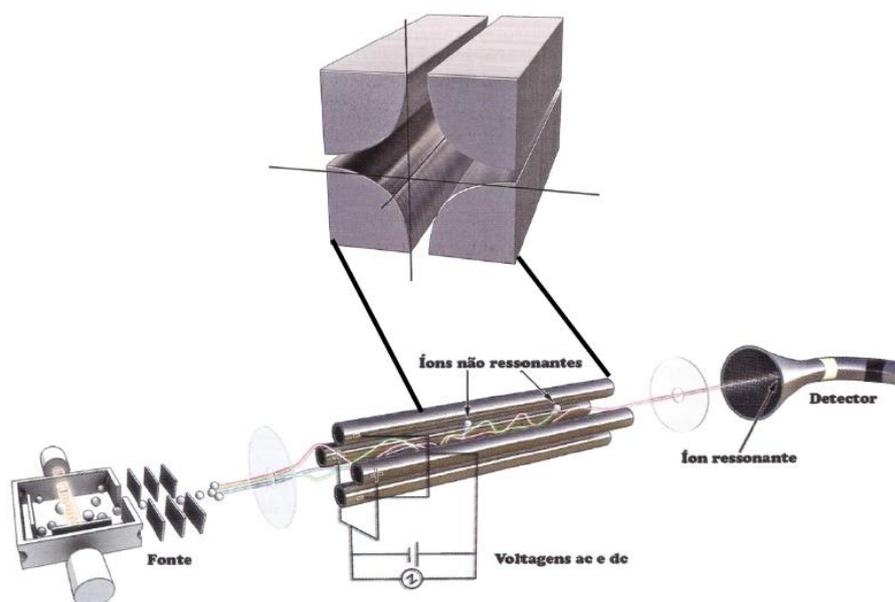
O ion-trap é um quadrupolo tridimensional que funciona acumulando íons no seu interior e esses vão sendo capturados de acordo com a corrente alternada e de radiofrequência que são simultaneamente aplicadas. Essa captura permite a liberação controlada de íons, analisando sua separação controlada e com uma resolução muito grande. É muito utilizado para experimentos, que permitem estudar mecanismos de fragmentação de moléculas relativamente complexas, além de fornecerem espectros com alta sensibilidade^{34,36}.

O íon trap tem seu custo relativamente baixo (comparável ao quadrupolo), é simples, robusto e pequeno. Apresenta alta sensibilidade podendo ser aplicado em análise de íons específicos³⁵.

c) Quadrupolo

O analisador de massas do tipo quadrupolo é constituído de quatro barras cilíndricas orientados em uma disposição quadrada. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro a um potencial negativo; a Figura 2 ilustra esse esquema de um quadrupolo³⁴⁻³⁶. Uma combinação de corrente contínua e radiofrequência é aplicada nas barras e os íons de razões massa/carga específicos atingem o detector sem perturbação, funcionando como um filtro de íons indesejados. Este é um analisador que apresenta taxa de digitalização rápida, sendo o analisador de massas mais utilizado em GC/MS^{35,36}.

Figura 2: Esquema de um analisador de massas do tipo quadrupolo mostrando a trajetória dos íons se dirigindo até o detector.



Fonte: Vieira, 2011³⁶.

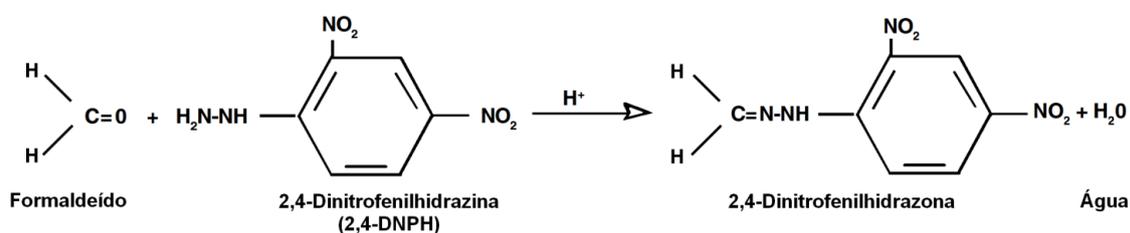
E este é o analisador do equipamento utilizado como técnica analítica deste trabalho. Apesar de ser uma técnica seletiva e robusta, a cromatografia exige a etapa de preparo de amostras, que tem como objetivos: isolar os analitos de interesse e os concentrar e reduzir/eliminar os interferentes originalmente presentes na amostra para facilitar a sua determinação em níveis de traços³⁴⁻³⁷.

3.3. Derivatização

A derivatização é utilizada quando se deseja determinar pela técnica de cromatografia, compostos oxigenados de baixa massa molecular, altamente voláteis e às vezes termicamente instáveis^{9,10}. A técnica transforma uma substância química em outra (um derivatizado) por meio de reação química. O derivatizado obtido possui propriedades diferentes como solubilidade, ponto de ebulição, ponto de fusão e estabilidade térmica. São essas novas propriedades resultantes que facilitam e melhoram o processo de quantificação, separação, entre outros^{9,10}.

A reação de derivatização de aldeídos com 2,4-DNPH é bem descrita e muito utilizada como preparo de amostras para análises por cromatografia gasosa em grande parte dos trabalhos científicos, com estudos focados em compostos carbonílicos^{9,10,39}. Este derivatizante é o mais utilizado por reagir seletivamente com aldeídos e cetonas³⁸. Deste modo, no presente estudo foi realizada reação de derivatização usando a 2,4-DNPH como reagente derivatizante obtendo como produto a 2,4-dinitrofenilhidrazona^{9,10,37-39}. Este é um importante método qualitativo e quantitativo de determinação de compostos carbonílicos em análises por cromatografia, pois a reação de derivatização ocorre facilmente em temperatura ambiente, é altamente específica favorecendo um preparo de amostras mais rápido e minimiza os efeitos de matriz³⁷⁻³⁹. O esquema reacional da 2,4-DNPH com o formaldeído está apresentado na Figura 3.

Figura 3: Reação de derivatização do formaldeído com a 2,4-dinitrofenilhidrazina, onde se obtém como produto uma hidrazona (FA-DNPHo) estável.



De acordo com Veloso, et al. (2001)¹⁰ a formação das hidrazonas (Figura 3) deve ocorrer em meio ácido. Para a acidificação desse meio reacional, encontra-se na literatura o uso de ácido clorídrico, perclórico ou fosfórico. Porém existe a vantagem da utilização dos ácidos perclórico e fosfórico, que é possibilitar a injeção

direta da solução no GC/MS¹⁰. De tal forma, para reduzir as substâncias indesejadas presentes na matriz de esmaltes para unha, que interferem na análise é realizado a etapa de preparo de amostras de esmaltes para a análise de formaldeído derivatizado por GC/MS.

3.4. Preparo de amostra

A etapa de preparo de amostras é uma das etapas mais importantes de uma análise química. A escolha adequada desta etapa é um fator chave na obtenção de resultados confiáveis e exatos. Esta depende da natureza da amostra, da matriz, das características do analito e da técnica analítica que será empregada na sua determinação³⁸.

Vários procedimentos são considerados como técnicas de preparo de amostra e que podem ser aplicados na determinação de formaldeído, entre eles os mais utilizados são a derivatização, a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) e a extração líquido-líquido (LLE)³⁸. A extração QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe)^{11,12}, é um método muito utilizado em trabalhos com matriz complexas^{11,12,39,42-46} que não podem ter análise direta por GC/MS³⁷.

Na literatura é inexistente até o presente momento, o relato de condições ótimas para a derivatização e a extração de formaldeído em amostras de esmalte de unha utilizando o hifenamento QuEChERS/SPE^{39,42-46}.

Desta forma por se tratar de uma amostra com presença de substâncias de difícil remoção, relacionadas à composição dos esmaltes, este método será adotado neste trabalho⁷. Serão abordados a seguir dois procedimentos de preparo de amostra que foram usados no preparo das amostras de esmalte deste estudo.

3.4.1. Extração QuERChERS

Em 2003, Anastassiades, et al. com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de pesticidas denominado QuEChERS. Durante o desenvolvimento de sua metodologia foi dado ênfase a um processo que requeria poucas etapas de manipulação e a obtenção de um

procedimento dinâmico que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório de pesquisa^{11, 12}.

O método baseia-se no uso de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio ($NaCl$) para extração/separação por salting - out dos compostos de interesse. A vantagem da utilização do $MgSO_4$ é devida a sua maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais, reduzindo o volume de fase aquosa⁴³⁻⁴⁵. A sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares⁴³⁻⁴⁵.

A adição de sais para promover o efeito salting - out tem sido utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa⁴³.

Vários trabalhos relatam o uso desta técnica na análise multirresíduo de pesticidas em frutas e vegetais^{11,12,43-45}, que apresentam matrizes com presença de proteínas, lipídeos (ácidos graxos), carboidratos^{11,12,45}, entre outras, entretanto seu uso em amostras com matrizes pouco conhecidas como o esmalte, ainda é desconhecido.

3.4.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) foi introduzida em 1976 e consiste em um método popular de preparo de amostra, utilizado pelos cromatografistas. Por ser uma técnica relativamente simples, apresenta um vasto campo de aplicação para analitos de baixa/média volatilidade⁴⁶.

A SPE consiste basicamente de uma coluna ou cartucho de extração que pode ser de vidro ou de polipropileno. O material sólido contido no interior da coluna é a fase estacionária. Existem diferentes tipos de fases estacionárias (sílica, alumina, Florisil[®], carbono e resina) cuja seleção depende da natureza dos analitos e as quais correspondem diferentes tipos de interação do analito com a fase estacionária^{46,47}.

Seu princípio baseia-se na partição dos compostos entre duas fases (uma sólida e uma líquida) e apresenta dois importantes propósitos: ela permite a limpeza

das amostras (clean-up) e extração e/ou concentração dos analitos. O propósito do clean-up, neste trabalho consistiu na retenção dos analitos na fase sólida para posterior eluição⁴⁶.

Em geral, as etapas do procedimento de extração em fase sólida são: I) condicionamento do sorvente com o solvente adequado; II) introdução da amostra, para adsorção do analito; III) eluição do analito e posterior análise do composto de interesse⁴⁶⁻⁴⁸.

Existem vários procedimentos de tratamento de amostras por SPE, que variam no emprego de diferentes tipos de solventes, volume de amostra e de solvente para a ativação de eluição dos analitos⁴⁶. Esta é uma técnica que vem mostrando grandes vantagens quando se trabalha com matrizes não aquosas, servindo como uma ferramenta a ser adotada nas análises de formaldeído em amostras de esmaltes⁴⁶⁻⁵⁰.

No entanto, o desenvolvimento de um método analítico, envolve vários parâmetros e variáveis, muitas vezes difíceis de serem avaliados corretamente de forma univariada. Neste contexto, o uso de ferramentas estatísticas multivariadas torna-se interessante para um entendimento mais completo/profundo de certos sistemas e suas respostas.

3.5. Otimização experimental multivariada

Atualmente a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência, incluindo a química analítica, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem respostas de forma mais rápida⁵¹. Neste contexto, a aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância, principalmente para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema.

O planejamento para um experimento pode ser do tipo multivariado, em que todos os experimentos são feitos antes da análise dos resultados, e do tipo univariada, em que o resultado do experimento anterior determina as condições a serem usadas no experimento seguinte⁵¹⁻⁵⁴.

As principais desvantagens da análise univariada são o grande número de ensaios necessários para otimização e a falta de informações acerca das interações entre a variável em estudo e as demais variáveis que afetam o sistema. Técnicas

envolvendo otimização multivariada estão sendo preferencialmente aplicadas em procedimentos analíticos por permitirem otimizar simultaneamente todas as variáveis com reduzido número de experimentos e ainda fornecerem dados acerca da interação entre as variáveis^{51,52}.

Entre as ferramentas estatísticas multivariadas, o planejamento fatorial completo é bastante empregado para avaliar a significância de variáveis na etapa de triagem. O número de experimentos requeridos para este planejamento é calculado como $N = 2^k$, onde k é o número de variáveis e para garantir melhor ajuste do erro estatístico, podem-se usar pontos centrais, no caso três replicatas, por exemplo, resulta-se em $N = 2^k + 3$ experimentos⁵³.

Na etapa para a construção de uma RSM (Metodologia de Superfície de Resposta), o planejamento composto central e é uma ferramenta estatística multivariada bastante utilizada. A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado, e conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização⁵¹⁻⁵⁵.

A otimização multivariada vem sido muito utilizada em trabalhos que desenvolvem e validam novos métodos, sendo muito utilizada em matrizes complexas e que necessitam de etapas de preparo de amostras. Encontra-se na literatura, vários trabalhos que estudam a otimização multivariada e a validação de métodos para determinação de diversas substâncias em diferentes tipos de amostras.

Em 2008, BIANCHIN, et al⁵¹. desenvolveram um método para determinação de Ni(II) em amostras de água usando a extração em fase sólida (SPE), utilizando o adsorvente sílica gel modificada com óxido de nióbio(V), em um sistema por injeção em fluxo (FI) e detecção por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). As variáveis químicas e de fluxo do sistema em linha foram otimizadas usando planejamento fatorial completo com triplicatas no ponto central ($N = 2k + 3$) avaliando absorvância integrada, sendo as condições otimizadas do sistema FAAS: volume de amostra de 10 mL e concentração de Ni(II) de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Após a otimização avaliou-se os parâmetros analíticos de mérito: faixa linear de trabalho estudada de $5-100 \mu\text{g L}^{-1}$; coeficiente de correlação (R) de 0.9999; RSD de 1,5% (35

$\mu\text{g L}^{-1}$, $n = 7$); LOD de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$; LOQ de $2,7 \mu\text{g L}^{-1}$ e valores de recuperação foram na faixa de 100,2 a 103,8%⁵¹.

FABRINO em 2008⁵⁶, desenvolveu métodos para determinação direta de V, Sb, Cr e Mn em soro humano e de Pb em sangue humano, com a utilização da técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. A otimização dos parâmetros de análise foi realizada através de otimização multivariada, que consistiu em um experimento para triagem de variáveis (planejamento fatorial completo ou fracionário) seguido de uma metodologia de superfície de resposta (planejamento composto central (CCD) ou Doehlert). O método foi validado resultando em LODs de 1,4; 1,0; 0,3; 0,2 e $2,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para os metais V, Sb, Cr, Mn e Pb, respectivamente. Bons resultados de exatidão e precisão foram obtidos⁵⁶.

Em 2012, VALESE⁵⁷, desenvolveu um método rápido para análise simultânea de fenilalanina (Phe), triptofano (Trp), histidina (His) e tirosina (Tyr) em amostras de cereais utilizando cromatografia eletrocínética micelar. As variáveis: composição do eletrólito de corrida e avaliação dos demais parâmetros instrumentais inerentes à técnica para determinação dos aminoácidos aromáticos foram otimizados, fazendo o uso de planejamentos fatoriais fracionário e completo. O eletrólito de corrida otimizado consistiu de 30 mmol L^{-1} de H_3PO_4 ; 100 mmol L^{-1} de SDS e 25% (v/v) de MeOH, com tempo de análise inferior a 2,5 minutos para a separação dos quatro aminoácidos. Após a otimização o método foi validado, apresentando curvas de calibração com bom ajuste ao modelo linear nos níveis de concentração de 2,5-17,5; 10,1-40,4; 10,8-43,2 e 2,65-18,55 mg L^{-1} para o Trp, Phe, His e Tyr, respectivamente, LOD de 0,5; 1,0; 2,5 e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$; LOQ de 1,75; 3,0; 7,0 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o Trp, Phe, His e Tyr, respectivamente, recuperação de 80-110% para a Phe, Hist e Tyr; o desvio padrão relativo (RSD) (%) para a precisão inter e intra-ensaio foram inferiores a 6,8% e 0,6%. Portanto o procedimento proposto foi adequado para a validação intra-laboratorial do método desenvolvido para determinação de fenilalanina, histidina e tirosina em amostras de cereais⁵⁷.

ÁVILA⁵⁸, et al. em 2014 otimizaram e validaram o método os principais parâmetros da extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) para a determinação dos agrotóxicos bifentrina e deltametrina, em arroz armazenado, por cromatografia gasosa (CG/DCE). As melhores condições para a ESL/PBT foram otimizadas multivariadamente através da realização de um ensaio

experimental com base em um planejamento fatorial completo 2⁴, obtendo como condições otimizadas para a respostas de extração com o uso de 4,0 mL de acetonitrila como solvente extrator, 2 mL de água, 1 min de agitação e 6 h de refrigeração. O método otimizado foi validado apresentando coeficiente de determinação (R²) de 0,9941 e 0,9978A para bifentrina quanto para deltametrina, respectivamente. Os LOQs foram de 0,08 e 0,021 mg kg⁻¹ para bifentrina e deltametrina, respectivamente. A precisão variou entre 2,79 a 14,04% e a taxa de recuperação entre 98,04 a 105%⁵⁸.

OLIVEIRA em 2016⁵⁹ desenvolveu e validou métodos de determinação de boro, enxofre, fósforo e molibdênio em fertilizante mineral e enxofre elementar em formulação comercial, por ICP-OES. As condições de preparação das amostras foram otimizadas mediante metodologia multivariada, utilizando-se matriz Doehlert, obtendo condições consideradas ótimas, pela mesma abordagem multivariada, para a potência do plasma, pressão do gás de nebulização e vazão da solução da amostra nas determinações por ICP-OES foram 1,50 kW, 180 kPa e 2,4 mL min⁻¹, respectivamente. O método mostrou-se seletivo, exceto para a interferência do cobre no sinal do fósforo (213,618 nm) e do citrato neutro de amônio (CNA) para todos os elementos. Foi validado com obtenção de curvas analíticas com boa linearidade, normalidade, homocedasticidade dos resíduos e inexistência de auto correlação, LOQs de 0,042% (m/m) de enxofre, 0,030% (m/m) de boro; 0,010% (m/m) de fósforo, medido em 213,618 nm e 0,118% (m/m) de fósforo, medido em 213,547 nm; 0,0050% (m/m), RSD de 7,1% para o boro; 4,3% para o enxofre; 7,6% para o molibdênio; 7,4% para o fósforo medido em 213,618 nm e 7,8% quando medido em 213,547 nm⁵⁹.

Pode-se observar um relativo número de trabalhos encontrados na literatura, envolvendo o estudo de otimização multivariado no desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos em diferentes amostras. Desta forma, observa-se a importância dessas ferramentas estatísticas quando aplicadas para um melhor desenvolvimento e validação de novos métodos.

Portanto a otimização multivariada foi aplicada para o processo de desenvolvimento e validação de um método de derivatização e extração pelo sistema hifenado de QuEChERS /SPE para determinação de formaldeído em

esmaltes para unha por GC/MS, definindo assim as melhores condições experimentais do preparo de amostra.

3.6. Figuras de mérito

A fim de garantir a qualidade necessária aos resultados analíticos, os métodos de análises devem ser validados de acordo com procedimentos bem definidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados⁶⁰.

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Portanto o bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento^{60,61}.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação. Um processo de validação bem definido é aquele que atende as exigências oferecidas pelas agências reguladoras e apresenta sistemas adequados para o uso desejado⁶⁰.

As figuras analíticas de méritos (faixa de trabalho, seletividade, precisão, recuperação, efeito de matriz, curva analítica, e LOD e LOQ,) foram avaliadas seguindo protocolo de orientação para validação de métodos analíticos, descritos pela ANVISA⁶² e INMETRO⁶³. E essas orientações normalmente são indicadoras quantitativas do escopo e de um bom desempenho das técnicas e são utilizadas para avaliação dos métodos⁶⁴⁻⁶⁶.

3.6.1. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar os componentes de matriz que interferem na determinação do analito de interesse. Ela garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse⁶⁴. A seletividade pode ser obtida de duas maneiras.

A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz que não contém a substância de interesse com uma matriz fortificada com essa substância, sendo assim, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito de

interesse, apresentando picos bem resolvidos, para poder ser distinguido dos picos dos demais compostos presentes na amostra. Outra maneira é através da avaliação do uso de detectores que tem a capacidade de comparar os espectros do pico obtido na separação com o de um padrão⁶⁷.

3.6.2 Curva analítica

A curva analítica de um método é descrita por uma equação matemática. Esta apresenta o sinal analítico, denominado variável dependente y_i , proporcional à sua concentração, denominada variável independente x_i e um ajuste ideal quando seu coeficiente de determinação fornece valores $R^2 > 0,99$. Desta forma, ela proporciona a correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e concentração da espécie a ser quantificada⁶⁷.

3.6.3 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados obtidos sob condições especificadas entre as medições realizadas no método. Pode ser avaliada em condições de repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária, sendo expressa na forma de coeficiente de variação (CV) ou RSD⁶²⁻⁶⁷.

A avaliação na forma de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade estão relacionadas com a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método. Na repetitividade o experimento é efetuado sob as mesmas condições de ensaio experimental (material analisado, laboratório, analista, equipamento e amostras analisadas simultaneamente), chamadas condições de repetitividade⁶⁴. Na precisão intermediária dentre as condições experimentais do método, é analisado a concordância entre as medições em diferentes intervalos de tempo (dias e horas). E na reprodutibilidade refere-se ao grau de concordância entre os resultados das medições efetuadas em condições experimentais diferentes como: Laboratório, analista, equipamento e intervalo de tempo de análises^{64,65}.

3.6.4 Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na amostra, que é

extraída e quantificada. O procedimento de recuperação apresenta limitações, relacionados ao comportamento do analito e a sua interação com a matriz da amostra. Tal fato demonstra que outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância. Desta forma efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados^{64,65}.

Portanto, é importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, como exemplo recuperação de matrizes complexas, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Desta forma, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, assim a recuperação analítica pode ser definida como mostrado na Equação 1⁶²⁻⁶⁷:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

o valor observado é a concentração obtida pela resposta analítica e o valor esperado é o valor referente a concentração em que se está analisando a recuperação. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de recuperação geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Esses valores dependem da complexidade da amostra e da concentração do analito⁶⁷.

3.6.5. Limite de detecção

O LOD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental⁶⁴.

O LOD pode ser baseado em parâmetros da curva analítica, como apresenta a Equação 2,

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica^{64,65}.

3.6.6. Limite de quantificação

O LOQ representa a menor concentração do analito de interesse em uma determinada matriz, que pode ser determinada em níveis considerados aceitáveis de exatidão e precisão utilizando um determinado procedimento experimental^{64,63}.

O LOQ pode ser calculado utilizando a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), a partir da Equação 3:

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 3})$$

Em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, tanto o LOD quanto o LOQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. O melhor caminho para resolver este problema do cálculo, é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável⁶³.

3.6.7. Efeito matriz

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é uma técnica altamente seletiva. No modo de monitoramento de íons selecionados, somente os sinais de interesse são registrados, deixando de fora as informações sobre a ocorrência de todos os outros compostos da matriz. De certa forma, isto pode dar a falsa ideia de que as outras substâncias que coeluem com o analito não interferem nos resultados⁶⁴⁻⁶⁷. No entanto, essas substâncias, embora invisíveis para o espectrômetro de massas, podem interferir no processo de ionização dos analitos de interesse⁶⁴ apresentando o fenômeno conhecido como efeito de matriz e/ou superposição de matriz. E estes são dependentes das propriedades físico-químicas e das características dos componentes da matriz (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, pressão de vapor, etc)⁶⁴⁻⁶⁶.

Dentre os diversos métodos empregados para minimizar o efeito de matriz e a superposição da mesma, a limpeza dos extratos (clean-up) é um método eficiente na remoção de interferentes da matriz e muito utilizado para tais finalidades. A redução do volume de injeção e/ou diluição da amostra são abordagens que também contribuem para o menor efeito da matriz sobre o sinal do analito, no entanto podem não ser adequadas devido a sensibilidade instrumental. Outras possibilidades para minimizar os efeitos da matriz são a avaliação da preparação da amostra e/ou a otimização dos parâmetros cromatográficos⁶⁶. Este efeito pode influenciar o sinal do detector, levando à superestimação do resultado, e isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção do analito de interesse. De tal forma também pode ocorrer extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal do analito é diminuído gerando uma subestimação do resultado^{66,67}.

A supressão ou aumento do sinal de um analito causado por um composto da matriz ocorre na fonte de ionização o que, a princípio, é impossível de compensar no espectrômetro de massas, e este é denominado superposição de matriz. Para corrigir este efeito é comum a utilização de padrões internos de analitos marcados com isótopos estáveis (por exemplo, ¹⁵N, ¹³C, ¹⁷O ou ²H). Por outro lado, o alto custo e a indisponibilidade desses padrões, muitas vezes, inviabilizam esse tipo de tratamento utilizado para compensar a alteração no sinal^{67,69,70}.

Uma alternativa é a construção de curva analítica numa matriz semelhante a da amostra (ou na própria amostra), e teoricamente, isenta do analito. Essa é uma análise que verifica se a matriz interfere no sinal analítico do composto de interesse. Por uma análise estatística dos valores das inclinações, verifica-se se ocorre ou não efeito da matriz. É muito utilizada para casos que não se tem padrão interno e/ou uma matriz de composição complexa, com substâncias de difícil remoção⁷⁰⁻⁷⁵.

A análise do efeito da matriz por testes estatísticos (analisando a diferença entre os coeficientes angulares das curvas de diferentes matrizes) pode ser feito com o teste de Tukey. O teste de Tukey é baseado na amplitude total studentizada ("studentized range", em inglês) e pode ser utilizado para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos^{76,77}.

O teste é exato e de uso muito simples quando o número de repetições é o mesmo para todos os tratamentos. O teste baseia-se na Diferença Mínima Significativa (DMS) Δ . A estatística do teste é dada da seguinte forma:

$$\Delta = q \sqrt{\frac{QMRes}{r}} \quad (\text{Equação 4})$$

q é a amplitude total studentizada, tabelada, QMRes é o quadrado médio do resíduo da análise da variância, e r é o número de repetições de cada um do tratamentos. O valor de q depende do número de tratamentos e do número de graus de liberdade do resíduo. Também, em um teste de comparações de médias, deve-se determinar um nível de significância α para o teste. Normalmente, utiliza-se o nível de 5% ou 1% de significância^{76,77}.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes , soluções e amostras

Os reagentes utilizados foram 2,4-dinitrofenilhidrazina (Merck); acetona (Nuclear); acetonitrila de alta pureza (Sigma-Aldrich); álcool metílico (Sigma-Aldrich); ácido fosfórico (H_2PO_4) (FMaia); formaldeído 37% (Sigma-Aldrich); gás hélio 99,999% (White Martins) e hexano (Vetec).

As amostras de esmaltes foram adquiridas no comércio local das cidades de João Monlevade/MG e Ouro Preto/MG. Foram compradas quinze diferentes amostras de esmaltes para unhas nas quais seis destas amostras são consideradas e vendidas como hipoalergênicas (teoricamente, isentas de formaldeído) e foram identificadas como R (R1, R2, R3) e C (C1, C2 e C3). A distinção de grupos diferentes em R e C se deve ao fato de cada grupo corresponde a uma marca específica, e, portanto R e C são de marcas distintas. As outras nove amostras são não hipoalergênicas (podem conter formaldeído) e foram identificadas como A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 e A9. Entre as amostras identificadas como A, estão diferentes tipos (cremoso, perolado e cintilante), tonalidades e marcas populares de fabricantes distintos.

As misturas de solventes acetonitrila/metanol e acetonitrila/hexano, as soluções de derivatizantes, e a solução de formaldeído 37%, foram armazenadas em frascos âmbar e em locais de pouca luminosidade. Os vial que continha as amostras eram armazenados em recipientes embrulados com papel alumínio, para eliminar qualquer entrada de luminosidade e refrigerados para evitar a perda pela evaporação.

4.2. Equipamentos e acessórios

Os instrumentos utilizados foram: balança analítica Marte-AY 220 (precisão de 0,00001g); centrífuga, Z 206 A, Hermle Labortechnik GmbH; cromatógrafo a gás com detecção por espectrometria de massas (GC/MS-QP2010 Plus, Shimadzu); espátula de alumínio; filtro cartucho SPE Strata[®] Florisil[®] (Phenomenex[®]); mesa agitadora (Globo TRADE); pipetas volumétricas automáticas de vários volumes (Digipet); ponteiros de polietileno descartáveis; recipientes

âmbares para a armazenagem das amostras e vidrarias em geral; tubo para centrífuga de polipropileno de 13,00 mL (Trp); agitador vórtex (Fisatom).

4.3 Derivatização com 2,4-Dinitrofenilhidrazina

Neste trabalho a derivatização do formaldeído foi realizada adicionando a solução de 2,4-DNPH diretamente na solução de esmalte.

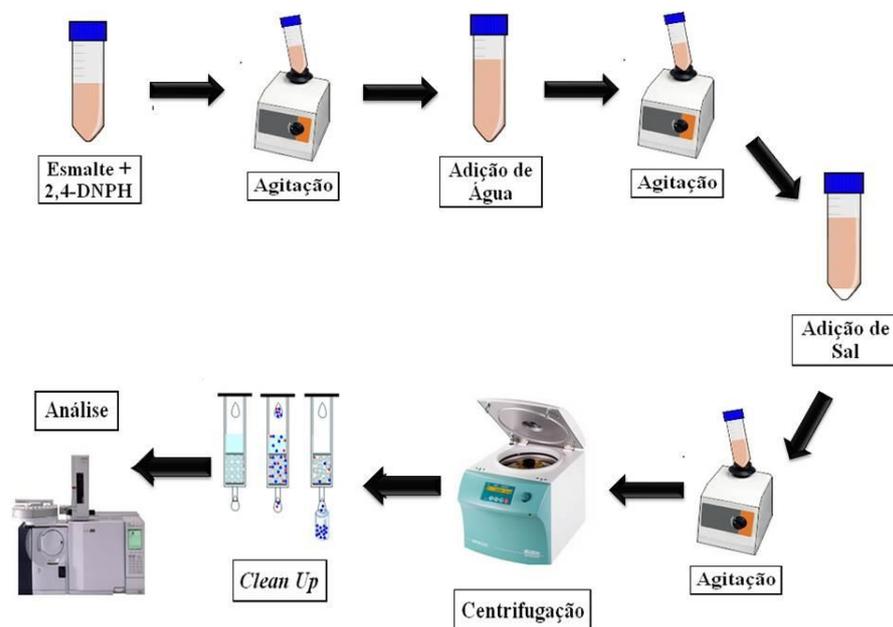
O procedimento consistiu no preparo de uma solução de 2,4 DNPH em acetonitrila/metanol (7:3 v/v) e preparo de uma mistura de esmaltes para unha. A reação de derivatização se deu com a adição de 2,00 mL da solução de esmaltes em tubo falcon; neste se adicionou 2,00 mL de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina e 0,10 mL de ácido fosfórico e agitado em vórtex.

4.4. Hifenamento QuERChERS/SPE

Nesta etapa, fez-se o preparo de amostras pela extração do FA-DNPHo por QuEChERS/SPE. O procedimento iniciou com a adição de 2,00 mL de água destilada a uma solução de FA-DNPHo preparada no item 4.3 e posterior agitação em vórtex. Em seguida, adicionou o sal inorgânico ($MgSO_4$) e o sistema foi novamente agitado em vórtex até completa dissolução. Por fim, centrifugou-se a mistura por 5 min a 4180 rpm e realizou-se o clean-up.

O clean-up da fase orgânica foi feito por SPE. Inicialmente, conforme orientações encontradas em catálogo da Phenomenex[®] para o condicionamento do cartucho de extração Florisil[®] (Mg_2SiO_3), passou-se 2,00 mL de metanol e depois 2,00 mL da mistura acetonitrila/metanol (7:3 v/v). Após esse procedimento foi eluída 1,00 mL da fase orgânica e posteriormente com 2,00 mL mistura hexano/acetonitrila (1:9 v/v) para a dessorção do analito. Esta última eluição diluída na proporção 1:1 em mistura hexano/acetonitrila (1:9 v/v) e analisada por GC/MS. O esquema do procedimento de preparo da amostra esta ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Esquema do método de extração de formaldeído derivatizado com 2,4-DNPH de amostras de esmalte para unha utilizando QuEChERS/SPE.



4.5. Condições cromatográficas

O método desenvolvido para análise de formaldeído por GC/MS teve a temperatura do forno iniciada em 60 °C. Em seguida esta foi aumentada com uma taxa de 10 °C/min até 120 °C permanecendo por 2 min, e novamente a uma taxa de 10 °C/min foi elevada até 290 °C sendo esta mantida por 10 min e terminando com um aumento de 10 °C/min até 300 °C permanecendo por 2 min. O hélio foi utilizado como gás de arraste e o fluxo da coluna foi de 2,00 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C no modo splitless durante 2 min. A análise foi realizada no modo SIM (Monitoramento Seletivo de Íons), monitorando os íons de relação *m/z*: 210,194,180 e 152. A coluna utilizada foi uma coluna capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme contendo 5% de fenil, 95% metilpolissiloxano (DB-5 MS). Os parâmetros do espectrômetro de massas usados foram: temperatura da fonte de íons à 250 °C, temperatura da interface à 200 °C e o tempo de corte do solvente igual a 7 min e tempo de corrida de 33,00 min.

4.6. Planejamento experimental multivariado

No processo de otimização multivariada de triagem realizou-se o planejamento fatorial completo e em seguida o planejamento composto central como superfície de respostas, para se obter melhores respostas analíticas.

4.6.1. Triagem

Na etapa de triagem foi utilizado o planejamento fatorial completo 2^4 e as variáveis selecionadas para serem avaliadas foram: tempo de agitação (t), massa de derivatizante ($m_{2,4\text{-DNP}}H$), massa de amostra de esmalte (m_{es}) e massa de $MgSO_4$ (m_{sal}). Essas variáveis foram selecionadas, após a observação de suas influências durante os testes preliminares. Devido a falta de informação sobre a quantidade de formaldeído presentes nas amostras, fez-se necessário o estudo de um sistema que não tivesse gastos excessivos de reagente derivatizante e que garantisse a total derivatização do analito, portanto a massa de derivatizante foi estudada. O efeito salting out foi estudado pela massa do sal, uma vez que é importante no processo formação de duas fases imiscíveis e da extração do analito derivatizado, e assim por ser um processo exotérmico, evitar perdas para a fase vapor.

Todos os fatores foram investigados em dois níveis (máximo e mínimo) e um ponto central, realizado em triplicatas, totalizando 19 experimentos. Na Tabela 1 encontram-se os níveis das quatro variáveis que foram estudados.

Tabela 1: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^4 no estudo do preparo de amostras de esmalte com QuERChERS/SPE para análise por GC/MS. Os valores -1 e +1 representam os níveis codificados, sendo as variáveis t = tempo de agitação (min), $m_{2,4\text{-DNPH}}$ = massa de derivatizante (mg), m_{es} = massa de esmalte (mg) e m_{sal} = massa de sal MgSO_4 (mg).

Variáveis	Mínimo (-1)	Ponto central (0)	Máximo (+1)
t (min)	1	2	3
$m_{2,4\text{-DNPH}}$ (mg)	38,00	68,00	98,00
m_{es} (mg)	310,00	470,00	630,00
m_{sal} (mg)	2000,00	3000,00	4000,00

A execução do planejamento consistiu-se em realizar os ensaios e registrar as respostas analíticas observadas para todas as combinações de níveis. Utilizaram-se planilhas eletrônicas⁵³ para gerar a codificação dos experimentos realizados e para o tratamento estatístico dos resultados.

Durante o estudo das variáveis, mantiveram-se fixos os seguintes parâmetros: o meio utilizado no preparo das soluções acetonitrila/metanol (7:3 v/v) e solução usada para a extração hexano/acetonitrila (1:9 v/v), tempo de centrifugação de 5 min e velocidade da centrifuga de 4180 rpm.

As soluções de esmaltes para unha e de 2,4-DNPH usadas para os ensaios foram preparadas previamente aos experimentos e deixadas em agitação no shake por 24 hrs com velocidade de 400 rpm.

Os experimentos para cada ensaio do planejamento foram executados de forma aleatória e conforme descritos nos itens 4.3. e 4.4. As áreas cromatográficas obtidas em cada experimento foram adicionadas a planilhas eletrônicas⁵³, para a obtenção das variáveis significativas e os níveis de maiores influência sobre a resposta analítica.

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos de melhor resposta analítica foram selecionados e a metodologia de análise de superfície de resposta foi executada a fim de investigar o ponto ótimo.

4.6.2. Superfície de resposta

Baseando-se nos resultados obtidos na triagem selecionaram-se as variáveis e as interações que foram significativas para o processo de preparo de amostras. Após esta etapa, definiram-se os níveis em que elas seriam estudadas na aplicação da metodologia de superfície de resposta. Para um melhor estudo do comportamento das mesmas, aplicou-se o planejamento composto central esférico. As variáveis e os níveis estudados na etapa do processo de otimização usando superfície de resposta do preparo das amostras são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Fatores e níveis do planejamento composto central, sendo o nível 0, composto dos valores das variáveis estudadas na triagem e que proporcionaram melhor área para o pico de formaldeído. Sendo as variáveis t = tempo de agitação (min), $m_{2,4\text{-DNPH}}$ = massa de derivatizante (mg), m_{es} = massa de esmalte (mg) e m_{sal} = massa de sal MgSO_4 (mg).

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
t (min)	2	3	4	5	6
$m_{2,4\text{-DNPH}}$ (mg)	58,00	78,00	98,00	118,00	138,00
m_{es} (mg)	430,00	530,00	630,00	730,00	830,00
m_{sal} (mg)	1000,00	1500,00	2000,00	2500,00	3000,00

As soluções de esmaltes para unha e de 2,4-DNPH usadas para esses ensaios foram preparadas previamente a realização dos experimentos e deixadas em agitação no shake por 24 hrs com velocidade de 400 rpm.

Os experimentos foram executados de forma aleatória e conforme descrito nos itens 4.3 e 4.4. As áreas cromatográficas obtidas em cada experimento foram adicionadas a planilha eletrônica⁵³, para a obtenção das variáveis significativas de maiores influências sobre a resposta analítica, e desta forma a obtenção da indicativa de um ponto ótimo do experimento.

Além do estudo de uma possível condição ótima de extração de formaldeído derivatizado com 2,4-DNPH, avaliou-se o método analítico para a confiabilidade dos resultados obtidos. E, para isto, seguiu-se as orientações de órgãos como INMETRO⁷⁸ e ANVISA⁷⁹, que propõe as figuras de mérito que são necessárias para que um método analítico seja considerado validado à uma análise específica.

4.7. Figuras de mérito

A confiabilidade de um novo método analítico é avaliada por meio das figuras de mérito, para que então esse método possa ser aplicado em diferentes amostras, como as de esmaltes⁶⁴. Dessa forma, para se realizar o processo de validação são utilizadas características de desempenho encontradas em manuais de orientações para de validação de método da ANVISA⁷⁹ e INMETRO⁷⁸, tais como: coeficiente de determinação (R^2), a seletividade, a precisão, a recuperação, LOD e LOQ e o efeito matriz^{3,61}.

4.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi obtida através da comparação dos cromatogramas da solução padrão de aldeídos derivatizados com 2,4-DNPH e as amostras fortificadas com solução padrão de formaldeído 37 % m/v, uma vez que a técnica de espectrometria de massas utilizada para a quantificação dos compostos é considerada altamente seletiva, pois possibilita monitorar íons referentes a fragmentação do íon precursor e a razão de intensidade entre eles, o que assegura que o pico cromatográfico seja atribuído a um só componente.

4.7.2. Curva analítica

Foram selecionadas duas marcas de esmaltes dentre as mais populares no comércio, sendo esses hipoalergênicos (teoricamente, isentos de formaldeído). Para o preparo de cada ponto da curva, as etapas dos procedimentos estão descritas nos itens 4.3 e 4.4, partindo de uma solução estoque ($403,3 \text{ g.L}^{-1}$) que foi adicionada na etapa inicial do item 4.3 para obter soluções entre 0,05 a 0,6 % m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte). A curva analítica de regressão quadrática foi obtida plotando-se os valores médios de triplicatas das injeções de cada ponto, bem como a verificação do coeficiente de determinação.

4.7.3. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho selecionada foi de 0,05 a 0,6 % m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte). O intervalo determinado para a faixa de trabalho foi selecionado depois de um estudo de comportamento da regressão da curva analítica

a qual apresentou melhor valor de R^2 e continha o valor limite estabelecido pela ANVISA²⁴ de 0,2%. Dessa forma a faixa de trabalho deveria apresentar exatidão, precisão e ajuste adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

4.7.4. Efeito matriz

Para o estudo do efeito matriz foi construído curvas analíticas, no intervalo 0,05 a 0,6 % m/m de formaldeído, usando tanto a solução estoque de formaldeído previamente derivatizado em meio a acetonitrila/metanol (7:3 v/v), quanto na presença das seis matrizes de esmaltes hipoalergênicos para unha estudadas (R1, R2, R3, C1, C2 e C3). Desta forma a avaliação foi feita observando o comportamento paralelo entre as sete curvas analíticas e confirmado a semelhança pela aplicação do teste de Tukey. Para todas as figuras de méritos avaliadas a seguir, utilizou a amostra R1. Esta amostra foi selecionada por apresentar melhor ajuste da curva analítica e por ter sido utilizada no processo de otimização multivariada do preparo de amostra.

4.7.6. Limite de quantificação e limite de detecção

Para o cálculo do LOD e LOQ, o branco foi preparado em três replicatas independentes da amostra, conforme o procedimento descrito nos itens 4.3. e 4.4, e os cálculos feitos utilizando as Equações 2 e 3.

4.4.6. Precisão

A repetitividade foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) das análises de septuplicatas em três níveis de concentração 0,05, 0,2 e 0,6 % m/m, seguindo os procedimentos dos itens 4.3 e 4.4, feitos para cada um dos três níveis. As análises por CG/MS foram realizadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento.

4.4.7 Recuperação

A recuperação foi expressa como recuperação analítica, definida pela Equação 1, para três níveis de concentrações 0,05; 0,2 e 0,6 % de FA-DNPHo. Para

a obtenção dos valores observados para cada nível de concentração, os valores das áreas cromatográficas de FA-DNPHo foram substituídos na equação de regressão quadrática obtendo dessa forma, os valores observados. Os valores esperados são os próprios níveis de concentrações estudados na recuperação.

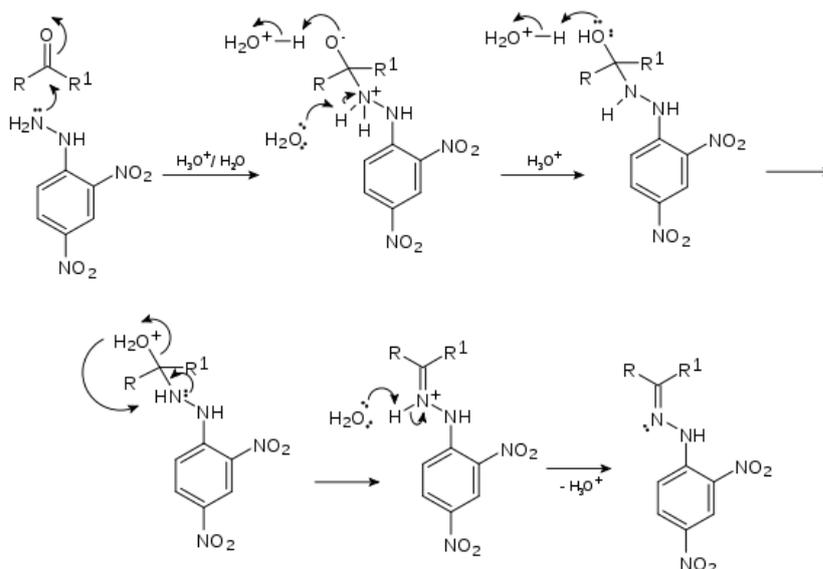
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O formaldeído é um composto de pequena massa molar, altamente volátil, que quando injetado no sistema cromatográfico, sofre degradação, não sendo detectado diretamente por espectrometria de massas. Portanto é necessário realizar a derivatização do formaldeído presente nas amostras, e neste trabalho foi utilizado a 2,4-dinitrofenilhidrazina⁷⁹.

A escolha desse composto se deu pelo fato de ser o agente de derivatização mais utilizado na derivatização de aldeídos e cetonas^{9,10}. Apresenta alta especificidade, seletividade e rapidez na reação em temperatura ambiente. Em meio ácido a 2,4-DNPH reage com o grupo carbonilo obtendo como produto hidrazonas estáveis^{9,10}. A Figura 5 ilustra esse mecanismo de reação que se processa através da catálise ácida com adição do ácido fosfórico. Esse atua como um catalisador, tornando o carbono mais eletrofílico e suscetível ao ataque nucleofílico, melhorando a eficiência na derivatização.

A reação de derivatização conduz a uma solução de cor laranja de 2,4-DNPH-carbonilos evidenciadas nos experimentos realizados⁸⁰.

Figura 5: Mecanismo da reação de derivatização de carbonilo com 2,4-DNPH, obtendo como produto uma hidrazona estável e de baixa volatilidade.



Fonte : Veloso, 2001¹⁰.

A catálise ácida ativa o carbono carbonílico por meio da protonação do oxigênio como ilustrado na Figura 5, tornando-o mais eletrofílico e passível de ser

atacado por um nucleófilo fraco, como a 2,4-dinitrofenilhidrazina⁸¹. Para a acidificação desse meio reacional, encontra-se na literatura o uso de ácido clorídrico, perclórico ou fosfórico. Porém existe a vantagem da utilização do ácido fosfórico que possibilita a injeção direta da solução e permite o aumento da velocidade de derivatização³⁴. Quando o H₃PO₄ é usado na derivatização, há a formação equilibrada de isômeros *E* e *Z* das hidrazonas, prevenindo o erro analítico relacionado com a detecção de apenas um *E*-isômero³²⁻³⁴.

Para realização da reação de derivatização entre o formaldeído presente na amostra e a 2,4-DNPH foi necessário avaliar a solubilização tanto do esmalte quanto do agente derivatizante.

Os primeiros testes consistiram em avaliar a dissolução do derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina e a solubilização das amostras de esmalte em três diferentes meios: acetonitrila, metanol e mistura de acetonitrila/metanol (7:3 v/v). Em acetonitrila e na mistura de solventes o resultado mostrou uma boa dissolução da 2,4-dinitrofenilhidrazina. As amostras de esmaltes não se solubilizaram em acetonitrila, porém apresentaram eficiente solubilização em metanol e na mistura acetonitrila/metanol (7:3 v/v). A mistura de solventes foi o meio que se mostrou eficaz tanto na dissolução da 2,4-DNPH quanto na solubilização das amostras de esmaltes. Tais fatos podem ser explicados pelas interações intermoleculares de ligações de hidrogênio formadas entre a mistura de solventes polares (acetonitrila/metanol)⁷⁶, a solução de esmaltes que tem características polares (por ser constituído em maior parte de substâncias que tem características polares, segundo o próprio rótulo de cada frasco de esmalte analisado) e a 2,4-DNPH que apresenta média polaridade⁸².

5.1. Condições cromatográficas de detecção

Para a determinação do analito por espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, foram selecionadas as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados. Em virtude da complexidade da matriz do esmalte para unhas^{83,84}, o método foi desenvolvido no modo de análise por monitoramento seletivo de íons (SIM). Esta técnica é frequentemente aplicada para misturas de compostos onde é requerida uma análise quantitativa mais sensível e específica⁷⁷.

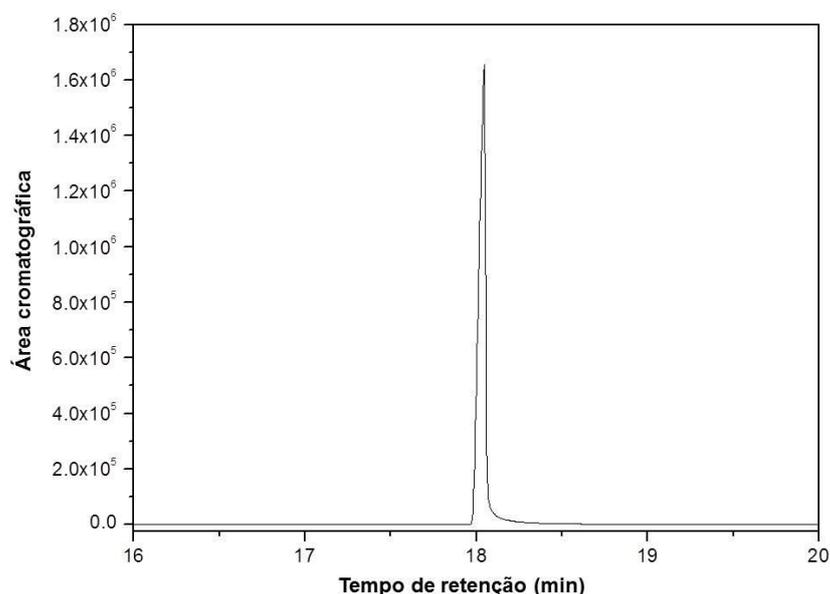
Os íons monitorados estão apresentados na Tabela 3. A condição cromatográfica utilizada nesse estudo possibilitou a detecção e confirmação do FA-DNPHo, com pico do íon precursor bem resolvido. Desta forma, todas as análises foram realizadas nessas condições.

Tabela 3: Íons utilizados para a identificação e quantificação do formaldeído-DNPHo, no modo SIM.

Analito	Íon precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)
FA-2,4-DNPHo	210	180 152

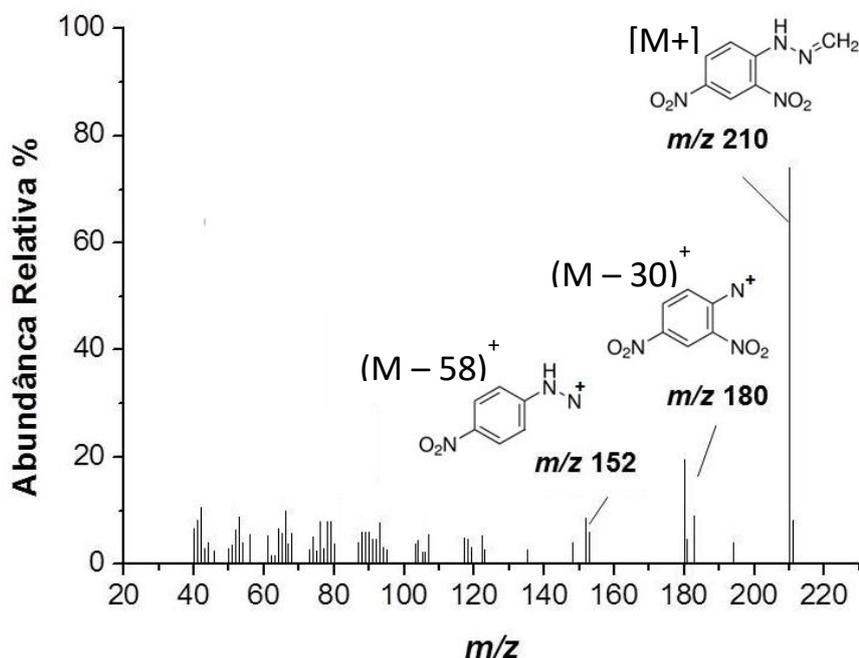
Após o estudo das condições de análise cromatográfica, obteve-se o cromatograma no modo SIM para o FA-DNPHo. Observa-se na Figura 6, o cromatograma com pico do formaldeído derivatizado em 18 min, originando cromatogramas com poucos ruídos e com picos bem resolvidos.

Figura 6: Cromatograma do FA-DNPHo obtido no estudo da otimização das condições da análise da solução padrão de concentração 0,8% m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte).



A Figura 7 mostra o espectro de massas para o pico de formaldeído, analisado no modo SCAN. Isto possibilitou obter informações sobre a fragmentação da molécula, confirmando a identidade do pico no cromatograma, apresentando as intensidades de cada fragmentação com seus respectivos íons fragmentos e íon percurso.

Figura 7: Espectro de massa do pico de FA-DNPHo, com análise no modo SCAN, com a identificação dos íons fragmento $m/z = 180$ e 150 e íon precursor $m/z = 210$.



Após o estudo das condições cromatográficas, utilizando padrões de FA-DNPHo, para a análise das amostras por GC/MS, foi realizada a etapa de preparo de amostras.

5.2. Extração QuERChERS e clean-up com SPE

O método QuEChERS vem sendo usado para extração de analitos em diversas matrizes complexas como carnes, oleaginosas e agrotóxicos, permitindo a obtenção de bons resultados⁴⁰⁻⁴⁴. Por se caracterizar como um método de fácil operação e poder ser utilizado à matriz objeto de estudo deste trabalho, este processo foi utilizado com algumas adaptações⁴⁰⁻⁴⁴.

O procedimento QuERChERS objetiva remover os interferentes da fase orgânica por meio da extração, ou seja, remover as substâncias indesejadas (interferentes) oriundas da matriz de esmalte. A extração de parte das resinas e polímeros que compõem a matriz de esmalte se deu por apresentarem diferentes polaridades e em sua maioria polar, ficando preferencialmente na fase aquosa. A adição do sal inorgânico $MgSO_4$ (princípio do método QuERChERS) teve como efeito a separação das fases, uma vez que ele aumenta a força iônica da solução aquosa, diminuindo a solubilidade de compostos orgânicos nesse meio e

consequentemente a separação em duas fases, orgânica e aquosa. Desta forma o FA-DNPHo, por ser orgânico e de média polaridade, se manteve preferencialmente na fase orgânica.

Porém, o resultado obtido usando apenas esse método não foi suficiente para eliminar completamente os interferentes da matriz, pois a fase orgânica obtida dessa extração apresentava uma coloração intensa e semelhante à matriz de esmalte, apontando indícios da presença de substâncias provenientes da matriz. Desta forma, como uma etapa consistente do QuERChERS, realizou-se o clean-up da fase orgânica obtida na extração. Essa etapa de limpeza teve como princípio evitar alterações na resposta obtida pelo sistema cromatográfico e danos ao mesmo^{41,80}.

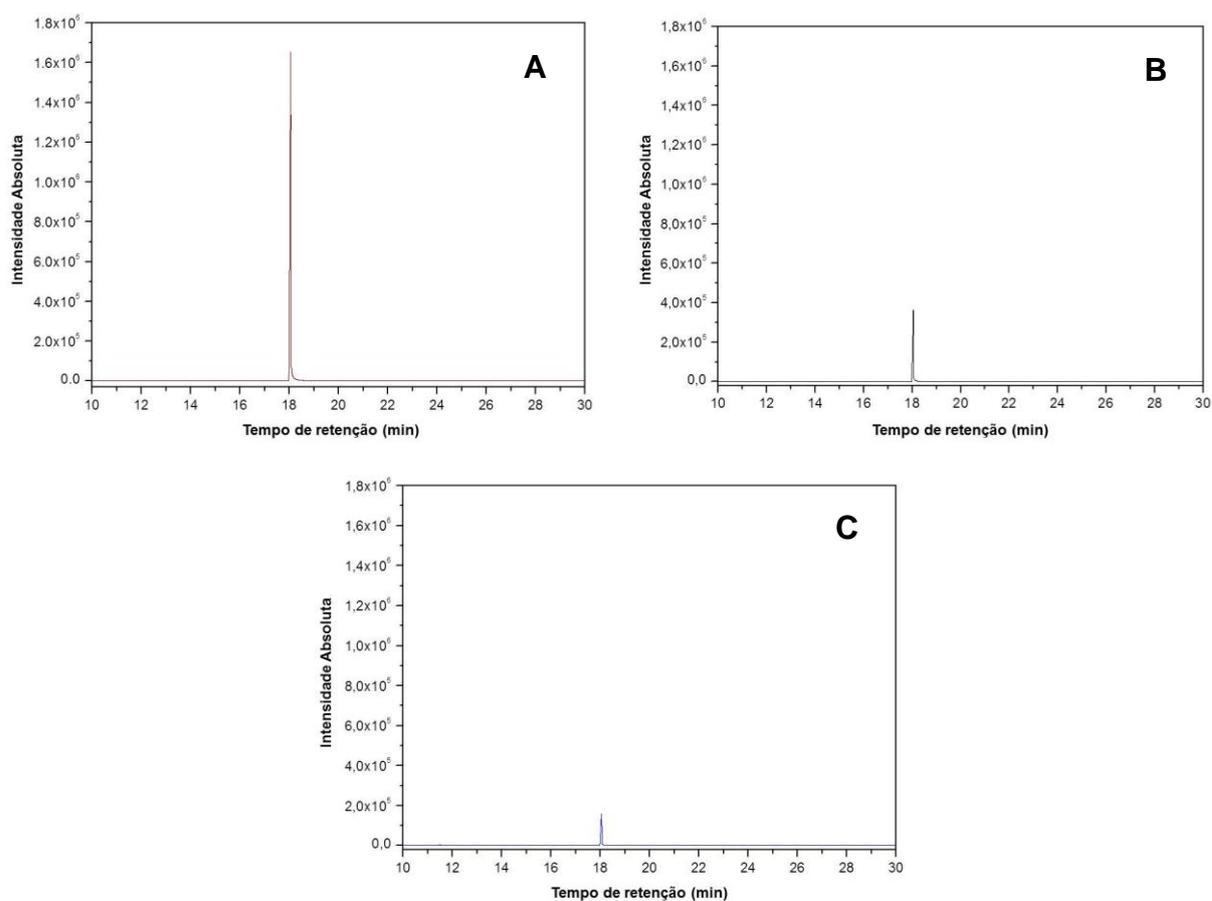
Nesta etapa de clean-up empregou-se SPE⁸⁸⁻⁹⁰, a qual utiliza cartuchos ou colunas que contém fase sólida extratora ou sorvente. O sorvente tem a função de reter os interferentes contidos na matriz, e/ou adsorver o analito de interesse para posterior eluição⁴¹. Portanto, para remoção dos interferentes polares ainda presentes na fase orgânica da extração QuEChERS, foi utilizado o cartucho contendo a fase sólida Florisil[®], um gel de sílica com magnésio (Mg_2SiO_3) de características polares⁴². Este método proporcionou a separação dos interferentes, que se mantiveram adsorvidos na fase sólida, após a eluição do analito. Desta forma, as substâncias indesejadas provenientes da matriz de polaridade semelhante a do Florisil[®] permaneceram adsorvidos no sorvente^{92,93}, uma vez que apresentaram interações mais fortes e mesmo com a passagem da mistura de solventes hexano/acetonitrila (1:9 v/v) não foram dessorvidos. Já o FA-DNPHo, com interações de menores intensidades com o Florisil[®], foi dessorvido com a passagem desse mesmo solvente, promovendo assim a limpeza da fase orgânica para posterior análise por GC/MS.

Ao final do procedimento descrito no item 4.3, as alíquotas provenientes de cada etapa do clean-up foram recolhidas em tubos de ensaio, diluídas de 1:1 na mistura de solventes acetonitrila/metanol (7:3 v/v) e analisadas por GC/MS. Inicialmente avaliou-se as alíquotas provenientes da eluição da amostra e depois da eluição com acetonitrila/hexano (9:1 v/v). Os cartuchos não eram reutilizados devido a difícil dessorção das substâncias provenientes da eluição da amostra, o que geraria muitos gastos de reagentes. Através destas análises, verificou-se que o FA-DNPHo foi identificado somente na alíquota que foi eluída com hexano/acetonitrila

(1:9 v/v). Ressalta-se que essas alíquotas, após o clean-up, visualmente se apresentavam límpidas. Dessa forma, quando comparadas com a solução padrão de formaldeído derivatizado com 2,4-Dinitrofenilhidrazina, observou-se semelhanças entre as soluções, sendo mais um indício da eficiência no procedimento de clean-up por extração SPE. Esta observação, apesar de não ser a única relevante, é importante uma vez que o objetivo do clean-up é a eliminação da maior quantidade de interferentes possíveis.

A fase estacionária Florisil[®] interagiu com o analito por ligações de hidrogênio entre os grupos polares deste com os da sílica, adsorvendo-o, o que possibilitou o clean-up e a obtenção de cromatogramas com picos de FA-DNPHo bem resolvido e poucos ruídos. Por tais motivos citados foram analisados somente as alíquotas dos tubos eluídos com a mistura de solventes acetonitrila/hexano. Os perfis dos cromatogramas obtidos nesse procedimento no modo SIM estão apresentados na Figura 8.

Figura 8: Perfis dos cromatogramas no modo SIM do FA-DNPHo. A) Íon precursor m/z 210; Íons fragmentos B) m/z 180 e C) m/z 152 obtidos da análise da alíquota após clean-up com cartucho Florisil[®].



Analisando os perfis dos cromatogramas da Figura 8, observa-se a eficiência no procedimento de preparo das amostras, resultando em cromatogramas com pouco sinal de ruídos e picos bem resolvidos.

Com estes resultados, a sequência analítica adotada para a validação do método analítico consistiu: em derivatização, extração pelo método QuERCHERS e clean-up com SPE utilizando o cartucho contendo a fase Florisil[®]. No entanto, para identificar dentre os parâmetros experimentais da derivatização, do QuERCHERS e do clean-up aquela ou aquelas variáveis que apresentam maior efeito sobre a resposta analítica e obter uma melhora na área do pico de formaldeído obtido no cromatograma, o estudo de planejamento experimental multivariado foi realizado.

5.3. Planejamento experimental fatorial completo

Para se iniciar um estudo de triagem, as variáveis que se deseja estudar devem ser selecionadas. Após vários ensaios, observando a influências das variáveis e buscando a importância de cada uma sobre o procedimento de derivatização e QuEChERS/SPE, quatro variáveis foram selecionadas para o planejamento experimental multivariado, sendo elas: tempo de agitação em vórtex (min), massa de derivatizante (mg), massa de amostra de esmalte (mg) e massa do sal $MgSO_4$ (g). Optou-se por estudar as variáveis massas de 2,4-DNPH e massa de esmalte para unha, de forma com que está combinação fosse capaz de garantir que o formaldeído presente nas amostras fosse derivatizado.

Para a redução dos gastos dos volumes de solventes, massa de reagente derivatizante e massa do sal $MgSO_4$, foi possível observar nos testes preliminares que massas de 2,4-DNPH menores que 38,00 mg não garantiam a total derivatização do formaldeído e acima de 138,00 mg não se tinha a completa dissolução na mistura de solvente acetonitrila/metanol, uma vez que a 2,4-DNPH é parcialmente solúvel nesses solventes⁹. A escolha de 98,00 mg foi baseada na quantidade máxima de formaldeído de uma amostra de esmalte dentro da regularidade de 0,2 % m/m (massa de formaldeído/ massa de esmalte), evitando assim gastos excessivos de reagentes.

Para massa do sal optou-se por combinações que garantissem a menor perda de analito para fase vapor e que resultasse em uma melhor separação das fases e permanência do FA-DNPHo na fase orgânica. O intervalo do tempo de agitação foi estudado baseando-se no tempo necessário para a homogeneização da mistura formada pela solução de esmalte e 2,4-DNPH, e assim garantir uma melhor eficiência da reação de derivatização. As melhores respostas analíticas (maiores áreas cromatográficas) foram obtidas no intervalo de tempo de 1 a 3 min^{9,10}.

Todos os dezenove experimentos foram realizados como descritos nos itens 4.3 e 4.4, após analisados por GC/MS. Para cada experimento, as áreas dos picos referentes a $m/z = 210$ foram extraídas e inseridas na planilha eletrônica⁵³, no qual a Tabela 4 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 4: Resultados (área de pico cromatográfico) dos ensaios experimentais do planejamento fatorial completo 2^4 , com três replicatas no ponto central (ensaios 17 a 19), para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha: tempo de agitação (t / min), massa de derivatizante ($m_{2,4\text{-DNPH}}$ / mg), massa de esmalte (m_{es} / mg) e massa de sal (m_{sal} / mg). Os valores em parênteses representam os níveis decodificados. A última coluna corresponde aos valores de área de pico cromatográfico m/z 210 (A) obtidos para cada ponto experimental do planejamento.

Ensaio	T	$m_{2,4\text{-DNPH}}$	m_{es}	m_{sal}	A
1	-1 (1)	-1 (38,00)	-1 (310,00)	-1 (2000,00)	59818,00
2	+1 (3)	-1 (38,00)	-1 (310,00)	-1 (2000,00)	98270,00
3	-1 (1)	+1 (98,00)	-1 (310,00)	-1 (2000,00)	140155,00
4	+1 (3)	+1 (98,00)	-1 (310,00)	-1 (2000,00)	121543,00
5	-1 (1)	-1 (38,00)	+1 (630,00)	-1 (2000,00)	52677,00
6	+1 (3)	-1 (38,00)	+1 (630,00)	-1 (2000,00)	141904,00
7	-1 (1)	+1 (98,00)	+1 (630,00)	-1 (2000,00)	114476,00
8	+1 (3)	+1 (98,00)	+1 (630,00)	-1 (2000,00)	163835,00
9	-1 (1)	-1 (38,00)	-1 (310,00)	+1 (4000,00)	117898,00
10	+1 (3)	-1 (38,00)	-1 (310,00)	+1 (4000,00)	77315,00
11	-1 (1)	+1 (98,00)	-1 (310,00)	+1 (4000,00)	21262,00
12	+1 (3)	+1 (98,00)	-1 (310,00)	+1 (4000,00)	18784,00
13	-1 (1)	-1 (38,00)	+1 (630,00)	+1 (4000,00)	39321,00
14	+1 (3)	-1 (38,00)	+1 (630,00)	+1 (4000,00)	87040,00
15	-1 (1)	+1 (98,00)	+1 (630,00)	+1 (4000,00)	33778,00
16	+1 (3)	+1 (98,00)	+1 (630,00)	+1 (4000,00)	75437,00
17	0 (2)	0 (68,00)	0 (470,00)	0 (3000,00)	110146,00
18	0 (2)	0 (68,00)	0 (470,00)	0 (3000,00)	109475,00
19	0 (2)	0 (68,00)	0 (470,00)	0 (3000,00)	105759,00

Os resultados da triagem (Tabela 4) para a área de pico cromatográfico mostraram que dentre as variáveis estudadas, a massa de esmalte, o tempo e a massa de sal tiveram efeito significativo sobre o sistema, sendo que a m_{sal} foi aquela que mais influenciou a área de pico cromatográfico. Assim os erros associados a

cada efeito das variáveis foram avaliados pelo teste t ($\alpha = 0,05$) e estão mostrados na Tabela 5.

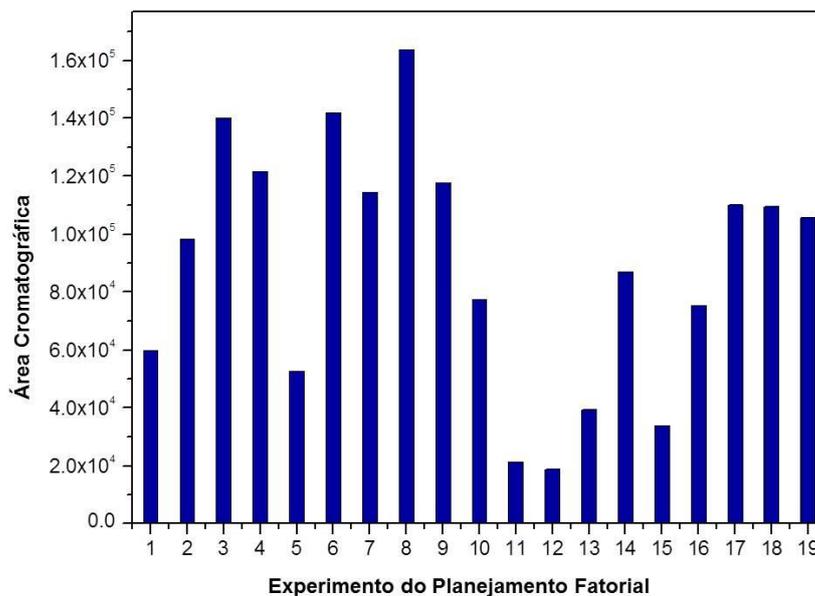
Tabela 5: Valores dos efeitos e do parâmetro p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento fatorial completo 2^4 para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha. Os valores em negrito são os que se mostraram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$). 1 = t, 2 = m_{2,4-DNPH}, 3 = m_{es}, 4 = m_{sal}.

Variáveis	A	
	Efeitos	p
Média	88889,10	4,0x10⁻⁵
1	25592,87	2,1x10⁻³
2	1878,37	2,5x10 ⁻¹
3	6677,87	3,0x10⁻²
4	-52730,37	5,0x10⁻⁴
1 x 2	-8110,87	2,0x10⁻²
1 x 3	31398,12	4,1x10⁻³
1 x 4	-14013,62	7,0x10⁻³
2 x 3	14767,62	1,0x10⁻²
2 x 4	-44956,62	7,0x10⁻³
3 x 4	-6598,62	3,0x10⁻²
1 x 2 x 4	16122,12	5,0x10⁻³
1 x 3 x 4	1711,62	2,8x10 ⁻¹
2 x 3 x 4	19737,62	3,6x10⁻³
1 x 2 x 3 x 4	88889,10	2,3x10⁻²

A Tabela 5 permitiu verificar a significância das variáveis independentes e forneceu quais interações foram significativas e os valores dos seus efeitos sobre área de pico do formaldeído-DNPH no nível de significância de 0,05.

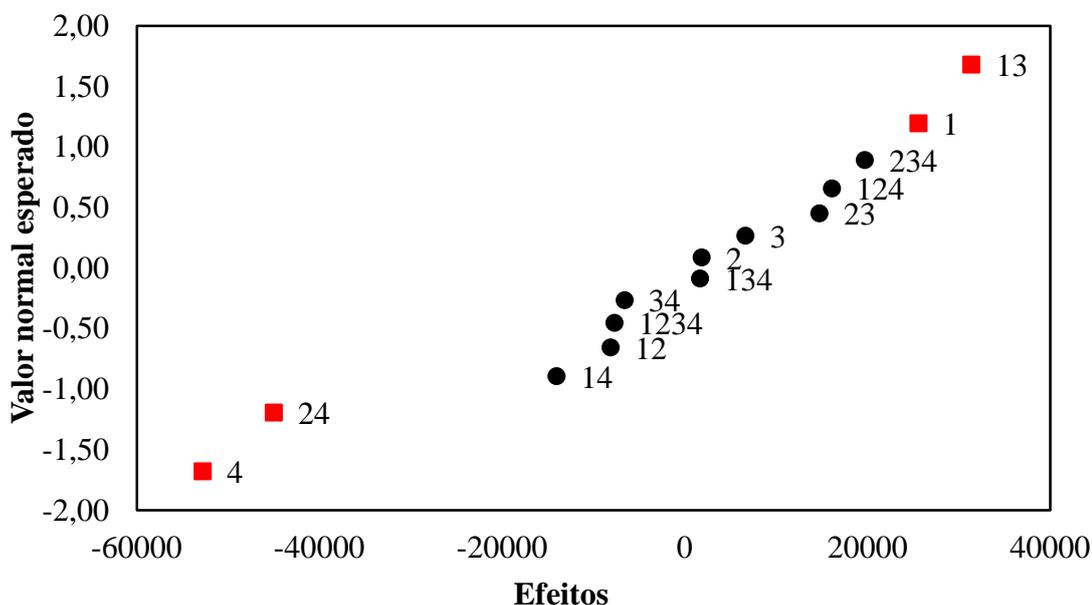
O gráfico apresentado na Figura 9, mostra as áreas cromatográficas obtidas em cada ensaio, sendo observado que o ensaio 8 foi o que possibilitou a obtenção de uma maior área cromatográfica para o pico de FA-DNPHo.

Figura 9: Áreas cromatográficas obtidas para FA-DNPHo nos ensaios realizados do planejamento fatorial completo, sendo os ensaios 17, 18 e 19 as replicatas no ponto central.



Dessa forma pode-se concluir que três variáveis escolhidas para o estudo apresentam efeito significativo (Tabela 5): tempo de agitação ($p = 2,1 \times 10^{-3}$), massa da amostra de esmalte ($p = 3,0 \times 10^{-2}$) e massa do sal ($p = 5,0 \times 10^{-4}$), sendo então de grande importância para o procedimento adotado no trabalho. A $m_{2,4\text{-DNPH}}$ não se mostrou significativa para o sistema aqui estudado (Tabela 5). No entanto, todas as suas interações com as demais variáveis foram significativas (Tabela 5), demonstrando que esta variável tem sua importância para o sistema assim como as demais. O fato que explica o resultado de todas as interações com a 2,4-DNPH serem significativas, é ela quem reage com o formaldeído presente na massa de amostra resultando na derivatização. Observando-se o comportamento do gráfico de probabilidade normal para avaliar a área do pico cromatográfico com relação m/z 210 (Figura 10), o efeito da variável m_{sal} (4) mostrou uma possível tendência de não distribuição normal em relação às demais variáveis e suas interações, indicando a significância desta variável para o sistema estudado.

Figura 10: Gráfico de probabilidade normal no estudo da triagem das variáveis de extração de formaldeído em amostras de esmalte de unha.



A ordem de significância encontrada para os efeitos na área dos picos de FA-DNPHo, é: massa do sal (m_{sal}) > tempo de agitação (t) > massa da amostra de esmalte (m_{es}). A massa do sal ($p= 5,0 \times 10^{-4}$) é a variável que apresentou maior efeito sobre a área cromatográfica, seu sinal negativo significa que a passagem do nível menor para o nível maior dessa variável contribui para a queda na resposta analítica, ou seja, ela contribui para a obtenção de uma menor área do pico de formaldeído. Portanto como o interesse é a obtenção da maior resposta, essa variável deve ser estudada na região em que seu nível mais baixo.

As variáveis t e m_{es} apresentaram sinal positivo e seguindo o mesmo raciocínio anterior, essas variáveis devem ser estudadas na região em seu nível mais alto. O efeito salting out avaliado pela massa do sal inorgânico, MgSO_4 , é responsável pela separação da mistura acetonitrila/metanol com a água (miscível nesta última), induzindo a formação de um sistema bifásico e enfraquecendo as forças de solvatação entre os componentes da fase orgânica e da fase aquosa. Isto resulta na competição dos eletrólitos presentes na solução da amostra, diminuindo a solubilidade dos compostos orgânicos na matriz aquosa e facilitando a partição^{60,94}. Analisando a influência da m_{sal} pôde-se observar que esta variável propiciou a maior área de pico cromatográfico no menor nível estudado (2000,00 mg - Tabela 5). Tal fato justificado pela reação exotérmica, que com aumento da força

iônica da solução diminui-se a solubilidade de compostos pouco polares dos mesmos para a fase extratora (orgânica) forçando-os a passar para a fase de vapor. Sendo assim a diminuição da massa de sal observada na triagem está diretamente relacionada com o aumento da área de pico cromatográfico, uma vez que ela facilita a partição do formaldeído para a fase extratora e tem menores perdas deste para fase vapor.

Ao se analisar a influência do tempo de agitação na reação de derivatização e no processo de extração ($p = 2,1 \times 10^{-3}$), observou-se que esta variável proporcionou o aumento da área de pico cromatográfico, com a melhor resposta em três minutos (Tabela 5). Tal variável, de segunda maior importância para o sistema influencia cineticamente na agitação das moléculas favorecendo a maior colisão (com energia suficiente) entre os reagentes e conseqüentemente, maior formação de produtos, e no equilíbrio de partição entre as fases melhorando a eficiência na extração. Geralmente, quanto maior o tempo de agitação, mais eficiente será a transferência do analito da fase aquosa para a fase orgânica.

Para o efeito da massa de esmalte ($p = 3,0 \times 10^{-2}$) observou-se que esta variável foi significativa na alteração do sinal analítico (Tabela 5), uma vez que o sistema de extração aqui proposto com maior massa de esmalte (630,00 mg) resultou em maior área do pico de formaldeído derivatizado (Tabela 5), portanto a quantidade de analito presente na amostra foi responsável pela obtenção de maior área, sem comprometimento operacional da quantificação.

A $m_{2,4\text{-DNPH}}$ não mostrou-se significativa, mas todas as suas interações com as demais variáveis foram significativas (Tabela 5), indicando a significância de interação da massa de derivatizante nos níveis avaliados, uma vez que para garantir que todo formaldeído do esmaltes seja derivatizado, a relação estequiométrica deva ser 2:1 de 2,4-DNPH/formaldeído. Dessa forma o estudo é importante para garantir uma massa suficiente para que todo analito seja derivatizado, já que não se conhece qual a quantidade de formaldeído presente nas amostras e assim evitar gastos excessivos de reagentes. Observou-se um comportamento similar ao avaliar o gráfico de probabilidade normal (Figura 9), onde o efeito de interação das variáveis $m_{2,4\text{-DNPH}}$ (2) e m_{sal} (4) mostrou uma possível tendência de distribuição não normal, em função dos valores dos efeitos.

Com os resultados obtidos foi possível obter uma modelagem matemática significativa, mas com falta de ajuste para área cromatográfica (A) $p = 4,5 \times 10^{-2}$ para o modelo e $p = 7,8 \times 10^{-3}$ para a falta de ajuste (Tabela 6). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9560.

Tabela 6: Tabela ANOVA para o modelo matemático obtido pelo planejamento fatorial 2^4 para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha. FV = Fonte de variação, SQ = soma quadrática, nGL = número de graus de liberdade, F_{calc} = valor do teste F calculado, SG = significativo e p = parâmetro estatístico p .

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	$3,0 \times 10^{10}$	14	$2,2 \times 10^9$	6,213	SG 0,045
Resíduos	$1,0 \times 10^9$	4	$3,5 \times 10^8$		
F. Ajuste	$1,0 \times 10^9$	2	$7,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^2$	SG 0,0079
Erro Puro	$1,0 \times 10^7$	2	$5,6 \times 10^8$		
Total	$3,0 \times 10^{10}$	18			
% variação explicada				95,60	
% máx. de variação explicável				99,97	

Com a finalidade de aprofundar o estudo da influência das variáveis e otimizar o sistema de extração, isto é, obter a maior área de pico cromatográfico nas análises após o preparo das amostras de esmalte para unha e estudo na triagem, realizou-se o planejamento composto central esférico. Este consiste em um conjunto de ferramentas estatísticas e matemáticas para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos químicos, físicos, biológicos, entre outros. Esta técnica avalia detalhadamente as variáveis significativas obtidas na triagem por apresentar um número maior de níveis.

5.4. Planejamento composto central

O planejamento composto central é um tipo de planejamento para a construção de superfícies de resposta que permite a obtenção de modelos de ordens superiores. Em virtude do exposto na investigação da triagem, reestudou-se todas as variáveis novamente na metodologia de superfície de resposta. Assim, com a finalidade de aprofundar o estudo da influência das variáveis e otimizar o sistema

de extração, isto é, obter a maior área de pico cromatográfico nas análises após o preparo das amostras de esmalte para unha, realizou-se o planejamento composto central esférico.

Os ensaios para a análise de superfície de resposta foram realizados aleatoriamente, assim como na triagem. Todas as soluções resultantes de cada ensaio foram analisadas por GC/MS como descrito no item 4.5 Condições cromatográficas e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados (área de pico cromatográfico) dos ensaios experimentais do planejamento composto central, com três replicatas no ponto central (ensaios 25 a 27), para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmalte para unha: tempo de agitação (t / min), massa de derivatizante ($m_{2,4\text{-DNPH}}$ / mg), massa de esmalte (m_{es} / mg) e massa de sal (m_{sal} / mg). Os valores em parênteses representam os níveis decodificados. A última coluna corresponde aos valores de área de pico cromatográfico m/z 210 (A) obtido para cada ponto experimental do planejamento.

Ensaio	T	$m_{2,4\text{-DNPH}}$	m_{es}	m_{sal}	A
1	-1 (2)	-1 (78,00)	-1 (530,00)	- 1 (1500,00)	32307,00
2	-1 (2)	-1 (78,00)	-1 (530,00)	+1 (2500,00)	51156,00
3	-1 (2)	-1 (78,00)	+1 (730,00)	- 1 (1500,00)	231148,00
4	-1 (2)	-1 (78,00)	+1 (730,00)	+1 (2500,00)	181588,00
5	-1 (2)	+1 (118,00)	-1 (530,00)	- 1 (1500,00)	120522,00
6	-1 (2)	+1 (118,00)	-1 (530,00)	+1 (2500,00)	90382,00
7	-1 (2)	+1 (118,00)	+1 (730,00)	- 1 (1500,00)	578058,00
8	-1 (2)	+1 (118,00)	+1 (730,00)	+1 (2500,00)	130924,00
9	+1 (5)	-1 (78,00)	-1 (530,00)	- 1 (1500,00)	61130,00
10	+1 (5)	-1 (78,00)	-1 (530,00)	+1 (2500,00)	74133,00
11	+1 (5)	-1 (78,00)	+1 (730,00)	- 1 (1500,00)	38771,00
12	+1 (5)	-1 (78,00)	+1 (730,00)	+1 (2500,00)	172404,00
13	+1 (5)	+1 (118,00)	-1 (530,00)	- 1 (1500,00)	399813,00
14	+1 (5)	+1 (118,00)	-1 (530,00)	+1 (2500,00)	64246,00
15	+1 (5)	+1 (118,00)	+1 (730,00)	- 1 (1500,00)	974765,00
16	+1 (5)	+1 (118,00)	+1 (730,00)	+1 (2500,00)	4769336,0
17	-2 (2)	0 (98,00)	0 (630,00)	0 (2000,00)	547040,00
18	+2 (6)	0 (98,00)	0 (630,00)	0 (2000,00)	178995,00
19	0 (4)	-2 (58,00)	0 (630,00)	0 (2000,00)	25930,000
20	0 (4)	+2 (138,00)	0 (630,00)	0 (2000,00)	564315,00
21	0 (4)	0 (98,00)	-2 (430,00)	0 (2000,00)	53347,00
22	0 (4)	0 (98,00)	+2 (830,00)	0 (2000,00)	57348,00
23	0 (4)	0 (98,00)	0 (630,00)	-2 (1000,00)	125591,00
24	0 (4)	0 (98,00)	0 (630,00)	+2 (3000,00)	64925,00
25	0 (4)	0 (98,00)	0 (630,00)	0 (2000,00)	55572,00
26	0 (4)	0 (98,00)	0 (630,00)	0 (2000,00)	55168,00
27	0 (4)	0 (98,00)	0 (630,00)	0 (2000,00)	55731,00

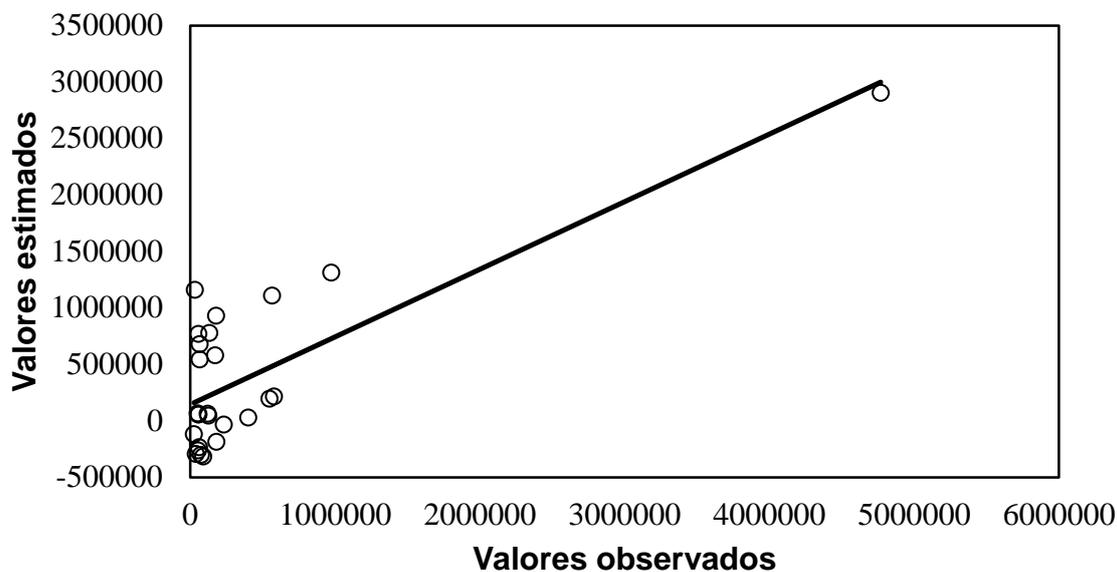
Os resultados da metodologia de superfície de resposta para a área de pico cromatográfico (A) mostraram que todas as variáveis estudadas são significativas para o sistema, inclusive as suas interações, confirmando os resultados obtidos na triagem. Os erros associados a cada coeficiente foram avaliados pelo teste t ($\alpha = 0,05$). Com estes resultados não foi possível construir um modelo quadrático por regressão linear múltipla, uma vez que a falta de ajuste mostrou-se significativa. Na Tabela 8 está apresentada a ANOVA para o modelo obtido.

Tabela 8: Tabela ANOVA para o modelo matemático obtido pelo planejamento composto central para a otimização das condições experimentais do sistema de extração de formaldeído de esmaltes para unha. FV = Fonte de variação, SQ = soma quadrática, nGL = número de graus de liberdade, F_{calc} = valor do teste F calculado, SG = significativo e p = parâmetro estatístico p .

FV	SQ	nGL	MQ	F_{calc}		P
Regressão	$1,0 \times 10^{13}$	14	$9,0 \times 10^{11}$	1,3		0,34
Resíduos	$9,0 \times 10^{12}$	12	$7,0 \times 10^{11}$			
Falta de ajuste	$9,0 \times 10^{12}$	10	$9,0 \times 10^{11}$	$1,03 \times 10^7$	SG	$9,7 \times 10^{-8}$
Erro puro	$1,7 \times 10^5$	2	$8,4 \times 10^4$			
Total	$2,0 \times 10^{13}$	26				
% variação explicada				59,81		
% máximo de variação explicável				100,00		

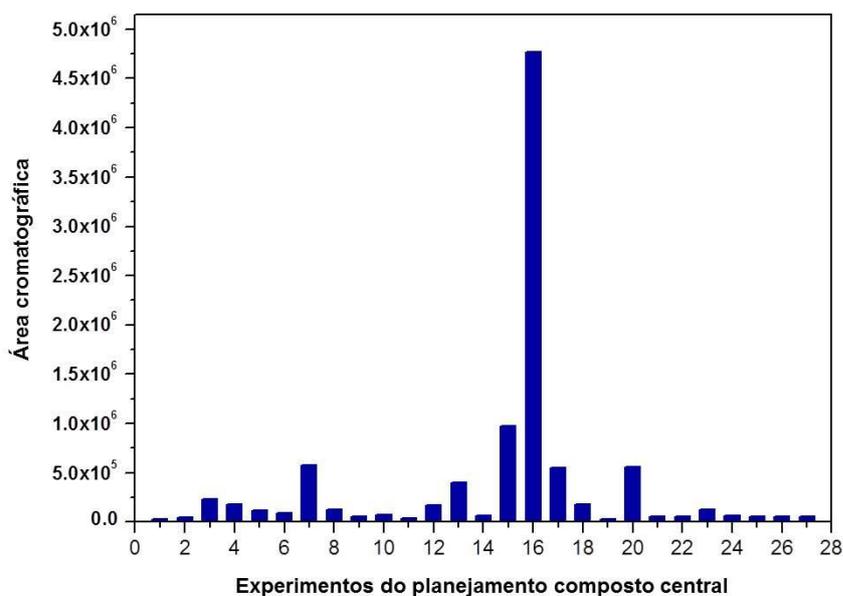
Observa-se pela ANOVA (Tabela 8) que o modelamento matemático proposto pelo planejamento composto central foi uma regressão não significativa, ao nível de significância de 0,05, e que houve falta de ajuste. O gráfico de valores observados *versus* valores estimados (Figura 11) apresentou-se com $y = 0,5981x + 0,14213$ e $R^2 = 0,5981$.

Figura 11: Gráfico de valores observados *versus* valores estimados para a área de pico cromatográfico pela metodologia de superfície de resposta.



A Figura 12 apresenta o gráfico com as áreas obtidas, das análises dos ensaios da superfície de resposta; destaque para a área cromatográfica do ensaio 16.

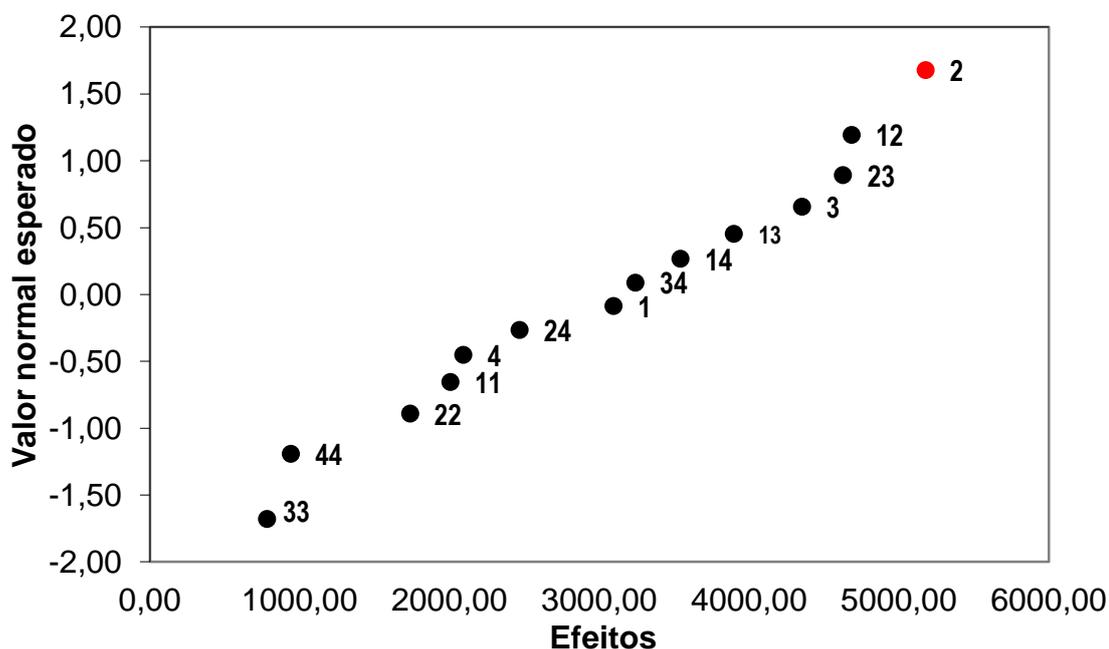
Figura 12: Áreas cromatográficas obtidas para FA-DNPHo, para os ensaios realizados do planejamento composto central, sendo os ensaios 25, 26 e 27 as replicatas no ponto central.



De forma geral, na abordagem para construção de superfície de resposta as variáveis se comportaram de maneira similar aos resultados da triagem, no entanto,

o efeito da massa de derivatizante ($p = 4,0 \times 10^{-8}$) passou a ser significativo e de maior importância para o sistema, confirmando a significância desta variável para o sistema estudado (Figura 13). O segundo maior efeito sobre a área cromatográfica foi a massa de esmalte ($p = 5,0 \times 10^{-8}$). Essas duas variáveis apresentaram maiores efeitos sobre a área cromatográfica, fato este justificado pela relação que uma variável exerce sobre a outra como explicado na triagem. Portanto elas são dependentes uma vez que o formaldeído presente na amostra só é detectado, de forma seletiva, se estiver derivatizado e para isso a quantidade de derivatizante deve ser suficiente para garantir total derivatização, assim um excesso deve ser adicionado. Tal fato confirma a importância em se ter levado a variável massa de derivatizante para ser estudada em mais níveis na RSM.

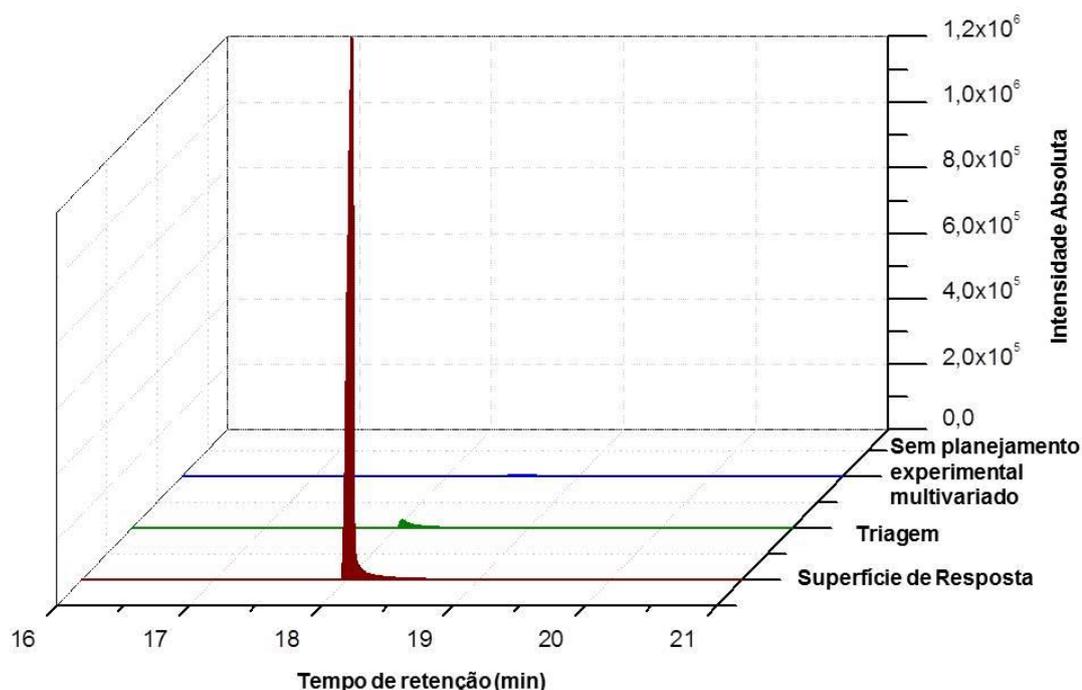
Figura 13: Gráfico de probabilidade normal das variáveis estudadas na extração de formaldeído em amostras de esmalte para uma obtida pela RSM. O ponto em vermelho se apresenta uma possível tendência de não distribuição normal da variável 2 = massa de 2,4 DNPH em relação às demais variáveis e suas interações, confirmando significância desta variável para o sistema estudado.



No entanto, mesmo sem a obtenção de uma regressão que represente o sistema em estudo, a abordagem de otimização multivariada proporcionou maior área de pico cromatográfico de formaldeído derivatizado, visto que a área inicial de 43.181 foi elevada a 4.796.336, ou seja, ocorreu um aumento de aproximadamente 10.000 vezes do sinal analítico (Figuras 11 e 13).

A Figura 14 representa a melhora na resolução e o aumento da área cromatográfica, nos passos seguidos desde a fase de testes preliminares, passando pela triagem e por fim pela MSR.

Figura 14: Variação da área de pico cromatográfico entre ensaios sem e com o uso de planejamentos experimentais multivariados. CCD = planejamento experimental composto central.



Com isso, foi possível obter uma indicativa de uma condição ótima de extração de formaldeído de amostras de esmaltes para unha, sendo essas condições as do ensaio 16 do planejamento CCD esférico (Tabela 7), no qual estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Condição experimental otimizada para a extração de formaldeído de amostras de esmalte unha.

Tempo de Agitação	Massa de 2,4-DNPH	Massa de Esmalte	Massa de Sal
5 min.	118.00 mg	730.00 mg	2500.00 mg

Em 2014, Rodrigues⁹⁵, et al. otimizaram um procedimento analítico para identificar e quantificar 21 contaminantes simultaneamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em amostras de água obtidas da bacia hidrográfica do Rio Doce/MG/Brasil. No processo de otimização foi utilizado um planejamento fracionário

2⁴⁻¹ como triagem e, em seguida, aplicaram o planejamento Doehlert. Neste tramite, não obtiveram regressões significativas na construção da superfície de resposta para quase todos os contaminantes, porém, observaram uma melhora significativa no aumento das áreas dos picos cromatográficos dos 21 analitos em estudo, situação similar obtida neste trabalho⁹⁵. Com isto, observa-se que o estudo aqui proposto imprime grande contribuição, uma vez que foi possível aumentar expressivamente o sinal analítico de FA-DNPHo, o que certamente promoverá a diminuição significativa dos limites de detecção e quantificação do método em aplicações para avaliação de amostras de esmalte.

Portanto, com a aplicação do planejamento composto central foi possível definir as condições ótimas para o procedimento experimental de extração de formaldeído em amostras de esmaltes para unha por GC/MS. Desta forma, essa condição experimental encontrada foi utilizada para avaliação das figuras de mérito demonstradas a seguir⁸³.

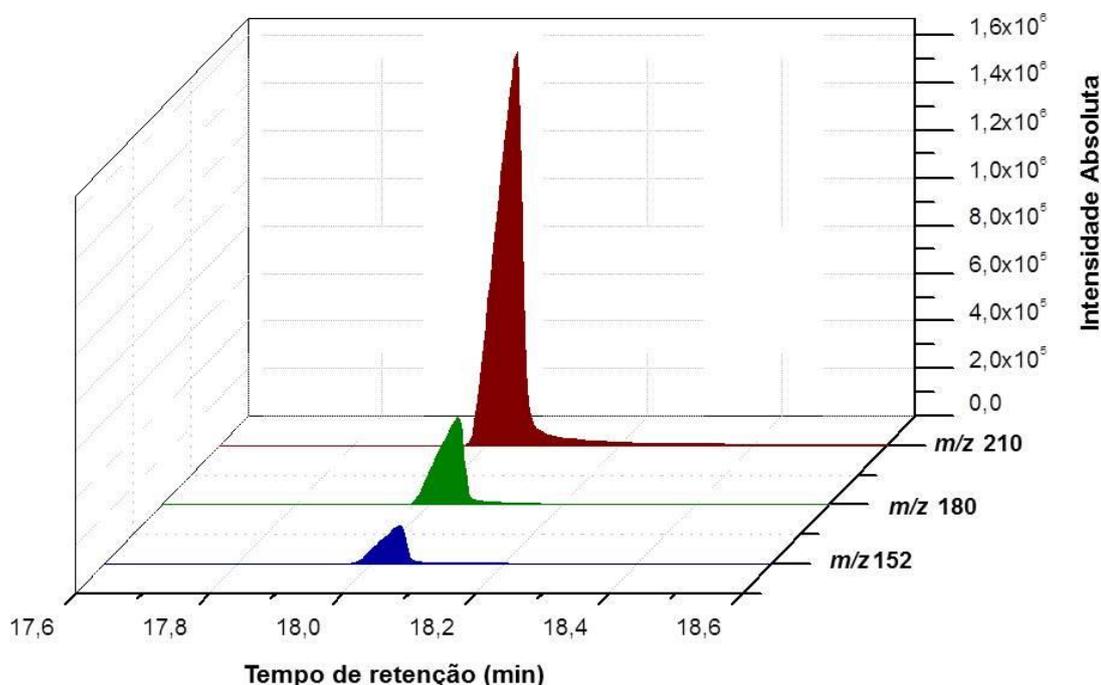
5.5. Figuras de mérito

5.5.1. Seletividade

O método de determinação de formaldeído em amostras de esmaltes para unha foi desenvolvido utilizando espectrometria de massas no modo SIM que, por si só, garante a seletividade levando em conta os tempos de retenção e a relação entre os íons fragmentos e íon precursor selecionados para identificação e quantificação dos analitos, o que assegura que o pico cromatográfico seja atribuído a um único componente^{32, 35, 54}.

Para exemplificar a seletividade do método de análise por GC/MS, a Figura 15 apresenta o cromatograma dos íons monitorados para o FA-DNPHo.

Figura 15: Cromatograma dos íons fragmentados de $m/z = 180$ e 152 e íon percurso de $m/z = 210$ monitorados no modo SIM para análise da área cromatográfica do pico do FA-DNPHo.

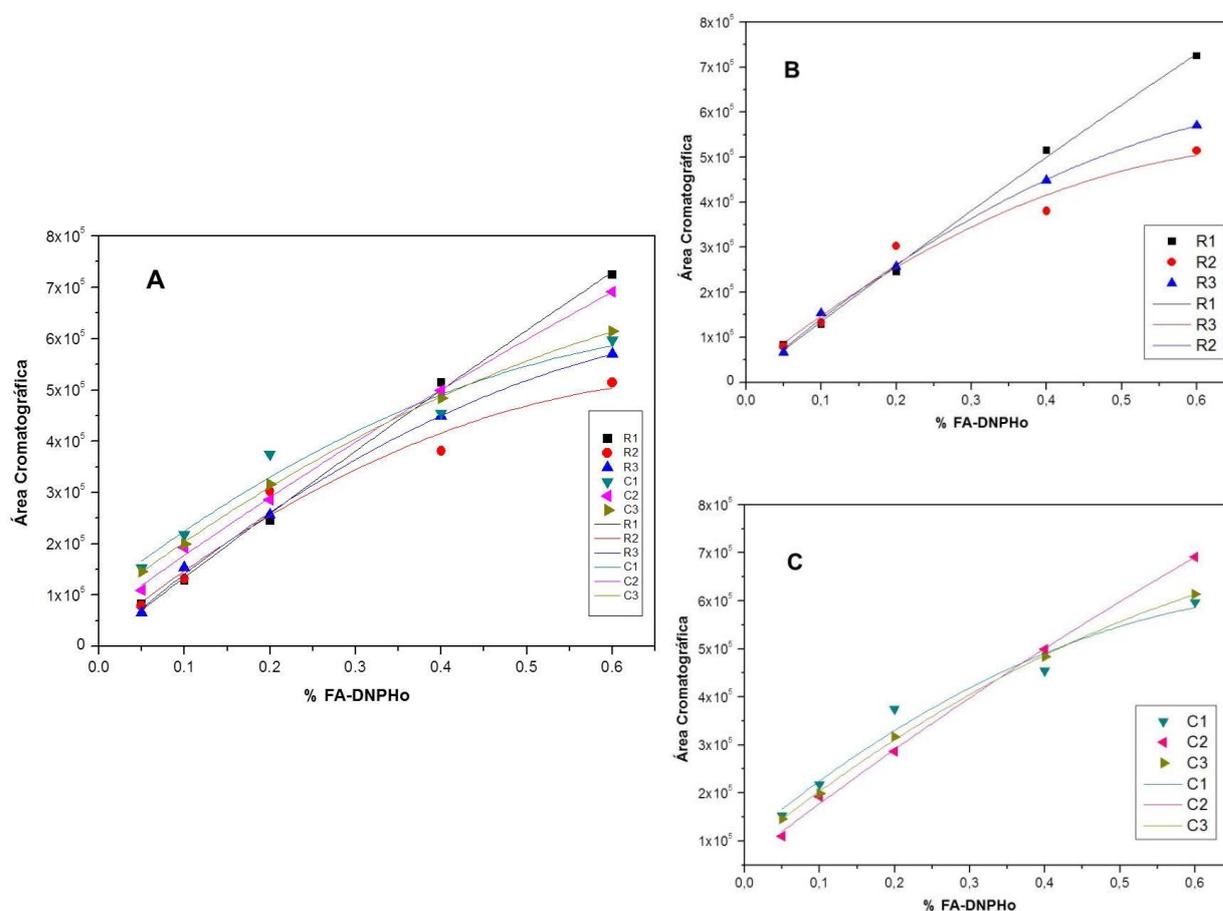


Analisando a Figura 15, observa-se que os picos relacionados aos íons fragmentados e o íon percurso apresentaram resoluções semelhantes, e mesmo tempo de retenção. Esse mesmo perfil de cromatograma foi obtido na análise do padrão de aldeído derivatizado confirmando a seletividade do método proporcionado pela análise no modo SIM.

5.5.2. Efeito de matriz

A análise do efeito das matrizes de esmaltes foi realizada para se avaliar a influencia dos diferentes tipos de esmaltes para unha avaliados na determinação de formaldeído. Foram utilizadas amostras de esmaltes para unha hipoalergênicos (teoricamente isentos de formaldeído). Esta análise foi feita comparando-se o comportamento de cada curva analítica, apresentadas na Figura 15. Para isso, soluções padrão preparadas em extrato de diferentes esmaltes foram analisadas na faixa de concentração de 0,05 a 0,6% m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte). Para as seis matrizes de esmaltes diferentes analisadas, observou-se que as curvas analíticas não obtiveram comportamento linear satisfatório, sendo necessário tratamento polinomial dos valores obtidos, como mostra a Figura 16.

Figura 16: Curvas analíticas para avaliar a influência do efeito de matriz na quantificação de FA-DNPHo. A = curvas ajustadas em seis diferentes matrizes de esmaltes; B = Curvas das amostras de marca R; C = curvas das amostras de marca C.



Observando inicialmente a Figura 16A, as curvas para as amostras R1, R2, R3, C1, C2 e C3 analisadas visualmente, mostram comportamentos angulares e paralelos diferentes entre si. Para uma melhor percepção das inclinações, plotou-se as curvas da marca R (Figura 16B) e de marca C (Figura 16C) separadamente. No entanto, somente analisando o aspecto visual das curvas, ainda não é possível definir se elas são diferentes ou semelhantes entre si, ou apenas diferentes para as marcas (R e C). Desta forma, foi realizado o teste de Tukey, para detectar/avaliar diferenças entre os coeficientes angulares das seis curvas com uma diferença mínima significativa em um nível de significância 0,05.

O teste de Tukey, sendo $q_{(0,05; 6; 18)} = 6,03$, mostrou estaticamente que as médias dos coeficientes angulares em relação ao coeficiente angular da curva R1 apresentaram comportamentos semelhantes, com diferença entre médias menores que o valor $\Delta(5\%) = 6,06 \times 10^4$ (Tabela 10). Desta forma o método pode ser validado

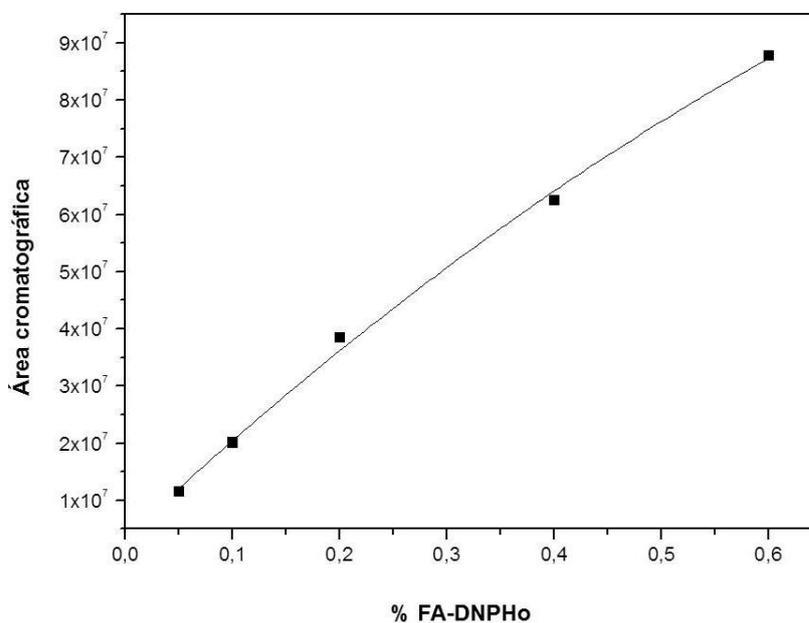
usando apenas a amostra R1. Portanto pode-se concluir que o preparo de amostras foi eficiente na remoção dos interferentes provenientes da amostra de esmalte para unha. A Tabela 10 apresenta as diferenças entre as médias dos coeficientes angulares em relação ao coeficiente angular da curva R1. Os coeficientes angulares estão relacionados com o valor da tangente do ângulo que a curva que representa o gráfico forma com o eixo de x.

Tabela 10: Contrastes entre as médias dos coeficientes angulares que não se diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Contrastes das curvas	Valores de Δ (5%)
R1 - R2	$6,0 \times 10^4$
R1 - R3	$1,1 \times 10^4$
R1 - C1	$9,5 \times 10^3$
R1 - C2	$4,2 \times 10^4$
R1 - C3	$2,8 \times 10^4$

Foi avaliado também o efeito matriz em relação ao solvente. Foi preparada uma curva com diluições sequenciais da solução padrão formaldeído 37 % em mistura hexano/acetonitrila (1:9 v/v), ilustrada na Figura 17.

Figura 17: Curva analítica preparada em diluições sequenciais da solução padrão de formaldeído 37% em mistura de solvente acetonitrila/metanol (7:3 v/v).



Nesse sentido fez-se também uma comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas a partir de soluções-padrão de formaldeído preparadas em solvente e em relação aos extratos das seis matrizes individuais (R1, R2, R3, C1, C2 e C3). O coeficiente angular da curva em meio de solvente se apresenta cento e vinte seis vezes maior em relação às curvas em meio da matriz da amostra ou seja, os resultados indicaram um efeito de matriz pronunciado, não sendo necessário aplicar o teste de Tukey para essa avaliação. Tal fato é explicado principalmente pela complexidade da matriz, que ainda deixaram resquícios de substâncias indesejáveis, mesmo passando pelo preparo de amostras com procedimento hifenamento QuEChERS/SPE. Portanto esses resíduos de interferentes provavelmente contribuíram para a diminuição significativa da área cromatográfica. Ou seja, segundo os resultados obtidos para método proposto, não é possível fazer calibração externa utilizando apenas a curva em meio o solvente.

5.5.3. Precisão

A precisão, na forma de repetitividade, foi avaliada pelos coeficientes de variação (CV) das septuplicatas dos níveis de concentração 0,05, 0,2 e 0,6% m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte) da amostra R1 (Tabela 11). Segundo o critério de precisão da ANVISA, esse valor deve estar abaixo de 20% para a análise de substâncias em níveis de concentração^{56,61} da ordem de mg L⁻¹. A Tabela 11 apresenta os resultados dos valores obtidos para a análise da precisão.

Tabela 11: Valores do coeficiente de variação (CV) das septuplicatas em dois níveis de concentração para a matriz de esmalte R1.

Nível de concentração (%)	CV (%)
0,05	19,0
0,20	13,7
0,60	6,27

Analisando a Tabela 11 observa-se que os valores do CV se apresentaram entre 6,27 e 19 % e, portanto, satisfatórios para os níveis estudados. Segundo o critério de precisão do INMETRO, esse valor deve estar abaixo de 20%, dessa forma esse procedimento pode ser considerado preciso.

5.5.4. Recuperação

A recuperação foi calculada usando a curva analítica da amostra R1 e os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de concentração em %FA-DNPHo determinados para avaliação da recuperação.

Amostra	% FA-DNPHo esperado	% FA-DNPHo obtido	%Recuperação
R1	0,05	0,045	90,00
	0,20	0,018	90,40
	0,60	0,059	99,33

Os valores de recuperação encontrados variaram entre 90 e 100%, coerente com a literatura^{62, 67} (para o uso de matrizes complexas, as quais apresentam efeitos de matrizes e precisão em torno de 20%)⁶¹. Portanto, obtiveram-se recuperações satisfatórias para os níveis de concentração, levando em conta o uso no preparo de amostras de procedimento hifenado de duas extrações em amostras de matrizes complexas onde ocorre competição entre os analitos e os interferentes da matriz pelo solvente extrator⁶¹.

5.5.5. Curva analítica

Os valores dos coeficientes da regressão polinomial, obtida para as seis amostras (R1, R2, R3, C1, C2 e C3) estão mostrados na Tabela 13. Os coeficientes de determinação (R^2) da regressão polinomial (a, b e c = intercepto) das seis amostras e do padrão de formaldeído derivatizado estão apresentados na Tabela 15. Sendo as curvas R2 e C1 não apresentaram um bom coeficiente de regressão $R^2 < 0,99$ e as curvas R1, R3, C2 e C3 coeficientes $R^2 > 0,99$.

Tabela 13: Valores dos coeficientes das curvas analíticas das amostras R1, R2, R2, C1, C2, C3 e do padrão de FA-DNPHo em meio de solvente acetonitrila/metanol 7:3, obtidos a partir da dispersão dos dados gerando equações e coeficientes de regressão quadrática $c =$ Intercepto; $a =$ coeficiente quadrático, $b =$ coeficiente angular e valores das concentrações de formaldeído encontradas através das equações nas amostras de esmaltes ($C_{amostra}$).

Amostras de esmaltes	Modelo: Polinomial	Valor	R²	C_{amostra}
	Intercepto	7600,17		
R1	b	1287340,00	0,99594	0,0059
	a	-139423,84		
	Intercepto	21794,54		
R2	b	1350110,00	0,9397	0,0159
	a	-910690,45		
	Intercepto	3633,85		
R3	b	1460500,00	0,99727	0,0024
	a	-861358,41		
	Intercepto	103774,82		
C1	b	1296860,00	0,94316	0,0764
	a	-821201,06		
	Intercepto	60051,94		
C2	b	1204530,00	0,99693	0,1239
	a	-255091,51		
	Intercepto	84241,75		
C3	b	1258440,00	0,99906	0,0648
	a	-627277,29		
	Intercepto	4502060,00		
Curva em solvente hexano/acetonitrila (1:9 v/v)	b	161578000,00	0,9934	-
	a	-27897000,00		

Observa-se para todas as amostras analisadas, que houve intercepto no eixo y, o que demonstra a presença de formaldeído, como calculado e mostrado na última coluna da Tabela 13. A menor concentração de formaldeído encontrada foi para a amostra R1 e a maior para a amostra C2. Apesar das amostras serem hipoalergênicos, ou seja, os fabricantes dizem ser isentas de formaldeído, todas as

amostras analisadas mostraram a presença do analito de interesse neste trabalho. No entanto, para a ANVISA, concentrações abaixo de 0,05% não precisam ser indicadas no rótulo⁷. Desta forma, as amostras de marca R, estão dentro das especificações, apresentando concentrações iguais 0,0059; 0,0159 e 0,0024% m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte) para R1, R2 e R3, respectivamente. No entanto, as amostras de marca C apresentaram concentrações iguais 0,0764; 0,1239 e 0,0648% m/m para C1, C2 e C3, respectivamente, ou seja, apresentam concentração de formaldeído acima do permitido para amostras hipoalergênicas, que estão irregular quanto às informações contidas em seus rótulos. O método para a extração do formaldeído em todas as amostras de esmaltes analisadas neste trabalho proporcionou a obtenção de informações sobre indícios de que o público consumidor usa, infelizmente, produtos fora das especificações do rótulo e da normatização atual estabelecida pela ANVISA.

5.5.6. Limite de detecção e limite de quantificação

Para verificar os limites de detecção e de quantificação foram preparadas e injetadas triplicatas da amostra R1 sem a adição da solução formaldeído 37% (considerado branco da amostra, uma vez que a amostra é hipoalergênico). O cálculo do LOD e LOQ foi feito pelo método baseado em parâmetros da curva analítica sendo o LOD calculado pela Equação 1 (item 3.7.5) e o LOQ pela Equação 2 (item 3.7.6). A escolha do método baseado nos parâmetros da curva analítica se deve ao fato de que é estatisticamente mais confiável, quando se trabalha técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, desta forma a medição do ruído não é trivial e às vezes subjetiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector)⁶².

Foi obtido LOD igual á $0,336 \text{ mg.L}^{-1}$ e LOQ igual á $3,36 \text{ mg.L}^{-1}$, que em porcentagem correspondem á 0,0005% e 0,005%, respectivamente. A aplicação de um método requer valores de LOQ pelo menos 5% abaixo dos teores permitidos pela legislação para um composto em particular, para que se tenha uma margem de segurança na sua determinação⁵⁶. A quantidade permitida de formaldeído pela ANVISA é de 0,2 % m/m (massa de formaldeído/massa de esmalte) em esmaltes para unha. Portanto a margem de segurança de 5% abaixo dos limites regulatórios

foi alcançada, uma vez que as curvas analíticas iniciaram com nível de concentração igual a 0,05 %.

5.6.7 Análise de amostras

Após o método validado, algumas amostras de esmaltes para unha vendida no comércio local e ditos populares, foram analisadas. As amostras A1, A2 e A3, não identificavam em seus rótulos a presença de formaldeído, as amostras A4, A5, A6, A7, A8 e A9 identificavam em seus rótulos a presença de formaldeído. A Tabela 14 mostra as concentrações obtidas das análises dos nove diferentes amostras esmaltes para unha.

Tabela 14: Concentração das nove diferentes tipos e coloração das amostras de esmaltes para unha.

Amostras	C _{FA-DNPHo} (%)	Tipos de esmalte	Colorações
A1	<LOD	Creoso	Azul
A2	<LOD	Cintilante	Branco
A3	<LOD	Cintilante	Roxo
A4	0,0545	Creoso	Bege
A5	0,0503	Cintilante	Verde
A6	0,5257	Creoso	Vermelho
A7	0,3209	Perolado	Rosa
A8	0,2443	Creoso	Vermelho
A9	0,1366	Creoso	Rosa

Analisando a Tabela 14, as amostras A1, A2 e A3 estão dentro das especificações e apresentaram a menor quantidade de formaldeído, tendo em vista o limite de detecção encontrado no método, pode-se dizer que elas estão com concentrações de formaldeído menores que o permitido pela legislação. Já as amostras A4, A5 e A9 estão dentro das especificações permitidas pela ANVISA, as quais apresentaram concentrações inferiores a 0,2% e por terem concentrações maiores que 0,05% tem-se a identificação nos rótulos. Observa-se ainda que as três amostras A6, A7 e A8 apresentaram concentrações maiores que o limite de concentração permitido pela ANVISA de 0,2% m/m. O método para a extração do formaldeído em todas as amostras de esmaltes analisadas neste trabalho

proporcionou a obtenção de informações sobre indícios de que o público consumidor usa, infelizmente, alguns produtos fora das especificações do rótulo e da normatização atual estabelecida pela ANVISA.

6. CONCLUSÃO

A metodologia de preparo de amostras para esmaltes proposta por este trabalho mostrou-se eficaz para a extração de formaldeído derivatizado com 2,4-DNPH, por meio do hifenamento das metodologias QuEChERS e SPE. Os planejamentos experimentais multivariados (usados na triagem e metodologia de superfície de resposta) permitiram obter a indicativa de uma condição ótima de extração de formaldeído derivatizado, que proporcionou um aumento significativo nas áreas de pico cromatográfico. Assim, a extração se mostrou eficiente para garantir a qualidade das análises. Todos os parâmetros de validação avaliados para o método analítico proposto foram considerados satisfatórios por atenderem as especificações estabelecidas pelas orientações para validação de método da ANVISA e do INMETRO. Portanto, o método aqui desenvolvido pode ser considerado específico, preciso e seletivo para ensaios para determinação de teores de formaldeído derivatizado. Ao se aplicar o método em amostras de esmaltes hipoalergênicos observou-se presença do formaldeído em todas as amostras analisadas, sendo que para uma das marcas avaliadas (amostras C), as amostras encontram-se fora das especificações (ou seja, estão acima de 0,05% m/m e teriam que constar do rótulo). Dentre as amostras não hipoalergênicos analisadas, 3 amostras estão fora das especificações (ou seja, acima de 0,2% m/m). Portanto foi possível avaliar o formaldeído em diferentes tipos de marcas e amostras de esmaltes vendidas no mercado, e assim colaborar com dados oficiais para os órgãos competentes e para o público consumidor do produto. Infelizmente, resultados indicadores aqui, mostram o descaso de alguns dos fabricantes, que produzem produtos fora das especificações, e que podem ser causadores de doenças graves, como o câncer. Sendo assim, este trabalho contribui para uma nova abordagem de preparo de amostras complexas, como é o caso de esmaltes para unha, na determinação de formaldeído.

REFERÊNCIAS

1. ACIEG. Indústria da beleza deve movimentar R\$ 20 bi. Disponível em: <<http://acieg.com.br/industria-da-beleza-deve-movimentar-r-20-bi/>> Acesso em: 9 de agosto de 2016.
2. ABIHPEC. Disponível em: < www.abihpec.org.br>. Acesso em: 09 agosto de 2016.
3. Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO - RDC Nº 211, DE 14 DE JULHO DE 2005. Disponível em < <http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/f3fb0-Rdc-211.pdf>>. Acesso em 09 de outubro de 2016.
4. ANVISA. *Consumo e Saúde: Cuidado na Escolha dos Esmaltes*. 2010 Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111522/2783489/Consumo+e+Sa%C3%BAde+Mar%C3%A7o+2014+-+Ano+7+-+N%C2%BA+34/316e08fb-b90e-457e-989a-201366fc0568.2014>>. Acesso em 02 de Agosto de 2016.
5. CAPANEMA, Z. X. L; VELASCO, L. O. M.; FILHO, P. L. P.; NOGUTI, M. B. "Panorama da Industria de Higiene Pessoal, Perfumaria e cosméticos. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, v. 25, p 131-156, 2007.
6. HADDAD, E. B. A Química dos Esmaltes. Disponível em :<<http://quimicainsa.blogspot.com.br/2012/08/a-quimica-nos-esmaltes.html>> Acesso em: 02 de junho de 2016.
7. OLIVON, B.; *O promissor mercado dos esmaltes*. Disponível em: < <http://exame.abril.com.br/negocios/noticias/promissor-mercado-esmaltes-594177>> Acesso em: 02 de Agosto de 2016.
8. MENEZES,T. Fabricantes brasileiros são obrigados a reduzir ou retirar dos produtos compostos associados a males como alergia e tumores. Disponível em : <http://www.istoe.com.br/reportagens/243322_ESMALTES+TOXICOS>. Acesso em: 02 de junho de 2015 .
9. OSÓRIO, V. M. *Desenvolvimento de método para análise de acroleína-2,4-Dinitrofenilhidrazina em alimento, ar expirado e ar ambiente utilizando SPME-GC/MS*. 2012. 95p. Tese de Doutorado, Belo Horizonte, Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Minas Gerais.
10. VELOSO, M.C.C; SILVA, V. M.; SANTOS, G. V.; J. B. Andrade. *Determination of Aldehydes in Fish by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science*. 39. 2001.Instituto Nacional Do Câncer (INCA). Formol ou Formaldeído. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=795#topo> .

Acesso em 06 de agosto de 2014.

11. PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. *QuEChERS – Um Método Moderno de Preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
12. MOREIRA, R. P. L. *Desenvolvimento e Validação de Métodos Multirresíduos para Determinação de Medicamentos Veterinários em Alimentos e em Ração Utilizando CL-EM/EM*. 2012. 161p. Tese de Doutorado, Belo Horizonte, Programa de Pós –Graduação em Química- UFMG.
13. CESTEB: Ficha de informação toxológica. Formaldeído Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/formaldeido.pdf>>. Acesso em: 02 de junho de 2015.
14. Portal Educação. Formol ou Formaldeído Disponível em : <<https://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/357/formol-ou-formaldeido>> Aceso em: 09 de outubro de 2016.
15. ALVES, C.A.; ACILE, S. D. G. “Formaldeído em escolas: uma revisão” *Química Nova*, 25 (10), 2025-2029, 2012.
16. Instituto Nacional Do Câncer (INCA). Formol ou Formaldeído. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=795#topo> . Acesso em: 06 de agosto de 2014.
17. LONTA, L. M. P. Efeitos tóxicos do formaldeído em escova progressiva *in*: 10º Congresso de Pós-Graduação: Qualificação e expansão da educação superior no contexto do Plano nacional da educação. UNIMEP (Universidade Metodista de Piracicaba). 2012.
18. LORENZINI, S. Efeito adverso da exposição ao formaldeído em cabelereiros. 2012. 77p. Tese de Doutorado, Rio Grande do Sul, Programa de pós-graduação em ciências pneumológicas, Universidade do Rio Grande do Sul.
19. VIEGAS, S. P. C. *Estudo da exposição profissional a formaldeído em laboratórios hospitalares de anatomia patológica*. 2010. 280 p. Tese de Doutorado, Lisboa, Programa de pós graduação em saúde pública, Universidade Nova de Lisboa.
20. IARC, M. 1995. *Analytical Methods formaldehyde*. Chemical and phisycal date, v.88, p. 39-93.
21. Occupational Safety and Health Administration (OSHA). 2011. Hair Smoothing Products That Could Release Formaldehyde. Disponível em :

< https://www.osha.gov/SLTC/formaldehyde/hazard_alert.html > Acesso em: 10 de outubro de 2016

22. Report on Carcinogens Background Document for Formaldehyde . 2009. National Toxicology Program (NTP). Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/2009/november/background/formaldehydedraftbackgrounddocument.pdf> > Acesso em: 10 de outubro de 2016
23. Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO - RDC Nº 15, DE 26 DE MARÇO DE 2013. Disponível em < <http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/ae972-Rdc-15.pdf>>. Acesso em 09 de outubro de 2016.
24. Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO - RDC Nº 36, DE 05 DE JUNHO DE 2009. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0036_27_06_2012.html>. Acesso em: 10 de outubro de 2016.
25. RIVEIRO, R. T.; Topiwala, V. Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using combined headspace-solid-phase microextraction-gás chromatography. *Journal of Cosmetics Science*, v. 55, n. 4, p. 340-355, 2004.
26. BIANCHI F., Careri M., Musci M., Mangia A. Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fishspecies by SPME extraction and GC–MS analysis . *Elsevier: Food Chemistry*, v. 100, n. 2007, p. 1049–1053, 2005.
27. TRENHOLM R. A.; Rosario-Ortiz F. L.; Snyder S. A. *Analysis of formaldehyde formation in wastewater using on-fiberderivatization–solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A*, 1210. 25–29. 2008.
28. CHEN, L.; Jin, H.; Wang, L.; Sun, L.; Xu, H.; Ding, L.; Yu, A.; Zhang, H. Dynamic ultrasound-assisted extraction coupled on-line with solid support derivatization and high-performance liquid chromatography for the determination of formaldehyde in textiles. *Journal of Chromatography A*, v.1192, n.1, p. 89-94, 2008.
29. LAVILLA, I.; CABALEIRO, N.; PENA, F.; DE LA CALLE, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted emulsification microextraction with simultaneous derivatization coupled to fibre optics-based cuvetteless UV-vis microspectrophotometry for formaldehyde determination in cosmetic samples. *Analytica Chimica Acta*, v.674, p. 59-63, 2010.
30. XU X.; RUI S.; XIN Z.; ZHUANG L.; DAN L.; XUEYUAN L.; HANQI Z.; ZIMING W. “Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction

- followed by high-performance liquid chromatography” . *Talanta*, v. 85, p. 2632–2638, 2011.
31. DENG, B.; LIU, Y.; YIN, H., NING, X., LU, H., YE, L., XU, Q. Determination of ultra-trace formaldehyde in air using ammonium sulfate as derivatization reagent and capillary electrophoresis coupled with on-line electrochemiluminescence detection. *Talanta*, v. 91, p. 128– 133, 2012.
 32. SILVEIRA, D.; FERNANDES, J. O.; PEREIRA, E. A. Avaliação de diferentes reagentes colorimétricos para a determinação de formaldeído em amostras de ar em ambientes internos. *Química Nova*, v. 38, n. 6, p. 842-847, 2015.
 33. LOBO, F. A.; SANTOS, T.M. O.; VIEIRA, K. M.; OSÓRIO, V. M.; TAYLOR, J. G. Determination of formaldeyde in hair creams by gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, DOI 10.1002/dta.1808, 2015.
 34. COLLINS, C. H.; BRAGA. G. L.; BONATO. P. S. 2007. *Fundamentos de Cromatografia*. Ed. UNICAMP: Campinas, 453 p.
 35. LANÇAS, F. M. 2004. *Validação de métodos cromatográficos de análises*. São Paulo: editora Rima. 46 p.
 36. VIEIRA, K. M. “*Aplicação dos processos oxidativos, redutivo e (foto) eletroquímicos na degradação de fármacos em meio aquoso*”. 2011. 147 p. Teses de Doutorado. Belo Horizonte, Instituto De Ciências Exatas Departamento De Química, Universidade Federal de Minas Gerais.
 37. SKOOG, D. A.; HOLLER. F. J.; NIEMAN, T. A.; 2002. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª Ed. Ed.Bookman: Porto Alegre, 836 p.
 38. RIBANI, M.; BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G., COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. “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.
 39. XU, X.; ZHANG, X.; DUHORANIMANA, E.; ZHANG, Y.; SHU, P. *Determination of methenamine residues in edible animal tissues by HPLC-MS/MS using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in actual samples*. *Food Control*, v. 61, n.1, p. 99-104, 2016.
 40. RIVEROS, A. C. G; PESSOLATO, A. G. T.; RODRIGUEZ, M. G. P.; MARIA, D. A. Análise de pesticidas por espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa (CG-EM). *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, p. 2008-20018, 2012.
 41. AZEVEDO, L.C. Estudo de compostos carbonílicos e os seus respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos em vinhos. 2007.177p. Tese de Doutorado, Salvador,

Programa de pós-graduação em química, Universidade federal da Bahia.

42. 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.
43. RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in Orange juice by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, v. 196, p. 1, p. 25–33, 2016.
44. ZAMARREÑO, M. M. D.; PRIETO, C. F.; RANGEL, M. B.; MARTÍN, L. P. Determination of tocopherols and sitosterols in seeds and nuts by QuEChERS-liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 192, p. 825–830, 2016.
45. SHENDY, A. H.; AL-GHOBASHY, M. A.; ALLA, S. A. G.; LOTFY, H. M. Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey. *Food Chemistry*, v. 190, n.1, p. 982–989, 2016.
46. OLIVEIRA, E. C. Aplicação da extração em fase sólida na pré- concentração de compostos fenólicos clorados de branqueamento de celulose. 1999. 78p. Dissertação de Mestrado, Curso de pós- graduação em química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
47. JARDIM, I. C. S. F. *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
48. DONATO, F. F. Resíduos de agrotóxicos em água potável usando SPE e determinação rápida por LC-MS/MS e CG-MS/MS. 2012. 148p. Dissertação de Mestrado, Santa Maria, Programa de Pós –Graduação em Química- UFSM
49. FREITAS, P.A. M. Estudos de adsorção de DI-2-Piridilcetona salicilohidrazona (DPKSH) em resinas amberlite XAD-2 e XAD-7. Extração de íons cobre em fase sólida envolvendo a XAD-7 modificada com DPKSH. 2007. 196p. Tese de Doutorado, Programa de pós-graduação em química- USP.
50. GOMES, R. F. Avaliação de Compostos Orgânicos Semi-Voláteis em Amostras de Águas subterrâneas via CG/EM utilizando Microextração Líquido-Líquido Dispersivo-DLLME. 2014. 107p. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo.
51. BIANCHIN, J. N.; MIOR R.; MARTENDAL, E. ; CARLETTO E E. CARASEK J. S.

Otimização multivariada e aplicação do sorvente SiO₂-Nb₂O₅ para determinação em linha de Ni(II) em matriz aquosa

52. CAMPOS, L. F. A.; MENEZES, R. R. D.; LISBOA, L. N. L.; SANTANA, G. A.; NEVES, H. C. FERREIRA. "Planejamento experimental no estudo da maximização do teor de resíduos em blocos e revestimentos cerâmicos". *Cerâmica*, v. 53, p. 373-380, 2007.
53. TEÓFILO, R. F.; Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
54. SANTOS, L. M. G.; GONÇALVES, J. M.; JACOB, S. C. *Determinação simultânea de as, cd e pb em amostras de água purificada para hemodiálise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, após otimização multivariada baseada no uso de planejamento experimental*. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 975-979, 2008.
55. RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C. L.; SILVA, R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
56. FABRINO, H. J. F. *Emprego de otimização multivariada no desenvolvimento de métodos para determinação de metais de interesse em soro e sangue integral humanos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite*. 2008. 197p. Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.
57. VALESE, A. C. *Desenvolvimento, Otimização E Validação De Método Rápido Para Análise Simultânea De Fenilalanina, Triptofano, Histidina E Tirosina Em Cereais Por Cromatografia Eletrocínética Micelar*. 2012.182p. Dissertação de Mestrado, Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina.
58. ÁVILA, M. B. R.; FARONI, L. R. A.; HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; MOURA, V. V.; PRATES, L. H. *Otimização e Validação dos Parâmetros da ESL/PBT para Análise de Bifentrina e Deltametrina em Arroz Armazenado por CG/DCE* In: Conferência Brasileira pós-Colheita, 6, 2014, Maringá. Anais. Londrina: ABRAPOS, 2014. 833 p.il.
59. OLIVEIRA, T. C. *Otimização Multivariada E Validação De Métodos Para A Determinação De Boro, Enxofre, Fósforo E Molibdênio Em Fertilizante Mineral Por ICP OES*. 2016. Tese de Doutorado, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
60. BARROS, A. L. C. *Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido*

com partição a baixa temperatura para a análise de agrotóxicos via UHPLC-ESI-MS/MS em águas superficiais em Ouro Branco/MG. 2014. 133p. Dissertação de Mestrado, Ouro Preto, Programa de pós-graduação em engenharia ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto.

61. SANTANA, R. A. C.; OLIVEIRA, A. L. M.; CAMPOS, A. R. N.; PRASAD, S. Otimização das condições operacionais para eletrodeposição da liga Co-Mo, utilizando planejamento experimental. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, n. 1, p. 01-09, 2007.
62. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO - RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003: Guia Para Validação De Métodos Analíticos E Bioanalíticos. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 10 de Outubro de 2016
63. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). DOQ-CGCRE-008. Revisão 05. Agosto de 2016. Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos.
64. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
65. BANDEIRA, C. M. Desenvolvimento e validação de um método para determinação de colesterol em farinha de carne e ossos em mistura de alimentos para ruminantes utilizando cromatografia gasosa. 2007. 81p. Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
66. CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas". *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.
67. SALAZAR, V.C.R. Desenvolvimento de Método Analítico por Cromatografia Gasosa acoplada á Espectrometria de Massas para a identificação e quantificação de antoxicina - σ em amostras de água e florações algais. 2006. 98p. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Programa de Pós-Graduação em toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo.
68. BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. *Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão*. Pesticidas: Ecotoxicol. E meio ambiente, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 129-146, 2003. .

69. GOMES, R. F. Avaliação de Compostos Orgânicos Semi-Voláteis em Amostras de Águas subterrâneas via CG/EM utilizando Microextração Líquido-Líquido Dispersivo-DLLME. 2014. 107p. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo.
70. PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.
71. VAN EECKHAUT, A.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 877, n. 23, p. 2198–2207, 2009.
72. TAYLOR, P. J. *Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry*. *Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 4, p. 328–334, 2005.
73. PETERS, F. T.; REMANE, D. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography–mass spectrometry to forensic and clinical toxicology—a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 403, n. 8, p. 2155–2172, 2012.
74. REMANE, D.; WISSENBACH, D. K.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Systematic investigation of ion suppression and enhancement effects of fourteen stable-isotope-labeled internal standards by their native analogues using atmospheric-pressure chemical ionization and electrospray ionization and the relevance for multi-anal. *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 24, n. 1, p. 859–867, 2010.
75. BANDEIRA, C. M. *Desenvolvimento e validação de um método para determinação de colesterol em farinha de carne e ossos em mistura de alimentos para ruminantes utilizando cromatografia gasosa*. 2007. 83p. Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte, Programa de pós-graduação Medicina Veterinária, Universidade de Federal de Minas Gerais.
76. ANJOS, A. Análise de Variância. Disponível em: <<http://www.est.ufpr.br/ce003/material/cap7.pdf>>. Acesso em: 18 de out. de 2016.
77. OLIVEIRA, A. F. G. Testes estatísticos para comparação de médias. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 5, n. 6, p.777-788, 2008.
78. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. DOQ-CGCRE-008, Rev. 05, p. 31, 2016.
79. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RE nº 899, de 29*

de maio de 2003. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2002/475_02re.htm>
Acesso em: 18/10/2016

80. FERREIRA, C. F., ALEXANDRE, S. G.; P. Marta. *Cromatografia gasosa-espectrometria de massas e derivatização assistida por micro-ondas na identificação de isômeros de glicose: uma prática para o ensino avançado em análise e caracterização de compostos orgânicos*. *Química Nova*, v. 37, n. 1, p. 176-180, 2014.
81. MAIDANA, F. R. R. Controle da carga poluente de formaldeído em efluente de laboratório de anatomia, por CLAE, após derivatização com 2,4-Dinitrofenilhidrazina. 2008. 68p. Dissertação de Mestrado, Santa Cruz do Sul, Programa de pós-graduação em tecnologia ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul.
82. FOGAÇA, J. R. V. *Moléculas orgânicas polares e apolares*. 2016. Acesso em: 13 de julho de 2016. Disponível em: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/moleculas-organicas-polares-apolares.htm>>.
83. FARIA, R. C. M.; REZENDE, M. J. C.; REZENDE C. M.; PINTO, A. C. *Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas*. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1900-1905, 2007.
84. BIANCHI, F. *Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC– MS analysis*. *Food Chemistry*, v. 100, n.3, p. 1049-1053, 2007.
85. YOUNG, M. S. Certified Sep-Pak Florisil for Sample Cleanup Organochlorine Pesticides and PCBs. *Waters Corporation, USA*, 3p. , 2013.
86. RODRIGUES, K.L.T., et al., *Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT- TOF- HRMS*. *Microchemical Journal*, v. 117, p. 242-249, 2014.
87. CÉSAR, I. C. *Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano*. Tese de Doutorado, 2009. 273p. Belo Horizonte, programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais.
88. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. “Métodos de Extração E/Ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para posterior Determinação Cromatográfica”. *Química Nova*, 24 (1), 68-76, 2001.

89. MORAIS, E. H. C.; BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. S. F. “Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo”. *Scientia Chromatographica*, v. 5, n. 2, p. 146-162, 2013.
90. CABRERA, L. C.; MARTINS M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.
91. Coutrin, M. X. Avaliação da Separação da 2,4-Dinitrofenil-Hidrazona (DNFHo) de Aldeídos e Cetonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE. 1991. 145p. Dissertação de Mestrado, Campinas, Instituto de Química-UNICAMP.
92. Ramella, J. C. Comparação das Metodologias de Extração no Ponto Nuvem e Extração em Fase Sólida para determinação de Cádmio em amostras de água. 2009. 58p. Dissertação de Mestrado, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
93. Phenomenex[®]. Chromatography Product Guide . *HPLC;GC e SPE*. 2010. 10 (11): p. 408.
94. SILVA, G. A. *Utilização de metodos quimiometricos em cromatografia gasosa com microextração em fase solida ; Utilization of chemometric methods in gas chromatography with solid phase microextraction*, P. Ronei Jesus, et al., Editors. 2007, Universidade Estadual de Campinas ; Instituto de Química.
95. RODRIGUES, K. L. T., et al., Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT- TOF- HRMS. *Microchemical Journal*, v. 117, p. 242-249, 2014.
96. Soares, I. A. S. P.; Araujo, L. V. S.; Vanzellotti, C. A. Práticas e Significados Relacionados ao Consumo de Esmaltes: uma Netnografia. *In: XXXVIII Encontro da ANPAD*, Rio de Janeiro, setembro de 2013, p. 1-16, 2013.
97. Lonta, L. M. P. *Efeitos tóxicos do formaldeído em escova progressiva* in: 10º Congresso de Pós-Graduação: Qualificação e expansão da educação superior no contexto do Plano nacional da educação. UNIMEP (Universidade Metodista de Piracicaba). 2012.
98. VIGNA, C. R. M. Aplicação de polissiloxanos imobilizados sobre sílica como fase estacionária e coo sorvente na determinação de agrotóxicos em água e caldo de cana. 2010. 137p. Tese de Doutorado, Departamento de química analítica-UNICAMP.
99. Capanema, L. X. L.; Velasco, L. O. M.; Filho, P. L. P.; Noguti, M. B. Panorama da

indústria de higiene pessoal, Perfumaria e cosméticos. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n. 25, p. 131-156, mar. 2007.

- 100.** SILVA, J. G. C. Estatística Experimental: Planejamento de Experimentos. 2007. 511p. Instituto de Física e Matemática Departamento de Matemática e Estatística Universidade Federal de Pelotas.