

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

CAMILA DE FÁTIMA GARCIA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE TRICLOSAN E TRICLOCARBAN EM PRODUTOS DE
HIGIENE PESSOAL

PONTA GROSSA

2022

CAMILA DE FÁTIMA GARCIA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE TRICLOSAN E TRICLOCARBAN EM PRODUTOS DE
HIGIENE PESSOAL

Dissertação apresentada para a obtenção
do título de Mestre em Química Aplicada no
Programa de Pós-Graduação em Química
Aplicada da Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Patrícia Los
Weinert

PONTA GROSSA

2022

G216 Garcia, Camila de Fátima
Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a
determinação de Triclosan e Triclocarban em produtos de higiene pessoal /
Camila de Fátima Garcia. Ponta Grossa, 2022.
98 f.

Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Los Weinert.

1. Triclosan. 2. Triclocarban. 3. CLAE. 4. Espectrofotometria uv-visível. 5.
Planejamento experimental. I. Weinert, Patrícia Los. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Química. III.T.

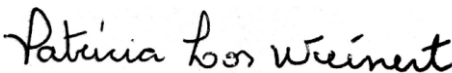
CDD: 543.8


TERMO DE APROVAÇÃO


CAMILA DE FÁTIMA GARCIA

“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE TRICLOSAN E TRICLOCARBAN EM PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora: 
Profa. Dra. Patrícia Los Weinert
UEPG/PR


Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner
UNICENTRO/PR


Profa. Dra. Elaine Regina Lopes Tiburtius
UEPG/PR

Ponta Grossa, 08 de março de 2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me sustentar e me proteger nos momentos mais difíceis.

À toda a minha família, em especial, à minha mãe Rosi e meu marido Rohney, pelo apoio e incentivo em todas as situações sendo elas boas ou ruins, além do auxílio nos cuidados com a minha filha Isadora.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Patrícia Los Weinert pela disposição, atenção e paciência em me ensinar. Também pela companhia em plena pandemia onde quase não tínhamos contato com outras pessoas.

À todos os professores das disciplinas ministradas durante a pós graduação. Em especial à Prof^a Elaine Regina Lopes Tiburtius e ao Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos pela participação em minha banca de qualificação, seus apontamentos e sugestões foram muito importantes para a continuação do trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios do departamento de Química, pela dedicação em ajudar.

À CAPES pelo apoio financeiro e ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG pela disponibilidade de equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.

Ao GDMIT pela oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que fizeram parte de mais essa etapa da minha vida.

RESUMO

Triclosan e triclocarban são utilizados em produtos de cuidados pessoais como sabonetes, desodorantes, pastas de dente enquanto agentes antimicrobianos a fim de conservá-los. O objetivo deste trabalho foi desenvolver dois métodos analíticos através de duas técnicas diferentes utilizando planejamentos experimentais. A CLAE foi empregada para a determinação de triclosan e triclocarban simultaneamente e a espectrofotometria UV-Visível para a determinação de triclosan, ambas aplicadas a produtos de cuidados pessoais. Para o método cromatográfico a partir de um planejamento Doehlert as condições foram otimizadas obtendo a condição ótima com a coluna C18 de 250 mm, fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $40,0^\circ\text{C}$, a fase móvel foi metanol:água na proporção 80:20 (v/v). Para o método espectrofotométrico, a triagem das variáveis com efeitos significativos foi investigada por um planejamento fatorial completo 2^3 seguido de um planejamento composto central a fim de encontrar a condição ótima para a reação de formação do composto colorido gerado com o triclosan, detectável no espectrofotômetro de absorção no UV-Visível. Encontrou-se a concentração de sulfanilamida de 0,088% e o ácido clorídrico de $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ como condição ótima para o melhor valor de absorbância. Ambos os métodos foram validados seguindo os parâmetros estabelecidos pela Anvisa estando todos dentro dos padrões recomendados. A faixa linear foi de $1,00\text{-}10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para o TCS e TCC na CLAE e de $0,050\text{-}10,0$ para o TCS na espectrofotometria de UV-Visível com os coeficientes de correlação superiores a 0,99 e limites de detecção de $0,011 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para o TCS e $0,29 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para o TCC por CLAE e de $0,018 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para o TCS por UV-Visível. Os métodos foram empregados na determinação dos analitos em produtos de higiene pessoal obtendo recuperações dentro dos limites exigidos com desvios abaixo de 5% podendo ser aplicados às amostras analisadas com exatidão e precisão adequada. Todas as amostras contendo TCS estavam com concentrações em torno do valor de 0,3% conforme a legislação e a amostra contendo TCC apresentou valor acima do recomendado pelo órgão competente.

Palavras-chave: triclosan, triclocarban, CLAE, espectrofotometria de absorção no UV-Visível, planejamento experimental, função de desejabilidade, validação de métodos analíticos, produtos de higiene e cuidados pessoais.

ABSTRACT

Triclosan and triclocarban are used in personal care products like soaps, deodorants, toothpastes as antimicrobial agents in order to preserve them. The objective of this work was to develop two analytical methods through two different techniques using experimental designs. HPLC was used for the determination of triclosan and triclocarban simultaneously and UV-Visible spectrophotometry for the determination of triclosan, both applied to personal care products. For the chromatographic method from a Doehlert design, the conditions were optimized obtaining the optimal condition with a 250 mm C18 column, flow of 0.8 mL min⁻¹ and temperature of 40.0°C, the mobile phase was methanol: water in the ratio 80:20 (v/v). For the spectrophotometric method, the screening of variables with significant effects was investigated by a complete 2³ factorial design followed by a central composite design in order to find the optimal condition for the formation reaction of the colored compound generated with triclosan, detectable in the spectrophotometer of UV-Visible absorption. Sulfanilamide concentration of 0.088% and hydrochloric acid of 0.038 mol L⁻¹ were found to be the optimal condition for the best absorbance value. Both methods were validated following the parameters established by Anvisa, all being within the recommended standards. The linear range was 1.0-10 µg mL⁻¹ for TCS and TCC in HPLC and 0.050-10 for TCS in UV-Visible spectrophotometry with correlation coefficients greater than 0.99 and detection limits of 0.011 µg mL⁻¹ for TCS and 0.29 µg mL⁻¹ for TCC by HPLC and 0.018 µg mL⁻¹ for TCS by UV-Visible. The methods were used in the determination of analytes in personal hygiene products, obtaining recoveries within the required limits with deviations below 5%, being able to be applied to the analyzed samples with accuracy and adequate precision. All samples containing TCS had concentrations around the value of 0.3% according to the legislation and the sample containing TCC presented a value above that recommended by the competent body.

Keywords: triclosan, triclocarban, HPLC, UV-Visible absorption spectrophotometry, experimental design, desirability function, validation of analytical methods, hygiene and personal care products.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura do triclosan. | 19 |
| Figura 2- Estrutura do triclocarban. | 20 |
| Figura 3 - Esquema do equipamento da CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector; f) registrador. . | 24 |
| Figura 4 - Número de publicações referenciadas pelo Science direct desde 2011 com o termo de pesquisa “design of experiments” ou “experimental design” e “chromatography” (pesquisa realizada em 13.01.2022) | 28 |
| Figura 5 - Mecanismo proposto para a reação de diazotação do triclosan. | 38 |
| Figura 6 - Gráfico de Pareto para o tempo de retenção do TCS. | 52 |
| Figura 7 - Gráfico de Pareto para a área do pico do TCC. | 53 |
| Figura 8 - Gráfico de Pareto para a resolução entre os picos com a coluna de 250 mm. | 54 |
| Figura 9 - Superfície de resposta para a desejabilidade com a coluna de 250 mm. . | 57 |
| Figura 10 - Gráfico de Pareto para o tempo de retenção do TCC para a coluna de 150 mm. | 57 |
| Figura 11 - Gráfico de Pareto para a área do pico do TCC para a coluna de 150 mm... .. | 58 |
| Figura 12 - Gráfico de Pareto para a área do pico do TCS para a coluna de 150 mm... .. | 58 |
| Figura 13 - Gráfico de Pareto para a resolução entre os picos de TCS e TCC para a coluna de 150 mm. | 59 |
| Figura 14- Superfície de resposta para a desejabilidade para a coluna de 150 mm. | 61 |
| Figura 15 - Cromatograma para a coluna de 150 mm..... | 62 |
| Figura 16 - Cromatograma para a coluna de 250 mm..... | 62 |
| Figura 17 - Gráfico dos valores anômalos encontrados no Teste de Huber..... | 65 |
| Figura 18 - Curva analítica para o TCS..... | 66 |
| Figura 19 - Gráfico dos valores anômalos encontrados pelo teste de Huber para o triclocarban..... | 68 |
| Figura 20 - Curva analítica para o triclocarban..... | 69 |
| Figura 21 - Mecanismo proposto para a reação de diazotação do triclosan. | 76 |
| Figura 22 - Estabilidade óptica do produto formado após a reação de diazotação do triclosan. | 77 |

| | |
|---|----|
| Figura 23 - Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2^3 | 79 |
| Figura 24 - Superfície de resposta para a otimização do método espectrofotométrico..... | 81 |
| Figura 25 - Curva analítica do triclosan pelo método espectrofotométrico..... | 82 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do triclosan..... | 19 |
| Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do triclocarban..... | 21 |
| Tabela 3 - Trabalhos encontrados na literatura para determinação de TCS e TCC por cromatografia líquida de alta eficiência. | 41 |
| Tabela 4 - Resultados obtidos para o planejamento Doehlert com a coluna C18 de 250 mm. | 51 |
| Tabela 5 - Resultados obtidos para o planejamento Doehlert com a coluna C18 de 150 mm. | 51 |
| Tabela 6 - Análise de variância do planejamento Doehlert para a coluna de 250 mm..... | 55 |
| Tabela 7 - Condições ótimas de fluxo e temperatura para cada resposta analisada para coluna de 250mm..... | 56 |
| Tabela 8 - Função de desejabilidade para a coluna de 250 mm. | 56 |
| Tabela 9 - Análise de variância do planejamento Doehlert para a coluna de 150 mm..... | 59 |
| Tabela 10 - Condições ótimas de fluxo e temperatura para cada resposta analisada para coluna de 150mm..... | 60 |
| Tabela 11 - Função de desejabilidade para a coluna de 150 mm. | 61 |
| Tabela 12 - Dados obtidos pelo Teste de Huber para o TCS..... | 65 |
| Tabela 13 - Áreas interpoladas, áreas experimentais e os resíduos para a curva do TCS..... | 67 |
| Tabela 14 - Análise de Variância para a regressão do triclosan. | 67 |
| Tabela 15 - Dados obtidos pelo Teste de Huber para o TCC..... | 68 |
| Tabela 16 - Análise de Variância para a regressão do triclocarban. | 69 |
| Tabela 17- Áreas interpoladas, áreas experimentais e os resíduos para a curva do TCC..... | 70 |
| Tabela 18 - Coeficientes angulares das curvas analíticas do triclosan e triclocarban..... | 70 |
| Tabela 19 - Limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico para o TCS e TCC..... | 71 |
| Tabela 20 - Comparação dos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Tabela 21 - Precisão intradia e intermediária para o triclosan e triclocarban. | 73 |
| Tabela 22 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método cromatográfico desenvolvido..... | 73 |
| Tabela 23 - Resultados de recuperação de triclocarban pelo método de adição de padrão para o método cromatográfico desenvolvido..... | 75 |
| Tabela 24- Planejamento fatorial completo 2^3 para o estudo do método espectrofotométrico..... | 78 |
| Tabela 25 - Matriz do planejamento composto central para o método espectrofotométrico..... | 80 |
| Tabela 26 - Análise de Variância para a regressão da curva do TCS via método espectrofotométrico..... | 82 |
| Tabela 27 - Comparação dos limites de detecção e quantificação do método espectrofotométrico..... | 83 |
| Tabela 28 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método espectrofotométrico desenvolvido. | 84 |
| Tabela 29 - Comparação dos parâmetros de validação entre os métodos cromatográfico e espectrofotométrico. | 87 |
| Tabela 30 - Valores de triclosan e triclocarban encontrados em amostras de produtos de cuidados pessoais pelo método cromatográfico..... | 88 |
| Tabela 31 - Valores de triclosan encontrados em amostras de produtos de cuidados pessoais pelo método espectrofotométrico. | 89 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Compostos orgânicos presentes nos produtos de cuidados pessoais. ... | 17 |
| Quadro 2 - Parâmetros avaliados de acordo com a ANVISA e o INMETRO..... | 32 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ABIHPEC | Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos |
| ACN | Acetonitrila |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| ICH | International Conference on Harmonization |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| IPT | Instituto de Pesquisas Tecnológicas |
| ISO | International Standard Organization |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| US-FDA | United Food and Drug Administration |
| UV | Ultravioleta |
| UV-VIS | Ultravioleta-Visível |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA | 14 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL..... | 16 |
| 2.2 CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE | 17 |
| 2.3 TRICLOSAN..... | 18 |
| 2.4 TRICLOCARBAN | 20 |
| 2.5 ESTRATÉGIAS E TÉCNICAS EMPREGADAS NESSE TRABALHO | 22 |
| 2.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... | 22 |
| 2.5.1.1 Parâmetros cromatográficos avaliados | 25 |
| 2.5.2 Espectrofotometria de Absorção no UV-Visível..... | 26 |
| 2.5.3 Planejamento de Experimentos..... | 26 |
| 2.5.3.1 Função de Desejabilidade | 29 |
| 2.5.4 Validação de um Método Analítico | 30 |
| 2.5.4.1 Parâmetros de desempenho | 32 |
| 2.6 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE TCC E TCS..... | 37 |
| 2.6.1 Espectrofotometria de Absorção no UV-Visível..... | 38 |
| 2.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência..... | 40 |
| 3 OBJETIVOS | 45 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 45 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 45 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 4.1 REAGENTES | 46 |
| 4.2 AMOSTRAS | 46 |
| 4.3 EQUIPAMENTOS..... | 46 |
| 4.4 MÉTODOS | 46 |
| 4.4.1 Preparo das Soluções Estoque | 46 |
| 4.4.2 Otimização das Condições Cromatográficas..... | 47 |
| 4.4.3 Formação do Composto Azo e sua Estabilidade..... | 47 |
| 4.4.4 Otimização das Condições Espectrofotométricas | 47 |
| 4.4.5 Validação dos Métodos para a Determinação de TCC e TCS | 48 |
| 4.4.6 Determinação de TCS e TCC em Amostras de Produtos de Cuidados Pessoais | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 50 |
| 5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS..... | 50 |
| 5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO | 63 |
| 5.2.1 Linearidade, Sensibilidade e Robustez | 63 |
| 5.2.2 Limites de Detecção e Quantificação | 71 |
| 5.2.3 Precisão, Exatidão e Especificidade..... | 72 |
| 5.3 FORMAÇÃO DO COMPOSTO AZO E SUA ESTABILIDADE | 76 |
| 5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS | 77 |
| 5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO | 81 |
| 5.5.1 Linearidade..... | 81 |
| 5.5.2 Limites de Detecção e Quantificação | 83 |
| 5.5.3 Precisão, Exatidão e Especificidade..... | 83 |
| 5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS PROPOSTOS | 86 |
| 5.7 DETERMINAÇÃO DE TCS E TCC POR CLAE E TCS POR UV-VIS..... | 88 |
| 6 CONCLUSÃO | 90 |
| REFERÊNCIAS..... | 92 |

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

O triclosan (TCS) e o triclocarban (TCC) pertencem a classe dos agentes antimicrobianos utilizados nos produtos de higiene pessoal para a prevenção da deteriorização desses produtos. Logo, o destino final destes compostos são os esgotos domésticos. Como os processos de coleta e tratamento, muitas vezes, não são completamente eficientes, esses compostos acabam entrando no ambiente (REICHERT et al., 2020).

Essas espécies já foram encontradas em uma ampla variedade de matrizes, águas superficiais, água potável (PADHYE et al., 2014), efluente (PINTADO-HERRERA; GONZÁLEZ-MAZO; LARA-MARTÍN, 2014), lodo de esgoto (CHEN et al., 2018), urina (Yin et al., 2015).

Triclosan e triclocarban podem gerar subprodutos de transformação durante as suas degradações que podem ser mais tóxicos e persistentes. O TCS após cloração pode gerar fenóis clorados e éteres bifenílicos, após foto oxidação pode formar dibenzodioxinas cloradas e por meio da biodegradação produzir metil triclosan (BEDOUX et al., 2011). O TCC, por sua vez, pode gerar clorobenzenos e cloroanilinas como produtos de degradação (DING et al., 2014).

Assim sendo, os órgãos regulamentadores dos produtos de higiene pessoal e cosméticos, exigem uma concentração limite destes compostos nos produtos. No Brasil, a ANVISA estabelece a concentração de 0,2 a 0,3% e 0,2% de triclosan e de triclocarban, respectivamente.

Por este motivo, surge a necessidade de métodos analíticos que possam determiná-los nesses produtos de cuidados pessoais para confirmar se essas concentrações estão sendo respeitadas. Podendo ser aplicados pelas indústrias no controle de qualidade desse tipo de produto.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector UV é uma alternativa para determinar e quantificar esses compostos simultaneamente. Além dessa vantagem, possui baixo tempo de análise devido a alta eficiência da coluna e a rapidez da vazão da fase móvel por ela, obtendo uma alta resolução entre as substâncias, desde que se tenha um método bem ajustado. O cromatógrafo é um equipamento automatizado podendo realizar todo o procedimento através de softwares trazendo mais praticidade e diminuindo erros quanto ao analista ao realizá-lo manualmente (COSTA, 2019).

Outra possibilidade para determinar o triclosan em produtos de higiene e cuidados pessoais é a espectrofotometria de absorção no UV-Visível sendo uma técnica de baixo custo operacional, de fácil utilização e possui resultados de interpretação geralmente bastante simples (GALO; COLOMBO, 2009).

Diante desse contexto, o presente trabalho propõe uma metodologia para determinação e quantificação de triclosan e triclocarban em produtos de higiene pessoal por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV e outra metodologia baseada na espectrofotometria de absorção no UV-Visível para a determinação de triclosan também em produtos de higiene e cuidados pessoais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL

A indústria de produtos de higiene juntamente com a de produtos de saúde, alimentos e bebidas, foi considerada essencial pelo governo federal através do Decreto nº 10329 de 2020 (BRASIL, 2020).

O setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC), segundo a ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos) encarrega-se de prevenir doenças, proporcionar bem-estar, fortalecer a autoestima e promover a inserção social (ABIHPEC, 2021).

Este ramo é um dos responsáveis por promover o desenvolvimento do país. O Brasil é o quarto maior mercado consumidor do mundo, o segundo maior mercado em fragrâncias, produtos masculinos e desodorantes e o terceiro mercado no ranking global de países que mais lançam produtos anualmente, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China, de acordo com os dados de mercado ABIHPEC de 2020 (ABIHPEC, 2021).

Os produtos de higiene pessoal ou de cuidados pessoais, de acordo com Daughton e Ternes (1999), podem ser definidos como produtos químicos comercializados para uso direto pelo consumidor com finalidades pretendidas principalmente no corpo humano e que não sejam destinados à ingestão. De modo geral, são produtos utilizados para alteração do odor, aparência, toque que não exibem atividade bioquímica significativa e, portanto, não são utilizados no tratamento de doenças, porém podem ter o intuito de preveni-las como, por exemplo, os agentes de filtros solares.

Outra definição encontrada está na Resolução RDC 211, de 14 de julho de 2005, da ANVISA que se refere a produtos de higiene pessoal juntamente com perfumes e cosméticos da seguinte forma:

[...] preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (BRASIL, 2005).

Esses produtos de cuidados pessoais possuem diversos grupos de compostos orgânicos, sendo as principais classes: os desinfetantes ou agentes antimicrobianos, fragrâncias, repelentes de insetos, conservantes e filtros UV (BRAUSCH; RAND, 2010). O Quadro 1 apresenta alguns exemplos dessas classes.

Quadro 1 - Compostos orgânicos presentes nos produtos de cuidados pessoais.

| Classe | Composto |
|-----------------------|---------------------------------------|
| Agente antimicrobiano | Triclosan |
| Agente antimicrobiano | Triclocarban |
| Fragrância | Galaxolida (HHCB) |
| Fragrância | Toxalida (AHTN) |
| Repelente de insetos | N,N-dietil-m-toluamida (DEET) |
| Conservante | Parabenos (alquil-p-hidroxibenzoatos) |
| Filtros UV | p-metoxicinamato de octila |
| Filtros UV | 3-(4-metilbenzilideno)-cânfora |

Fonte: Adaptado de BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environment concentrations and toxicity. **Chemosphere**, Miami, v. 82, p. 1518-1532, ago./dez. 2010.

Essas substâncias orgânicas entram no meio ambiente principalmente através das águas residuais surgindo a preocupação com a quantidade que está sendo descartada. Esses resíduos são compostos por moléculas que não sofrem alterações metabólicas devido ao seu uso externo no corpo, diferente dos medicamentos, entrando no ambiente de forma inalterada (BRAUSCH; RAND, 2010).

Peck (2006) relata que muitas dessas substâncias são persistentes, bioativas e bioacumulativas no ambiente podendo apresentar algum risco ao ecossistema.

2.2 CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE

Contaminantes de preocupação emergente são substâncias que estão sendo detectadas em diferentes matrizes ambientais (água, solo, ar), em baixas concentrações que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ e que podem apresentar algum risco ao

ecossistema, porém não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina, ou seja, não são legislados.

Ressaltando que essa denominação não é utilizada apenas para novos compostos, de acordo com Routman (2010), os contaminantes de preocupação emergente podem ser agrupados em três categorias diferentes: a primeira para compostos que foram introduzidos recentemente no ambiente, a segunda para aqueles que já estão há mais tempo no ambiente porém só agora podem ser detectados devido aos avanços nas técnicas analíticas, melhorando a sensibilidade dos equipamentos que conseguem determinar baixas concentrações e na terceira categoria estão aqueles compostos que já são conhecidos a bastante tempo mas são reconhecidos recentemente como causadores de efeitos adversos ao ambiente e as pessoas.

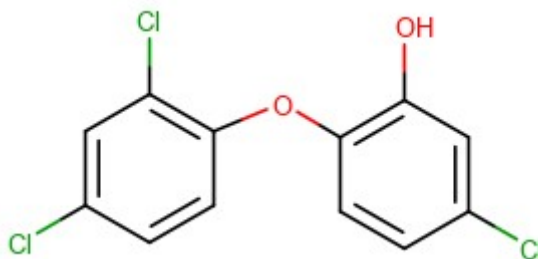
Existe uma grande variedade de compostos considerados contaminantes de preocupação emergente, sendo os fármacos e produtos de cuidados pessoais (PPCPs), compostos de desregulação endócrina (EDCs), retardadores de chama (FRs), pesticidas, e adoçantes artificiais (ASWs) e seus metabólitos (SALIMI, et al., 2017).

O triclosan e o triclocarban apresentados neste trabalho são considerados contaminantes de preocupação emergente já que não fazem parte dos compostos monitorados pelas legislações ambientais. Além de serem encontrados em baixas concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Estes também podem ser incluídos na segunda categoria dos contaminantes, pois já são utilizados há algum tempo, entretanto agora que podem ser detectados visto que muitos estudos comprovam a presença desses compostos em ambientes aquáticos no mundo inteiro.

2.3 TRICLOSAN

O triclosan (TCS), de acordo com a IUPAC 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol é um fenoxifenol clorado contendo um anel benzênico, um anel fenólico e cloros substituintes, conforme apresentado na Figura 1 e tem suas propriedades físico-químicas exibidas na Tabela 1.

Figura 1 - Estrutura do triclosan.



Fonte: A autora.

Nota: Estrutura elaborada no software MarvinSketch20.11.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do triclosan.

| | |
|----------------------|---|
| Nome (IUPAC) | 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol |
| Substância (Sigla) | Triclosan (TCS) |
| Fórmula molecular | C ₁₂ H ₉ Cl ₃ O ₂ |
| Massa molecular | 289,55 g mol ⁻¹ |
| Ponto de fusão | 180 °C |
| pKa | 7,9 |
| Solubilidade em água | 10 mg L ⁻¹ (20°C) |
| Cor | Esbranquiçado a branco |
| Aspecto físico | Pó cristalino |

Fonte: Adaptado de FANG, J et al., Occurrence, efficacy, metabolismo, and toxicity of triclosan.

Journal of Environmental Science and Health, Arkansas, v.28, p. 147-171, set. 2010 e HALDEN, R.; PAULL, D. H. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources. **Environmental Science & Technology**, Baltimore, v. 39, n. 6, p. 1420-1426, jan. 2005.

O triclosan é um agente antimicrobiano sintético que atua através da inibição da enzima acil-enoil-redutase transportadora de proteína, que catalisa um passo essencial na biossíntese de lipídeos de membranas de bactérias gram-positivas e gram-negativas e também em alguns tipos de fungos. É utilizado em produtos de cuidados pessoais como sabonetes, desodorantes, cremes para a pele, pastas de dente, detergentes para a roupa, antissépticos para tratamento de feridas, entre outros (FANG et al., 2010; HALDEN; PAULL, 2005).

Sua utilização nos produtos de higiene pessoal e cosméticos no Brasil é regulamentado através da mais recente Resolução de Diretoria Colegiada, RDC nº 528 de 04 de agosto de 2021 da ANVISA. Indicando seu uso em um limite de 0,3% em dentifrícios, sabonetes para as mãos, sabonetes para o corpo/géis corporais para banho, desodorantes para axilas e pés, pós e corretivos faciais e produtos para higiene das unhas antes da aplicação de unhas artificiais. Já para o uso em enxaguatórios bucais sua concentração não pode ultrapassar 0,2%.

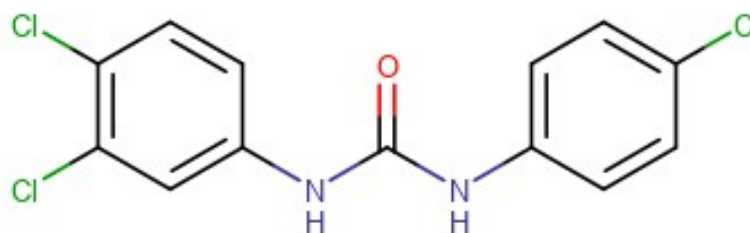
A resolução ainda discorre sobre a proibição do seu uso em sistemas pulverizáveis, como aerossóis e sprays e em outros produtos que não foram detalhados no documento.

Com a produção e o uso generalizado desses produtos que contêm o triclosan em sua fórmula, esse composto acaba se depositando no meio ambiente através das redes de esgoto. Com isso, estudos mostram que ele pode ser encontrado em água potável, águas superficiais, águas residuais, sedimentos ambientais, como também na bile de peixes selvagens mostrando a presença de contaminação dos ecossistemas aquáticos (FANG et al., 2010).

2.4 TRICLOCARBAN

O triclocarban (TCC), cujo nome definido pela IUPAC como 1-(4-clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)ureia está representado na Figura 2. É um membro da classe das fenilureias sendo a ureia substituída por um grupo 4-clorofenil e um grupo 3,4-diclorofenil nas posições 1 e 3 respectivamente. A Tabela 2 mostra as propriedades físico-químicas desse composto.

Figura 2- Estrutura do triclocarban.



Fonte: A autora.

Nota: Estrutura elaborada no software MarvinSketch20.11.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do triclocarban.

| | |
|----------------------|---|
| Nome (IUPAC) | 1-(4-clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)ureia |
| Substância (Sigla) | Triclocarban (TCC) |
| Fórmula molecular | C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O |
| Massa molecular | 315,59 g mol ⁻¹ |
| Ponto de fusão | 140 °C |
| pKa | 12,7 |
| Solubilidade em água | 0,11 mg L ⁻¹ (20°C) |
| Cor | Esbranquiçado a branco |
| Aspecto físico | Pó fino |

Fonte: Adaptado de Pubchem, Open Chemistry Database. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=triclocarban>. Acesso em: 20 abr. 2020.

O triclocarban funciona como um composto antimicrobiano utilizado em sabonetes e desodorantes. Por ser uma anilida e um derivado halogenado tem como característica a eficácia como agente bactericida e fungicida, porém com atividade antimicrobiana limitada. Sendo assim, particularmente ativo contra bactérias gram-positivas, muitas das quais são bactérias patogênicas importantes ou causadoras de odor na pele (McDonnell, 2007).

Esse composto tem sido utilizado há mais de cinco décadas e por isso é largamente detectado em ambientes aquáticos, urina, sangue, leite materno e até sangue umbilical, ou seja, possui características persistentes e bioacumuláveis trazendo preocupação no que diz respeito à contaminação causada por ele (SHI et al.; 2019).

O triclocarban assim como o triclosan tem suas concentrações em produtos de higiene pessoal e cosméticos controlados pela Resolução RDC n° 528 da ANVISA indicando um limite de 0,2% (BRASIL, 2021).

2.5 ESTRATÉGIAS E TÉCNICAS EMPREGADAS NESSE TRABALHO

2.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura. É baseada nas diferentes interações entre uma fase móvel, que carrega os compostos de interesse na sua separação, e uma fase estacionária, que interage com os mesmos a fim de separá-los (AMORIN, 2019). Essas interações são de natureza fraca, não envolvendo ligações covalentes. São interações de van der Waals, eletrostáticas e ligações de hidrogênio (VAILAYA, 2007).

Na cromatografia líquida a fase móvel é um solvente que passa sobre a fase estacionária arrastando os diversos componentes da mistura. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial que devido a sua composição interage com os analitos da mistura separando-os em componentes individuais (PERES, 2002).

Em especial, na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a fase móvel líquida é bombeada mecanicamente através de uma coluna que contém a fase estacionária (WESTON; BROWN, 1997).

A CLAE possui quatro modos cromatográficos que são: fase normal, fase reversa, troca iônica e exclusão por tamanho (WESTON; BROWN, 1997).

A cromatografia de **fase normal** consiste em uma fase estacionária polar e uma fase móvel pouco polar para a eluição dos analitos. Quanto mais polar o analito maior é a sua retenção na coluna. Esse modo é utilizado para amostras que são solúveis em solventes apolares.

A cromatografia de **fase reversa** é a mais utilizada para separar moléculas neutras em solução de acordo com sua hidrofobicidade. É denominada de fase reversa por ser o contrário da cromatografia de fase normal, ou seja, envolve o uso de uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar.

As fases estacionárias mais utilizadas nesse modo são as hidrocarbonadas que consistem em um suporte de sílica microparticulada com funções alquil ou aril ligadas covalentemente na superfície. Entre as fases estacionárias a base de sílica alquilada a octadecil (C18) e octil (C8) são as mais empregadas (VALAYA, 2007).

As fases móveis são baseadas em solventes polares geralmente água e outro solvente um pouco menos polar como a acetonitrila e o metanol.

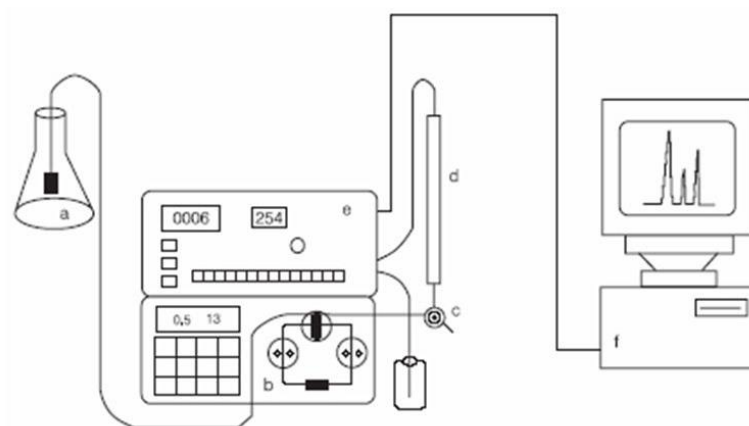
Na cromatografia de **troca iônica** as espécies são separadas com base nas diferenças de carga elétrica. Qualquer espécie que possa adquirir uma carga pode ser separada por esse modo cromatográfico. As aplicações mais importantes incluem análises de aminoácidos, nucleotídeos, carboidratos e proteínas.

A cromatografia de **exclusão** por tamanho é baseada na ausência de interações específicas do analito com a fase estacionária (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). A mistura é distribuída entre a fase móvel presente dentro dos poros da fase estacionária e a fase móvel externa aos poros. Essa fase estacionária é insolúvel na fase móvel, podendo ser um polímero ou um gel com poros de tamanhos bem controlados. Esses regulam a entrada e saída das moléculas que podem permear dentro da fase estacionária sem interagir com a mesma. As moléculas que não tem penetração são excluídas e saem primeiro, agrupadas, já as que penetram completamente saem juntas no final da eluição. Sendo separadas somente as moléculas que penetram parcialmente (COLLINS, 2011).

Dentre esses tipos de cromatografia, a CLAE de fase reversa é a mais popular entre as técnicas tendo uma vasta aplicabilidade no desenvolvimento de novos produtos, controle de qualidade e possíveis contaminações desses. Sendo indústrias farmacêuticas, alimentícias, agropecuárias e químicas, agências reguladoras que tratam do meio ambiente e outras (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

A Figura 3 apresenta um equipamento de CLAE em que se tem o reservatório da *fase móvel* sendo que esta deve possuir alto grau de pureza e estar livre de oxigênio ou outros gases dissolvidos, seguida da *bomba* que proporciona uma vazão contínua para a eluição da fase móvel a um fluxo adequado e reprodutível. As *válvulas de injeção* possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições para o preenchimento da alça e para a sua liberação para a coluna. A *coluna* geralmente é de aço inoxidável empacotada com suportes de alta resolução e comprimento variável. O *detector* monitora o efluente da coluna e fornece a medida detectada através de um sinal elétrico proporcional a alguma propriedade do analito, são empregados detectores de ultravioleta, fluorescência, de índice de refração, espectrômetro de massas, entre outros. O registro de dados pode ser feito por um registrador, um integrador ou um computador (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Figura 3 - Esquema do equipamento da CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector; f) registrador.



Fonte: Adaptado de DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Carlos, n. 7, p. 21-25, mai. 1998.

A CLAE acoplada a um detector de absorção espectrofotométrica na faixa do ultravioleta (UV) é um método empregado por muitos autores (Tabela 3) por se tratar de um equipamento de baixo custo quando comparado com os detectores de espectrometria de massas (MS), permite a utilização de diferentes tipos de solventes, além de ter uma alta estabilidade. Seus valores de limites de detecção se encontram em uma faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} (SILVA; COLLINS, 2011).

Para a determinação de analitos com concentrações maiores na matriz em estudo ou ainda, para análises ambientais de triagem de compostos (*screening*) com limites de detecção na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$, o detector de UV pode ser perfeitamente utilizado.

Neste trabalho, a matriz em estudo são os produtos de higiene pessoal em que os analitos se encontram em concentrações maiores podendo ser detectados através da CLAE-UV com confiabilidade. Isso é de grande importância, desenvolvimento de métodos que possam comprovar se as concentrações limites de TCS e TCC estão sendo respeitadas pelos fabricantes desses produtos. Além de que o método pode ser empregado para controle de qualidade dentro da indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal.

2.5.1.1 Parâmetros cromatográficos avaliados

- Tempo de retenção (t_r)

É o tempo decorrido entre o ponto de injeção até a meia eluição (máximo do pico) e é característico da substância analisada, porém não é exclusivo e pode variar entre equipamentos, o uso de solventes e reagentes diferentes. A comparação entre os tempos de retenção da amostra e da substância química de referência pode ser utilizada como indicativo da identidade da substância, mas não é suficiente para garantir a total caracterização da amostra (SCOTT, 2003; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ed).

- Área do pico (A)

A área do pico, A, está relacionada à resposta do detector, S_c , a massa do soluto injetado, w e a vazão, F, pela equação:

$$A = \frac{S_c w}{F} \quad (1)$$

A área do pico é, usualmente, proporcional à quantidade da substância eluída, sendo a resposta analítica majoritariamente utilizada na construção de curvas analíticas (BARWICK, 1999; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ed).

- Resolução (R)

É o parâmetro que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, e é calculada por:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 - W_2} \quad \text{ou} \quad R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} - W_{2,h/2})} \quad (2)$$

Onde:

t_1 e t_2 = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação.

$W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ = respectivas larguras dos picos à meia altura.

De acordo com a Farmacopeia Europeia, a resolução precisa ser superior a 1,5. Para afirmar que as espécies estão realmente separadas.

2.5.2 Espectrofotometria de Absorção no UV-Visível

A espectrofotometria na região do Ultravioleta-Visível se baseia na absorção e/ou emissão de radiação eletromagnética das moléculas quando seus elétrons se movimentam entre níveis energéticos. Essa radiação se dá nos comprimentos de onda que vão desde o ultravioleta até o infravermelho, passando pelo visível. Essa leitura é feita em um instrumento chamado espectrofotômetro (LEAL, 2011).

No espectrofotômetro uma amostra líquida é colocada numa célula transparente, sendo essa célula de vidro quando a leitura é na região do visível, mas, se a absorbância estiver na região do ultravioleta, são necessários outros materiais que não absorvam nessa região, como o quartzo. Então a luz é incidida na amostra e as moléculas que estavam no seu estado fundamental de energia absorvem essa luz indo para um estado excitado e quando voltam emitem essa energia num certo comprimento de onda, a energia absorvida é medida pelo aparelho, dando origem a um gráfico do comprimento de onda em função da absorbância.

A espectrometria é fundamentada na Lei de Lambert-Beer, sendo a base para medida de absorção de radiação por amostras nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon bc \quad (3)$$

Onde A é absorbância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge na amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grande característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b, a distância percorrida pelo feixe através da amostra.

2.5.3 Planejamento de Experimentos

Os planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos podem auxiliar na extração do máximo de informação útil de um sistema em estudo fazendo um número mínimo de experimentos. O uso de técnicas multivariadas está se

tornando cada vez mais difundido na química analítica e em outras ciências, permitindo o estudo simultâneo de muitas variáveis de controle, sendo mais rápidos e mais econômicos do que as abordagens univariadas tradicionais (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; FERREIRA et al., 2004).

São vários os tipos de planejamentos experimentais existentes que reduzem o número de experimentos e podem ser utilizados em diferentes casos para diferentes finalidades (FERREIRA et al., 2004).

Quando se pretende detectar fatores influentes quantitativamente sobre a resposta de interesse bem como as possíveis interações de uns fatores com os outros, podem ser utilizados os planejamentos fatoriais completos. Ou ainda quando se tem pouca informação sobre o sistema e a intenção é realizar uma triagem das variáveis que podem ser importantes, os planejamentos fatoriais fracionários são a escolha indicada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Mas se a intenção é encontrar um conjunto ideal de condições experimentais, com uma descrição mais detalhada, os planejamentos com superfície de resposta, devem ser usados, pois empregam mais de dois níveis de fatores para permitir o ajuste de um polinômio quadrático completo. O planejamento composto central e Doehlert são exemplos desse modelo (FERREIRA et al., 2004).

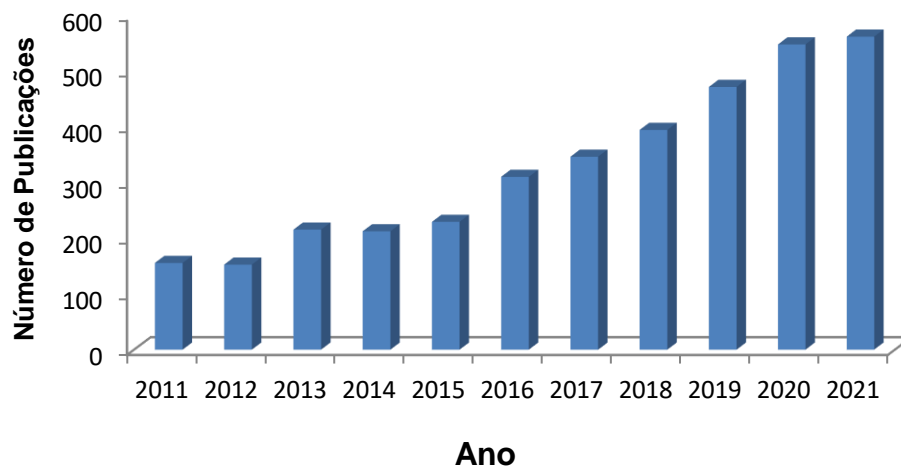
O planejamento composto central é formado de três partes: uma parte chamada de fatorial, uma parte axial e o ponto central realizado n vezes. Tendo a vantagem de poder ser realizado sequencialmente caminhando no sentido da otimização do sistema, através da execução de uma parte do experimento. A intenção é chegar à região que contém o ótimo e então comparar a parte do delineamento, que consiste dos pontos axiais a fim de avaliar a parte curvilínea existente de forma a chegar à solução ótima, que maximiza os resultados do sistema (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001).

O planejamento do tipo Doehlert é uma alternativa muito útil de modelo de segunda ordem em comparação com outros modelos, visto que é preciso menos experimentos, sendo mais eficiente. Na matriz de Doehlert o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis, em um estudo com duas variáveis, por exemplo, uma variável é estudada em cinco níveis, enquanto a outra é estudada em apenas três níveis, permitindo a livre escolha dos fatores a serem atribuídos a um número grande ou pequeno de níveis. Como regra geral, é preferível escolher a variável com

efeito mais forte como o fator com cinco níveis, a fim de obter a maioria das informações do sistema (FERREIRA et al., 2004).

Nos últimos 10 anos houve um crescimento notável na publicação de artigos relacionados à aplicação de técnicas multivariadas nos vários aspectos da cromatografia como pode ser observado no gráfico da Figura 4, demonstrando as publicações relacionadas com o planejamento de experimentos e a cromatografia desde 2011.

Figura 4 - Número de publicações referenciadas pelo Science direct desde 2011 com o termo de pesquisa “design of experiments” ou “experimental design” e “chromatography” (pesquisa realizada em 13.01.2022)



Fonte: A autora.

As aplicações variam de tratamento de amostra e otimização instrumental a modelagem e previsões de sistemas cromatográficos complexos e elucidação de suas estruturas subjacentes (ARAÚJO; GRUNG, 2012). Normalmente, dois, três ou quatro fatores são estudados, incluindo composição da fase móvel, parâmetros de gradiente (composição inicial e final, gradiente da taxa de fluxo), pH, temperatura, volume de injeção, taxa de fluxo (HIBBERT, 2012).

Bonfilio (2009) descreve a otimização de uma metodologia analítica para a determinação de losartana potássica em cápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência a partir de um planejamento fatorial fracionário para realizar a triagem das variáveis importantes. Seguido de um planejamento de superfície de resposta usando a matriz de Doehlert para encontrar as condições ótimas para o método proposto.

Primeiramente um planejamento fatorial fracionário foi adotado, sendo as variáveis estudadas: pH do tampão utilizado na fase móvel, proporção do tampão fosfato na fase móvel, temperatura da coluna, taxa de fluxo e tipo de coluna. A resposta analítica analisada foi a razão pratos teóricos/tempo de retenção (PT/TR). Com os resultados obtidos concluíram que todos os fatores foram estatisticamente significativos e então algumas variáveis foram fixadas analisando suas melhores respostas no nível alto ou baixo. A temperatura em 35°C, coluna cromatográfica C8 e vazão da fase móvel em 1 mL min⁻¹. As variáveis pH do tampão e proporção do tampão tiveram suas interações significativas, sendo assim escolhidos para a otimização final através da matriz de Doehlert. Com o tratamento dos dados, o pH do tampão foi fixado em 6,2 na proporção de 65:35 tampão fosfato:acetonitrila. Os autores ressaltam que por meio do planejamento foi possível obter uma melhor eficiência do método sem custos adicionais com colunas ou equipamentos e precisando de um número menor de ensaios para chegar ao resultado obtido.

Também há aplicação dos planejamentos experimentais na espectrofotometria de UV-Vis. Shariati-Rad, Irandoust e Mohammadi (2015) determinaram a concentração de nitrito por UV-Vis em solo e água empregando um planejamento composto central.

Os autores fizeram a determinação do nitrito através de uma reação do íon com cefixima e em seguida com 1-naftilamina gerando um composto azo de coloração laranja que absorve na região do visível. O planejamento composto central foi empregado para o estudo das variáveis importantes para essa reação. Os fatores estudados foram as concentrações de cefixima e de 1-naftilamina e o pH da reação, tendo como resposta a absorbância obtida com 30 minutos de reação no comprimento de onda de 360 nm. As condições ótimas encontradas foram de pH igual a 1 e concentrações de cefixima e 1-naftilamina de 370 e 28 mg L⁻¹, respectivamente.

2.5.3.1 Função de desejabilidade

Quando é realizado um planejamento experimental em busca de mais de uma resposta a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich (1980) pode ser aplicada. Seu objetivo é encontrar condições que assegurem o cumprimento dos critérios de todas as respostas envolvidas e ao mesmo tempo fornecer os melhores valores para a resposta conjunta desejável. Sendo assim, as

múltiplas respostas são convertidas em uma única através de uma combinação das respostas individuais em uma função composta (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001 e CANDIOTI et al., 2014).

O primeiro passo é encontrar uma função de desejabilidade individual para cada resposta, com valores restritos ao intervalo [0,1] em que zero significa um valor inaceitável, e um o valor mais desejado. Valores intermediários significam respostas mais ou menos desejáveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Depois que as funções de desejabilidade tenham sido especificadas para todas as respostas, deve-se combiná-las numa desejabilidade global, dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais.

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (4)$$

Com isso a otimização simultânea das várias respostas se reduz a maximização de um único valor, a desejabilidade global. Alguns softwares estatísticos proporcionam esse resultado a partir dos valores fornecidos a ele.

Tendo o valor de D , o último passo é prever os valores que as diferentes respostas podem assumir na condição ótima dos fatores usando o modelo ajustado e realizar os experimentos a fim de verificar as previsões (CANDIOTI et al., 2014).

Quando se aplica um planejamento experimental à cromatografia líquida de alta eficiência geralmente tem como objetivo alcançar mais de uma resposta e para que o método seja capaz de satisfazer todas essas, a função de desejabilidade pode ser uma alternativa eficiente.

2.5.4 Validação de um Método Analítico

Após a otimização ser realizada é importante demonstrar a qualidade do método otimizado, o quão o mesmo é eficiente para analisar determinada amostra trazendo confiabilidade nos resultados. Para demonstrar que um método gera informações confiáveis e adequadas para o seu propósito é necessário que ele passe por uma avaliação chamada de validação. Validar é investigar se o objetivo analítico do método é alcançado obtendo resultados analíticos com um nível de incerteza aceitável (TAVERNES; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

O laboratório deve validar o método quando se tratar de um método não normalizado, ou seja, desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou

quando o método é utilizado fora do escopo para o qual foi concebido ou também no caso de ampliação e modificação do método normalizado (INMETRO, 2016).

A validação determina a adequação de uma análise no sentido de fornecer a informação desejada. Pode ser dividida em dois tipos: validação no laboratório (in house validation) e validação completa (full validation) (RIBANI et al., 2004).

A validação no laboratório conta com as etapas de validação dentro de um único laboratório seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. Pode ser utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, mas sem verificar a reprodutibilidade.

A validação completa envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim uma metodologia pode ser aceita como oficial para uma determinada aplicação. O Protocolo Harmonizado Internacional e o procedimento ISO (International Standard Organization) estabelecem um número mínimo de laboratórios e materiais testes para serem incluídos no estudo interlaboratorial para validação completa do método analítico, no âmbito internacional. No Brasil, esse estudo é coordenado pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).

Existem vários documentos, órgãos e normas que tratam sobre a validação de métodos analíticos. No âmbito internacional é possível se basear, como principais: no ICH (International Conference on Harmonization) que define parâmetros, requerimentos e metodologias, a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) que também redigiu um documento técnico que pode ser tomado como um guia para validação. Pode-se encontrar a norma internacional ISO/IEC17025 específica para laboratórios de ensaio e calibração. O US-FDA (United Food and Drug Administration) que também apresenta um guia para validação de métodos.

No Brasil tem-se a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) que são agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de

ensaios e que trazem guias para o procedimento de validação de métodos analíticos.

2.5.4.1 Parâmetros de desempenho

Os parâmetros de desempenho são atribuições que qualificam o método de ensaio quanto as suas qualidades funcionais. O Quadro 2 apresenta comparações das definições dos parâmetros exigidos pela ANVISA e pelo INMETRO.

Quadro 2 - Parâmetros avaliados de acordo com a ANVISA e o INMETRO.

| INMETRO | ANVISA |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Seletividade | Seletividade |
| Faixa de trabalho e Faixa linear | Faixa de trabalho |
| Linearidade | Linearidade |
| Limite de Detecção (LD) | Limite de Detecção (LD) |
| Limite de Quantificação (LQ) | Limite de Quantificação (LQ) |
| Sensibilidade (inclinação da curva) | - |
| Tendência/recuperação | Exatidão |
| Precisão | Precisão |
| Repetitividade | Repetibilidade |
| Precisão Intermediária | Precisão Intermediária |
| Reprodutibilidade | Reprodutibilidade |
| Robustez | Robustez |

Fonte: BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 166, 24 jul. 2017 e BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008-Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. **Coordenação Geral de Acreditação**, revisão 09, jun. 2020.

A seguir tem-se uma breve explicação de cada parâmetro:

- a) seletividade: de acordo com a IUPAC, a especificidade é quando não há interferência demonstrando o máximo de seletividade e essa por sua vez reflete a influência de outras substâncias presentes na matriz durante a determinação analítica.

Conforme o INMETRO, um método é chamado seletivo quando produz respostas para vários analitos, mas pode distinguir a resposta de um analito da de outros. O órgão traz dois procedimentos para avaliar esse parâmetro: o primeiro comparando a amostra com o material padrão pelo método a ser validado e por outro já validado e o segundo analisa a amostra com vários interferentes junto ao analito de interesse (INMETRO, 2020; BRITO, [2012]).

Também é preciso verificar o efeito de matriz, pois a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Uma maneira é pela adição de padrão utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse.

Por esse método é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença de matriz, se forem paralelas pode-se dizer que não há interferência da matriz;

- b) faixa de trabalho/faixa linear: a faixa de trabalho é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade.

A faixa linear de trabalho é a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito. (INMETRO, 2020);

- c) linearidade: é a habilidade de um procedimento analítico (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Pode ser observada pelo gráfico do resultado dos ensaios em função da concentração do analito. Em seguida, verificada a partir da equação de regressão linear e determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser diferente de 1 (avaliado pelo teste t de Student), observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero.

Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a um e coeficiente angular diferente de zero (BRITO et al., 2003);

d) limite de detecção (LD): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

Pode ser calculado de três maneiras diferentes: pelo método visual, utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível.

Pelo método relação sinal-ruído, feito pela comparação entre a medida dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) dessas amostras.

E pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, pela equação:

$$LD=3,3x s/S \quad (5)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2017);

e) limite de quantificação (LQ): representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida com exatidão e precisão aceitáveis utilizando um procedimento experimental. Os mesmo critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando:

- método visual: amostras com concentrações analíticas conhecidas são preparadas e o nível mínimo no qual o analito pode ser quantificado com um nível de aceitável de incerteza é estabelecido (ARAÚJO, 2009),

- relação sinal-ruído: os sinais de amostras com concentrações conhecidas são comparadas com as de amostras em branco até uma concentração analítica que produz um sinal equivalente a 10 vezes o desvio padrão do branco (10x o branco),

- relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LQ, a partir da equação:

$$LQ=10x s/S \quad (6)$$

f) sensibilidade: é a capacidade de um método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Está relacionado com a equação linear da curva analítica, sendo o coeficiente angular. No caso, quanto mais sensível o método, maior a inclinação da reta demonstrando então que pequenas variações de concentração resultam em maior variação da resposta. (BRITO et al., 2013)

g) exatidão: é a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, comumente é expressa em termos de tendência (erro sistemático) e verifica-se usando: material de referência certificado (MRC), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos (BRITO et al., 2003).

Utilizando material de referência é feito analisando replicatas desse material e comparando os resultados obtidos com o valor certificado. Pela comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado (zero, no caso), podendo estabelecer o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração.

Estudos colaborativos envolvem a aceitação de pelo menos oito laboratórios (número mínimo) em desenvolver determinado método. Quando não for possível reunir esse número de laboratórios, o estudo pode ser conduzido com o mínimo absoluto de cinco participantes.

O ensaio de recuperação é o mais utilizado para validação refletindo a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra.

A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. Esse estudo de recuperação consiste na “fortificação” da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a fórmula:

$$\text{Rec\%} = \frac{|\text{valor obtido} - \text{valor real}|}{(\text{valor real})} \times 100 \quad (7)$$

h) precisão: avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Deve ser expressa por meio da repetibilidade (repetitividade), da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Tanto pela ANVISA como pelo INMETRO a precisão é determinada em termos de desvio padrão relativo:

$$\text{DPR} = \frac{(\text{desvio padrão})}{(\text{concentração média determinada})} \times 100 \quad (8)$$

- repetibilidade: é a condição de medição incluindo o mesmo procedimento, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (INMETRO, 2020),
- precisão intermediária: avalia a precisão sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças. Podem ser variadas as condições: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos,
- reprodutibilidade: é obtida por meio da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias;

- i) robustez: capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. De acordo com a ANVISA para métodos quantitativos, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos deverá ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão (BRASIL, 2017).

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE TCS E TCC

Em consulta a literatura sobre métodos analíticos para a determinação e quantificação dos compostos em estudo neste trabalho, é possível encontrar diferentes metodologias.

Tem-se que a escolha do método é a primeira etapa da análise química e requer primordialmente uma definição clara do problema proposto. (OHLWEILER, 1978).

Essa definição depende de uma série de fatores e condições dentre eles:

- a quantidade de amostra disponível: conferir se o método pode ser aplicado à porção de amostra existente.
- a faixa da quantidade relativa em que presumivelmente se situa o componente a determinar: pesquisar por meio da literatura se o analito presente na amostra está em concentração de acordo com a sensibilidade do método.
- a exatidão requerida: analisar a porcentagem de erro do método se está dentro do aceitável para o trabalho em estudo.
- a composição química: verificar se o método pode ser empregado à amostra de acordo com sua constituição, orgânica, inorgânica, iônica, por exemplo.
- o número de amostras a analisar e os recursos disponíveis: verificar os custos envolvidos no método escolhido levando em consideração a quantidade de amostras a analisar, se está dentro do orçamento.

Para a determinação de triclosan em produtos de higiene pessoal e amostras ambientais a literatura descreve dentre os mais citados os métodos espectrofotométricos e os métodos cromatográficos. Já para o triclocarban, os métodos cromatográficos são predominantes.

2.6.1 Espectrofotometria de Absorção no UV-Visível

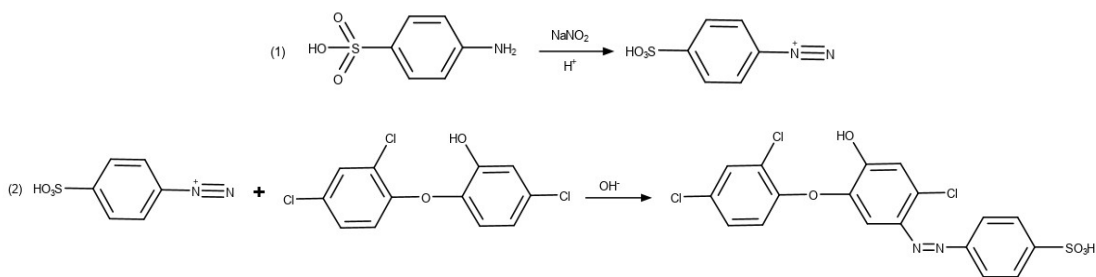
A espectrofotometria de UV-Visível envolve instrumentação simples, rápida e de baixo custo para a determinação de TCS. Com o intuito de aumentar a sensibilidade e seletividade na determinação de espécies na região do UV-Vis o analito pode ser transformado a fim de obter maior absorvidade molar e comprimento de onda na região do visível (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Lu et al (2009) e Kaur (2018) utilizaram um método baseado na reação de diazotação do triclosan em que ocorre a geração de um composto azo. Este é obtido através de uma reação de acoplamento diazo e absorve na região do visível.

Essa reação envolve a formação de um cátion arenodiazônio (eletrófilo) e um anel aromático ativado por um grupo substituto doador de elétrons (nucleófilo), por exemplo, uma amina primária (ARAÚJO et al.; 2015).

No trabalho de Lu et al (2009) a reação foi feita primeiramente com o ácido para-sulfanílico e nitrito de sódio em meio ácido formando o sal de diazônio. Este, por sua vez, reage com a molécula de triclosan em uma reação tamponada com glicina formando o composto azo. O produto apresenta uma coloração amarela que absorve na região do visível, no comprimento de onda de 452 nm, conforme o mecanismo proposto na Figura 5.

Figura 5 - Mecanismo proposto para a reação de diazotação do triclosan.



Fonte: A autora.

Nota: Reação elaborada no software MarvinSketch20.11.

Tendo as condições do método otimizadas de forma univariada e validadas, os autores determinaram a presença de TCS em alguns produtos de higiene pessoal incluindo pastas de dente, gel para lavagem das mãos e uma solução de desinfecção.

As amostras foram diluídas em hidróxido de sódio, extraídas em banho de ultrassom e em seguida centrifugadas. O sobrenadante foi diluído e submetido a reação de diazotação. As amostras apresentaram resultados entre 0,195 a 3,37 mg g⁻¹ de TCS (0,0195 a 0,337%). Comparadas com o método de cromatografia líquida de alta eficiência, os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas.

Kaur (2011) empregou o mesmo método acima, porém utilizando a anilina como precursora para formar o íon diazônio. O comprimento de onda máximo escolhido foi de 352 nm. O método foi otimizado através de um planejamento Box-Behnken, validado e aplicado para amostras de água.

O preparo da amostra foi realizado primeiramente filtrando e tratando-a com hidróxido de sódio, em seguida ajustando o pH em 2-3 com ácido clorídrico. A amostra foi extraída com hexano por três vezes e a sua fase, posteriormente, desidratada com sulfato de sódio anidro. Por meio do banho maria, a fase desidratada do hexano foi concentrada e evaporada até a secura para a partir disso a amostra ser submetida a reação de diazotação.

Os valores encontrados de triclosan nas amostras variaram de 0,017 a 0,173 ppm ($1,70 \times 10^{-6}$ a $1,73 \times 10^{-5}$ %). Os resultados também foram comparados com a cromatografia líquida de alta eficiência não apresentando diferenças significativas.

Mpupa; Mashile e Nomngongo (2017) também utilizaram a espectrofotometria para determinar triclosan em águas residuais. O preparo de amostra empregado foi baseado na microextração por solvente supramolecular. Esse solvente especial foi formado pela mistura de ácido decanóico em Aliquat-336, que é um sal de amônio quaternário usado como catalisador de transferência de fase.

A amostra foi adicionada ao solvente supramolecular e agitada em um vórtice formando uma solução turva. Essa, por sua vez, foi centrifugada, tendo o sobrenadante dissolvido em metanol e analisado por espectrofotometria de UV-Vis no comprimento de onda de 284,8 nm.

O método foi otimizado de maneira multivariada através de um planejamento composto central analisando simultaneamente o pH da amostra, o tempo de extração e o volume do solvente supramolecular. Com o tratamento dos dados, o volume do solvente foi a única variável significativa e a condição ótima encontrada foi com pH igual a 5, tempo de extração de 6 minutos e volume de solvente supramolecular de 400 microlitros.

Tendo as condições otimizadas e o método validado, foi realizada a determinação do triclosan em amostras de águas residuais antes e depois do tratamento sendo encontrado apenas nas amostras antes do processo. Os autores relatam que os níveis de triclosan depois de tratado podem estar numa faixa de concentração abaixo do limite de detecção do método devido ao tratamento do efluente que pode ter degradado o composto ou ter transformado em outras espécies.

2.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os métodos cromatográficos são uma alternativa frequentemente encontrada na literatura para quantificar tanto o triclosan quanto o triclocarban no que se refere a amostras de produtos de higiene pessoal e cosméticos e em amostras ambientais.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica considerada de alta sensibilidade, precisão, rapidez e seletividade (MONTASERI; FORBES, 2016).

A Tabela 3 apresenta um resumo de alguns trabalhos encontrados na literatura para quantificação de TCS e TCC utilizando CLAE.

Tabela 3 - Trabalhos encontrados na literatura para determinação de TCS e TCC por cromatografia líquida de alta eficiência.

(continua)

| Analitos | Matriz | Coluna (tamanho) | Fase Móvel (Proporção) | Fluxo (mL min ⁻¹) | Detector | Tempo de corrida (min) | Faixa linear (µg mL ⁻¹) | LOD (µg mL ⁻¹) | Referência |
|-----------------------------|--|---------------------|--|----------------------------------|----------|------------------------------|--|-------------------------------|---|
| TCS | Produtos de higiene pessoal, limpeza doméstica e cosméticos | C18 (150mm) | ACN:H ₂ O (75:25) | 0,60 | UV | 10 | 1,00x10 ⁻⁵ - 60,0 | 1,00 | Rusdiana; Wibowo; Kartasasmita, 2021 |
| TCS | Produtos de higiene pessoal | C18 (150mm) | ACN:triethylamina fosfato pH 3,5 (55:45) | 0,40 | UV | 20 | 8,00-60,0 | 2,00 | Piccoli et al.,2002 |
| TCS e flurbiprofe- no | Nanogel dental | C18 (250mm) | ACN:ácido cítrico pH 3,26 (90:10) | 0,30 | UV | 20 | 10,0 – 200 (TCS) | 2,00 | Aminu; Chan; Toh, 2018 |
| TCS | Produtos de higiene pessoal | C18 (150mm) | ACN:H ₂ O (75:25) | 1,0 | UV | 10 | 4,00x10 ⁻⁴ – 0,100 | 9,00x10 ⁻⁵ | Chen et al., 2013 |
| TCS | Detergente doméstico | C18 (250mm) | ACN:H ₂ O (70:30) | 1,0 | UV | - | 1,00 – 180 | 0,285 | Tsai; Shih; Pan, 2008 |
| TCS | Pasta de dente, saliva e efluente | C18 (150mm) | ACN:H ₃ PO ₄ 0,1% (80:20) | 1,0 | DAD | - | 4,00x10 ⁻⁴ - 0,108 | 1,00x10 ⁻⁴ | Silva; Nogueira, 2008 |

Fonte: A autora.

Tabela 3 - Trabalhos encontrados na literatura para determinação de TCS e TCC por cromatografia líquida de alta eficiência.

(continuação)

| Analitos | Matriz | Coluna (tamanho) | Fase Móvel (Proporção) | Fluxo (mL min ⁻¹) | Detector | Tempo de corrida (min) | Faixa linear (µg mL ⁻¹) | LOD (µg mL ⁻¹) | Referência |
|---|--------------------------------|---------------------------------|---|----------------------------------|----------|------------------------------|--|--|----------------------------|
| TCC e TCS | Produtos de higiene pessoal | C8 (250mm) | MeOH:tampão fosfato (72:28) | 1,0 | DAD | 30 | 5,00 – 110 | 15,0 (TCS) 5,00 (TCC) | Liu; Wu, 2012 |
| TCS, TCC e metiltriclos an | Águas residuais | Pentafluorofen il (250mm) | ACN:MeOH:H ₂ O (35:35:30) | 1,0 | DAD | 20 | 5,00x10 ⁻⁴ – 1,00 (TCS) 2,00x10 ⁻⁴ – 1,00 (TCC) | 7,00x10 ⁻⁵ (TCS) 4,00x10 ⁻⁵ (TCC) | Alshishani et al., 2019 |
| TCC, parabenos e benzofeno na | Água | C18 (250mm) | Gradiente 0-12min: ACN:H ₂ O (90:10) 13-20min: ACN:H ₂ O:MeOH (35:35:30) | 0,90 | DAD | 20 | 1,60x10 ⁻³ – 0,200 (TCC) | 5,00x10 ⁻⁴ (TCC) | Dias et al., 2015 |

Fonte: A autora.

Tabela 3 - Trabalhos encontrados na literatura para determinação de TCS e TCC por cromatografia líquida de alta eficiência.

(Conclusão)

| Analitos | Matriz | Coluna (tamanho) | Fase Móvel (Proporção) | Fluxo (mL min ⁻¹) | Detector | Tempo de corrida (min) | Faixa linear (µg mL ⁻¹) | LOD (µg mL ⁻¹) | Referência |
|--|-----------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------|------------------------|--|--|---------------------------------------|
| TCC, TCS, metil TCS | Águas residuais | Pentafluorofenil (100mm) | ACN:H ₂ O (50:50) | 0,20 | DAD | 12 | 5,00x10 ⁻⁴ – 0,500 (TCS) 1,00x10 ⁻³ – 0,500 (TCC) | 3,90x10 ⁻⁴ (TCS) 5,10x10 ⁻⁴ (TCC) | Rozaini et al., 2021 |
| TCC e TCS | Água | C30 (250mm) | MeOH:H ₂ O (90:10) | 1,00 | DAD | 10 | 0,500 – 20,0 (TCS) 0,300 – 20,0 (TCC) | 4,00x10 ⁻⁵ (TCS) 1,70x10 ⁻⁴ (TCC) | Baranowska; Magiera; Bortniczuk, 2010 |
| TCS, TCC e 2 desreguladores endócrinos | Água | C18 (150mm) | ACN:H ₂ O - | 0,60 | DAD | 16 | 5,00x10 ⁻⁴ – 0,200 | 5,00x10 ⁻⁵ (TCS e TCC) | Wu et al., 2021 |

Fonte: A autora.

De modo geral, todas as metodologias apresentadas na tabela acima são de fase reversa com a coluna C18 de 150 mm sendo a mais utilizada. As fases móveis geralmente são acetonitrila, metanol e água, esta última por vezes aparece com tampão fosfato. Os fluxos da fase móvel variam de 0,30 a 1,00 mL min⁻¹, com tempos de corrida entre 10 e 30 minutos.

As faixas de concentração estudadas em cada método variam de forma significativa dependendo da matriz em estudo. Amostras de produtos de higiene pessoal e cosméticos são esperadas concentrações maiores dos compostos já que de acordo com a legislação uma quantidade determinada é adicionada aos produtos. Para matrizes ambientais como águas superficiais, residuais, efluentes, as concentrações são mais baixas necessitando de uma faixa condizente com essas quantidades.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, otimizar e validar metodologias analíticas para a determinação simultânea de TCC e TCS em produtos de higiene pessoal, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos e de TCS por espectrofotometria de UV-Visível.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método cromatográfico para a determinação de TCS e TCC simultaneamente que possa ser aplicado tanto em amostras de produtos de higiene pessoal como em amostras ambientais. Sendo mais simples e barato que outros métodos encontrados na literatura por CLAE por arranjo de diodos.
- Desenvolver um método espectrofotométrico para a determinação de TCS em produtos de higiene pessoal através de uma reação de diazotação para formar um produto colorido e avaliar a sua estabilidade ótica.
- Otimizar as condições experimentais a fim de obter as melhores respostas para cada método desenvolvido mediante aplicações de planejamentos fatorial completo, composto central e matriz de Doehlert;
- Validar as metodologias desenvolvidas para assegurar confiabilidade aos métodos propostos através do estudo da linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e especificidade.
- Comparar os métodos desenvolvidos a fim de estabelecer o mais sensível, preciso e exato para a determinação de TCS.
- Determinar a concentração de TCC e TCS em produtos de higiene pessoal simultaneamente por meio da cromatografia líquida de alta eficiência para comprovar se estão de acordo com a legislação exigida pela ANVISA.
- Determinar a concentração de TCS em produtos de higiene pessoal por meio da espectrofotometria de UV-Visível.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Triclosan (Nanjing Wellche) com pureza de 99%, triclocarban (Sigma-Aldrich) com pureza de 99%, hidróxido de sódio (Dinâmica), sulfanilamida (Vetec), ácido clorídrico (Vetec), carbonato de sódio (Vetec), nitrito de sódio (Nuclear), sulfato de amônio (Synth), dihidrogenofosfato de potássio (Synth), bicarbonato de sódio (Dinâmica), sulfato de magnésio heptahidratado (Synth), cloreto de cálcio dihidratado (Synth).

Os solventes utilizados foram metanol grau CLAE (MERCK, PA, USA) e água ultrapura (Osmose Reversa OS10 LZ, Geaka).

4.2 AMOSTRAS

As amostras de produtos de higiene pessoal foram pastas de dente (quatro variedades da mesma marca), desodorantes em creme (duas marcas diferentes), hidratantes corporais (duas marcas diferentes) e sabonete em barra, adquiridas no comércio local.

4.3 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos empregados foram: banho de ultrassom da marca CLEANER LEO-50; balança analítica XP 26/AG 204 da marca Mettler Toledo; espectrofotômetro MultiSpec-1501 da marca Shimadzu; cromatógrafo da marca Shimadzu, equipado com unidades de bombeamento de solventes LC-20AT, auto-injetor SIL-20A HT, forno de colunas CTO-20A, detector de rede espectrofotométrico de fotodiodos SPD-M20A e controlador do sistema CBM-20A e software LC solution. Colunas C18 Shim-pack VP-ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 µm e 150 mm x 4,6 mm, 5µm); Sistema Master System água ULTRAPURA Osmose Reversa OS10 LZ da marca Geaka.

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Preparo das Soluções Estoque

Para a preparação da solução estoque de TCC e TCS de 1000 µg mL⁻¹ utilizada no cromatógrafo, foram pesados 50,00 mg de cada um dos reagentes e

diluídos em metanol para balões de 50,00 mL, separados, sendo que para o TCC foi necessário 5 minutos no banho de ultrassom para a dissolução. As soluções foram filtradas com um filtro PTFE de 25 mm de diâmetro com poro de 0,45 μm e transferidas para frascos âmbar.

A solução estoque de TCS de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o uso no espectrofotômetro foi preparada pesando 20,00 mg do analito e dissolvendo em 20,00 mL de NaOH 0,500 mol L^{-1} , levando a um volume final de 100,0 mL com água ultra pura.

4.4.2 Otimização das Condições Cromatográficas

O estudo de otimização das condições cromatográficas foi realizado através de um planejamento do tipo Doehlert para os analitos TCC e TCS. Os parâmetros estudados foram: fluxo da fase móvel e temperatura com triplicata no ponto central totalizando nove experimentos. Foram realizados dois planejamentos um para coluna C18 de 250 mm e um para coluna C18 de 150 mm. Os dados foram tratados pelo Programa Statistica 13.0. As respostas analisadas foram tempo de retenção, área do pico e resolução entre os picos no comprimento de onda de 210 nm para o TCS e 265 nm para o TCC.

4.4.3 Formação do Composto Azo e sua Estabilidade

Para a determinação de TCS em produtos de higiene pessoal por meio da espectrofotometria de UV-Visível um composto azo foi gerado para produzir coloração detectável no espectrofotômetro.

O composto azo foi formado pela reação entre nitrito de sódio (0,500 mol L^{-1}) e sulfanilamida (0,09% (m/v)), preparado em solução contendo ácido clorídrico (0,038 mol L^{-1}), a uma temperatura abaixo de 5,00 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida TCS foi adicionado juntamente com o carbonato de sódio (10% (m/v)), este último usado como tampão. As medidas de absorvâncias após o produto formado foram realizadas no espectrofotômetro em um intervalo de uma hora no comprimento de onda de 452 nm.

4.4.4 Otimização das Condições Espectrofotométricas

Após estudo preliminar da estabilidade do composto azo formado, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 , para avaliar os fatores: quantidade de nitrito

de sódio adicionado, concentração de sulfanilamida e de ácido clorídrico. A resposta analisada foi a absorvância no comprimento de onda de 452 nm.

Em seguida, um planejamento composto central foi realizado tendo como fatores avaliados: concentração de ácido clorídrico e de sulfanilamida, sendo o ponto central feito em triplicata. A resposta analisada também foi absorvância no comprimento de onda de 452 nm.

Todos os dados foram tratados no Programa Statistica 13.0.

4.4.5 Validação dos Métodos para a Determinação de TCC e TCS

- Linearidade e faixa de trabalho

Para a CLAE, a curva analítica foi estabelecida para o TCC e TCS por meio da correlação entre a média das áreas obtidas para cada concentração estudada, em quintuplicata, sendo que o teste de Huber foi aplicado para excluir os valores anômalos. Os níveis de concentração analisados para TCC e TCS foram de 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o método espectrofotométrico, a curva analítica foi estabelecida para o TCS por meio da correlação entre a média das absorvâncias obtidas para cada concentração estudada, em triplicata. Os níveis de concentração analisados para o TCS foram de 0,500; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica de acordo com as equações 5 e 6, respectivamente.

- Precisão, exatidão e especificidade

A precisão intradia (repetibilidade) foi avaliada através da análise de seis soluções de amostra na concentração de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em diferentes períodos do dia. A precisão intermediária foi determinada pela análise de seis soluções na mesma concentração realizadas em dias distintos e por dois analistas diferentes. A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas em termos de desvio padrão relativo.

A exatidão foi determinada por meio do teste de adição de padrão. Quantidades conhecidas de TCS e TCC (1,50; 3,00; 6,00 e 8,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionadas as amostras comerciais (pasta de dente, desodorante, hidratante e sabonete em barra) contendo os analitos. Por meio da equação da reta foram obtidos os percentuais de recuperação dos compostos podendo avaliar assim a exatidão dos métodos.

4.4.6 Determinação de TCS e TCC em Amostras de Produtos de Cuidados Pessoais

Para a análise das amostras por CLAE, uma quantidade de 100 mg de cada amostra foi dissolvida em 15 mL de metanol sob agitação em banho de ultrassom por 10 minutos. Em seguida, transferida para um balão de 25 mL e completado com metanol. A solução foi diluída com a fase móvel (MeOH:H₂O 80:20 (v/v)) a fim de obter uma solução final de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, filtrada com filtro de 25 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm .

As soluções foram transferidas para o vial e submetidas à análise cromatográfica sob as condições ótimas encontradas. Por meio da curva analítica as concentrações foram determinadas.

Para a análise do TCS por espectrofotometria, 150 mg de cada amostra foi dissolvida em 10 mL de hidróxido de sódio 0,010 mol L⁻¹ sob agitação em banho de ultrassom por 10 minutos e centrifugada por 30 minutos. A solução sobrenadante foi filtrada com filtro de 25 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm . Em seguida transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completado com água ultra pura.

Uma alíquota de 3,0 mL foi utilizada para a derivatização do TCS presente na amostra e a solução colorida obtida foi analisada espectrofotometricamente a 452 nm. Através da curva analítica as concentrações foram determinadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições experimentais foram investigadas a fim de obter a melhor separação entre o TCS e o TCC com os menores tempos de retenção e maiores áreas dos picos. Analisando as Figuras 1 e 2 que apresentam as estruturas dos analitos, é possível notar que são parecidas, sendo assim, fazem interações semelhantes com a coluna.

Isso pode provocar a co-eluição das espécies ou a saída destes em tempos aproximados o que pode dificultar a separação de ambos. Portanto, para a obtenção das melhores condições do sistema cromatográfico para a separação e identificação do TCC e do TCS foi necessário a realização de uma otimização.

Fazer o uso de ferramentas estatísticas para conhecer quais os fatores instrumentais relacionados com a cromatografia teriam relevância e poderiam alcançar resultados mais adequados para este trabalho.

A matriz de Doehlert foi escolhida pela sua eficiência, pois com apenas um planejamento é possível otimizar as melhores condições cromatográficas, isto significa, analisar os fatores importantes e encontrar a condição ótima ao mesmo tempo. Além de poder estudar a superfície de resposta com um número menor de experimentos em comparação ao planejamento composto central (FERREIRA et al., 2004).

Como o grupo de pesquisa possuía estudos prévios de melhor fase móvel e sua proporção para a determinação simultânea do TCC e TCS, sendo metanol:água 80:20 (v/v). Ficou decidido permanecer com esses parâmetros visto que a utilização de apenas dois solventes torna o método mais barato, também simples devido a não empregar uso de tampão que pode aumentar o trabalho para limpar a coluna após o uso e ainda prejudicá-la com o passar do tempo. Além de que o metanol é menos tóxico e mais barato que a acetonitrila muito utilizada em outros métodos encontrados na literatura.

Sendo assim, os fatores estudados nesse planejamento foram fluxo da fase móvel e temperatura. Estabeleceu-se um planejamento para a coluna de 250 mm e outro para a coluna de 150 mm, conforme apresentado nas Tabelas 4 e 5, tendo como objetivo obter a melhor resposta para os tempos de retenção, áreas dos picos e resolução entre os picos de TCC e TCS.

Para este estudo foram realizados nove experimentos sendo o ponto central feito em triplicata para estimar o erro experimental. Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica 13.0.

Tabela 4 - Resultados obtidos para o planejamento Doehlert com a coluna C18 de 250 mm.

| Ensaio | Fatores codificados | | Fatores não codificados | | Tempo de retenção | Tempo de retenção | Área do pico | Área do pico | Resolução TCC-TCS |
|--------|---------------------|--------|-------------------------|------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | Fluxo | Temp. | Fluxo | Temp | TCC | TCS | TCC | TCS | |
| | | | (mL.min ⁻¹) | (°C) | (min) | (min) | (10 ⁵) | (10 ⁵) | |
| 1 | 1,0 | 0 | 1,0 | 40 | 10,08 | 10,93 | 1,82 | 2,04 | 2,37 |
| 2 | 0,5 | 0,866 | 0,90 | 45 | 10,23 | 11,29 | 2,01 | 2,25 | 2,97 |
| 3 | -1,0 | 0 | 0,60 | 40 | 16,50 | 17,9 | 2,99 | 3,36 | 2,60 |
| 4 | -0,5 | -0,866 | 0,70 | 35 | 15,57 | 16,59 | 2,55 | 2,88 | 1,98 |
| 5 | 0,5 | -0,866 | 0,90 | 35 | 12,27 | 13,07 | 1,99 | 2,25 | 1,89 |
| 6 | -0,5 | 0,866 | 0,70 | 45 | 12,98 | 14,32 | 2,6 | 2,89 | 3,11 |
| 7 | 0 | 0 | 0,80 | 40 | 7,930 | 8,520 | 2,15 | 2,23 | 2,45 |
| 8 | 0 | 0 | 0,80 | 40 | 7,990 | 8,580 | 2,15 | 2,22 | 2,46 |
| 9 | 0 | 0 | 0,80 | 40 | 7,980 | 8,580 | 2,17 | 2,23 | 2,46 |

Fonte: A autora.

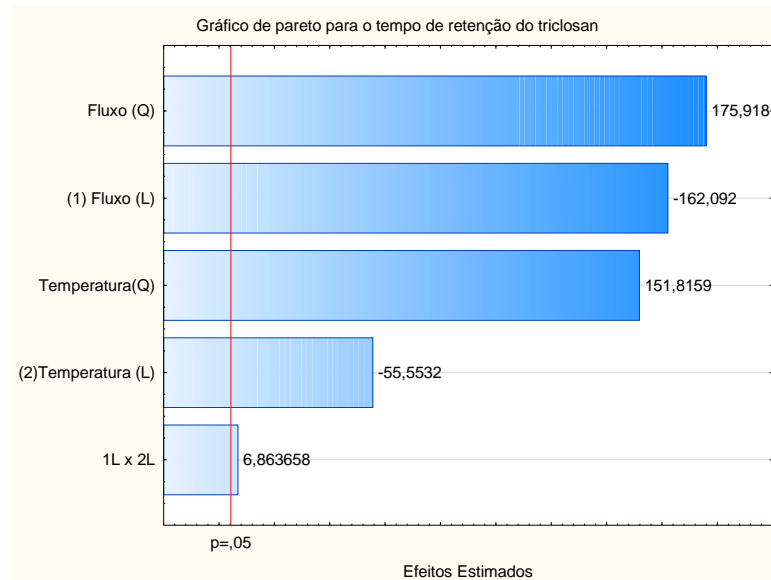
Tabela 5 - Resultados obtidos para o planejamento Doehlert com a coluna C18 de 150 mm.

| Ensaio | Fatores codificados | | Fatores não codificados | | Tempo de retenção | Tempo de retenção | Área do pico | Área do pico | Resolução TCC-TCS |
|--------|---------------------|--------|-------------------------|------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | Fluxo | Temp. | Fluxo | Temp | TCC | TCS | TCC | TCS | |
| | | | (mL.min ⁻¹) | (°C) | (min) | (min) | (10 ⁵) | (10 ⁵) | |
| 1 | 1,0 | 0 | 1,0 | 40 | 6,490 | 6,960 | 1,75 | 1,80 | 1,37 |
| 2 | 0,5 | 0,866 | 0,9 | 45 | 6,540 | 7,150 | 1,94 | 1,97 | 1,75 |
| 3 | -1,0 | 0 | 0,6 | 40 | 10,54 | 11,33 | 2,89 | 2,97 | 1,56 |
| 4 | -0,5 | -0,866 | 0,7 | 35 | 9,910 | 10,42 | 2,38 | 2,66 | 1,03 |
| 5 | 0,5 | -0,866 | 0,9 | 35 | 7,840 | 8,240 | 1,88 | 2,06 | 0,99 |
| 6 | -0,5 | 0,866 | 0,7 | 45 | 8,310 | 9,080 | 2,53 | 2,56 | 1,84 |
| 7 | 0 | 0 | 0,8 | 40 | 7,930 | 8,520 | 2,15 | 2,23 | 1,47 |
| 8 | 0 | 0 | 0,8 | 40 | 7,990 | 8,580 | 2,15 | 2,22 | 1,48 |
| 9 | 0 | 0 | 0,8 | 40 | 7,980 | 8,580 | 2,16 | 2,23 | 1,48 |

Fonte: A autora.

Primeiramente analisando os resultados para a coluna de 250mm. Na Figura 6 é apresentado um dos gráficos de Pareto para os efeitos estimados dos fatores investigados e suas interações.

Figura 6 - Gráfico de Pareto para o tempo de retenção do TCS.



Fonte: A autora.

As barras horizontais mostram o grau de importância que os fatores estudados exercem sobre a separação dos analitos. Quanto mais a barra se afastar da linha de corte vermelha, mais significativo é o efeito. Ou seja, maior é a influência daquele fator na resposta em estudo.

Neste gráfico os fatores: fluxo da fase móvel e temperatura, que estão sendo analisados com relação ao tempo de retenção do TCS. O fluxo foi a variável mais significativa trazendo os maiores tempos de retenção quando este foi ajustado no menor valor (fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$). O que era esperado, pois quanto menor o fluxo os analitos passarão mais lentamente pela coluna, aumentando o tempo de interação entre essas espécies e a fase estacionária, o que eleva o tempo de retenção.

Em seguida, analisando a variável temperatura, no seu menor valor resultou em tempos de retenção maiores visto que em temperaturas mais baixas aumenta a viscosidade dos solventes diminuindo a velocidade de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel o que diminui a eficiência, aumentando o tempo de análise (LANÇAS, 2012).

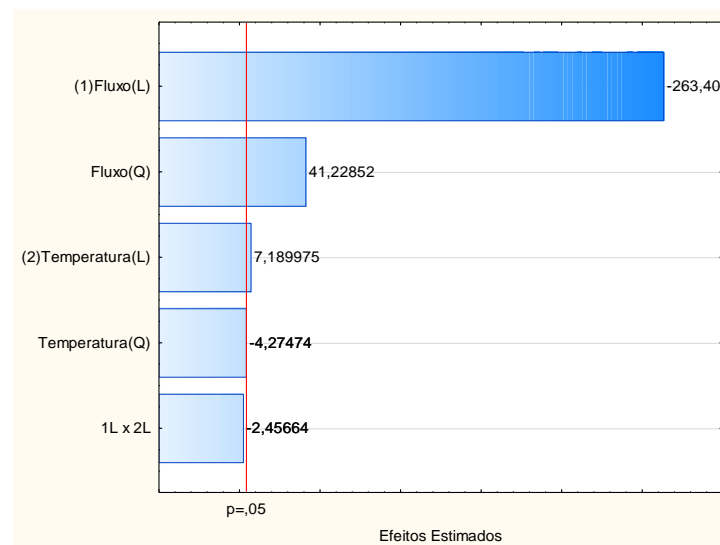
Porém os resultados para essa resposta precisam ser analisados ao contrário em razão de que é necessário um método eficiente, ou seja, que tenha a capacidade de separar os dois analitos com resolução suficientemente adequada, mas que a corrida cromatográfica não seja demorada.

Assim, o custo da análise e a geração de resíduos serão menores, além de que esse método pode ser aplicado na rotina de laboratórios então análises mais rápidas são recomendadas.

Portanto os valores de fluxo e temperatura maiores proporcionam menores tempos de retenção dos compostos em estudo, que por sua vez, são as respostas esperadas. Para o TCC foram observadas as mesmas condições como as melhores.

A Figura 7 apresenta o gráfico de Pareto para a análise dos fatores mais significativos para a resposta área do pico do TCC.

Figura 7 - Gráfico de Pareto para a área do pico do TCC.



Fonte: A autora.

O fluxo foi mais significativo para valores menores, ou seja, fluxos mais baixos favorecem uma maior área tornando o método mais sensível. Também seguiu a mesma tendência para o TCS.

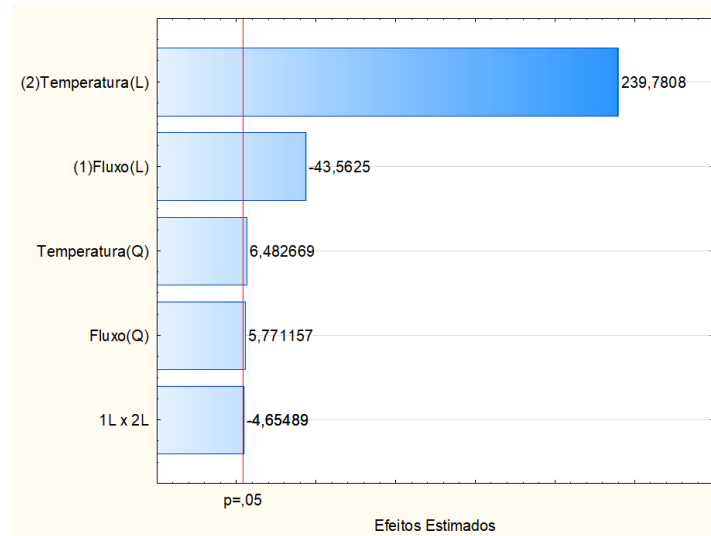
Para a resposta resolução entre os picos de TCC e TCS o gráfico de Pareto é apresentado na Figura 8.

A temperatura foi claramente mais significativa e com valores mais altos. Esta grandeza tem relação direta com a resolução o que pode ser visto pela equação conhecida como Equação Mestre da Resolução:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k}{1+k} \right) \quad (9)$$

Onde: R_s = resolução; N = número de pratos (eficiência); α = fator de separação (k_2 / k_1); k = fator de retenção.

Figura 8 - Gráfico de Pareto para a resolução entre os picos com a coluna de 250 mm.



Fonte: A autora.

Todos esses parâmetros são interdependentes. Mudanças no fator de retenção geram mudanças no fator de separação e, portanto mudanças significativas na resolução. Como a resolução aumenta com o aumento dos valores desses três parâmetros N , α e k , qualquer fator que possa alterá-los poderá melhorar a resolução. A temperatura afeta todos eles e conseqüentemente a resolução. Como pode ser visto pelos efeitos no gráfico de Pareto com o aumento da temperatura é possível conseguir melhores resultados (LANÇAS, 2012).

O fluxo também foi significativo indicando melhores resoluções com fluxos mais baixos. Com o fluxo menor os compostos têm mais tempo para interagir com a coluna saindo melhor separados.

A Análise de Variância (ANOVA) dos resultados obtidos nesse planejamento foi realizada para verificar a significância do modelo matemático obtido que expressa a relação entre as respostas (tempo de retenção, área do pico e resolução entre os picos) com os fatores que a influenciam (fluxo e temperatura). A Tabela 6 apresenta esses dados individualmente para cada resposta.

Tabela 6 - Análise de variância do planejamento Doehlert para a coluna de 250 mm.

| | R | SQ | MQ | F | p |
|--------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| T_r TCC | | | | | |
| Fluxo | 0,9997 | 34,00 | 34,00 | 3,291x10 ⁴ | 3,00x10 ⁻⁵ |
| Temperatura | | 25,61 | 25,61 | 2,479x10 ⁴ | 4,00x10 ⁻⁵ |
| T_r TCS | | | | | |
| Fluxo | 0,9996 | 41,14 | 41,14 | 3,428x10 ⁴ | 2,90x10 ⁻⁵ |
| Temperatura | | 30,70 | 30,70 | 2,559x10 ⁴ | 3,90x10 ⁻⁵ |
| Área (u.a) TCC | | | | | |
| Fluxo | 0,9997 | 0,07400 | 0,07400 | 555,0 | 1,80x10 ⁻³ |
| Temperatura | | 0,01008 | 0,01008 | 75,62 | 1,30x10 ⁻² |
| Área (u.a) TCS | | | | | |
| Fluxo | 0,9997 | 0,2688 | 0,2688 | 8065 | 1,20x10 ⁻⁴ |
| Temperatura | | 0,1056 | 0,1056 | 3168 | 3,10x10 ⁻⁴ |
| Resolução | | | | | |
| Fluxo | 0,9999 | 9,60x10 ⁻⁴ | 9,60x10 ⁻⁴ | 28,90 | 3,30x10 ⁻² |
| Temperatura | | 1,20x10 ⁻³ | 1,20x10 ⁻³ | 36,10 | 2,70x10 ⁻² |

Fonte: A autora.

Notas: R – coeficiente de correlação; SQ – soma quadrática; MQ – média quadrática; F – teste F; p – p-value

A partir da Análise de Variância, todos os modelos foram significativos com coeficientes de correlação superiores a 0,99 e não apresentam falta de ajuste indicando que o modelo quadrático é adequado e capaz de prever satisfatoriamente as melhores condições experimentais.

A Tabela 7 apresenta as condições ótimas de fluxo e temperatura para cada resposta analisada sendo possível observar que estas são bem divergentes. Utilizando fluxos maiores os tempos de retenção são menores tornando as análises mais rápidas e com menores custos, porém para as áreas dos picos e a resolução, fluxos menores trazem melhores respostas indicando melhor sensibilidade analítica.

Desse modo, é necessário ter um equilíbrio entre as estimativas de melhor condição experimental (melhores valores de fluxo e temperatura) que seja capaz de satisfazer todas as respostas (tempo de retenção, área do pico e resolução) da melhor maneira possível.

Tabela 7 - Condições ótimas de fluxo e temperatura para cada resposta analisada para coluna de 250mm.

| Resposta | Fluxo (mL.min ⁻¹) | Temperatura (°C) |
|-----------------------|-------------------------------|------------------|
| Tempo de Retenção TCC | 1,0 | 45 |
| Tempo de Retenção TCS | 1,0 | 45 |
| Área do pico TCC | 0,6 | 45 |
| Área do pico TCS | 0,6 | 45 |

Fonte: A autora.

Uma opção é utilizar a função de desejabilidade proposta por Derringer e Suich que estabelece para cada resposta, valores restritos a um intervalo de [0,1], onde zero significa um valor inaceitável e um, o valor mais desejável. Feita as funções de desejabilidade para cada resposta individualmente, deve-se juntá-las numa desejabilidade global através de uma média geométrica, conseguindo assim, a otimização simultânea se reduzir à maximização de um único valor (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Esse valor único indicará quais são o fluxo e a temperatura ideais para ser a condição ótima do método proposto.

A função de desejabilidade fornecida pelo Programa Statistica para a coluna de 250 mm foi de 0,68, sendo apresentados na Tabela 8, os valores ótimos apontados pelo programa para cada uma das respostas. Os valores experimentais do ponto central ficaram muito próximos desses.

Esses valores experimentais são a média de cada uma das respostas, pois foram realizadas em triplicata, sendo assim a condição foi otimizada indicando que o modelo é exato e reproduzível.

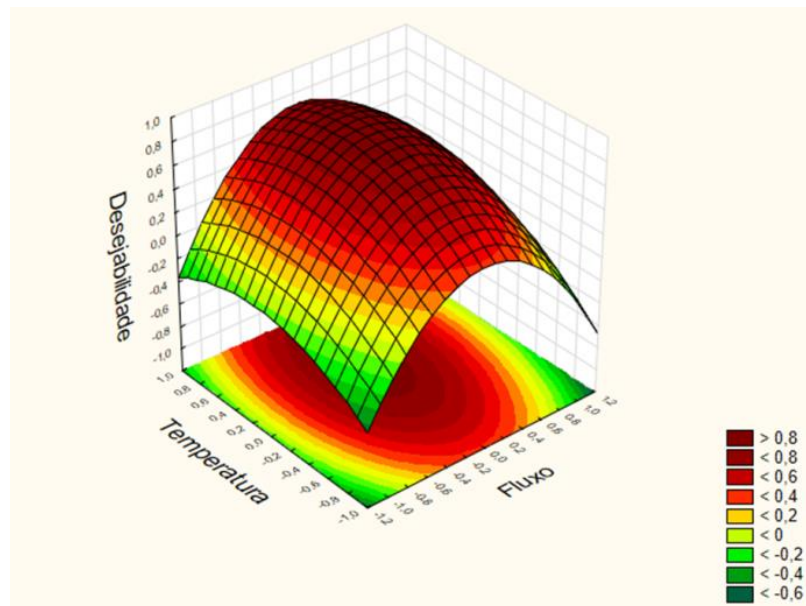
Tabela 8 - Função de desejabilidade para a coluna de 250 mm.

| | Área (TCC) | Área (TCS) | Resolução | t _r (TCC) | t _r (TCS) |
|--------------------------|---------------|---------------|-----------|----------------------|----------------------|
| Valores Statistica | 226158 | 253270 | 2,46 | 12,3 | 13,5 |
| Valores experimentais | 226158 | 253270 | 2,46 | 12,6 | 13,5 |

Fonte: A autora.

A Figura 9 apresenta a superfície de resposta para a desejabilidade podendo observar que quanto mais vermelha a coloração mais próximo está do valor ideal de desejabilidade, ou seja, a região mais escura está o mais próximo do valor 1 possível para esse modelo.

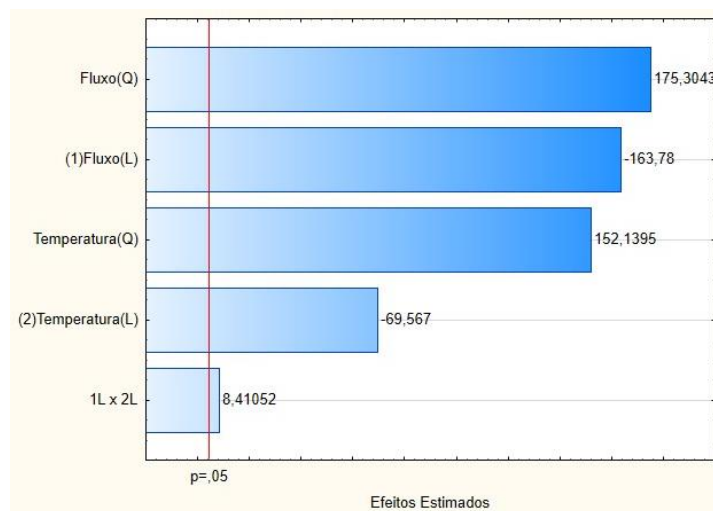
Figura 9 - Superfície de resposta para a desejabilidade com a coluna de 250 mm.



Fonte: A autora.

Para a coluna de 150 mm tomando como exemplo o tempo de retenção para o TCC, Figura 10, pode-se observar que o fluxo é a variável mais significativa no nível baixo ($0,6 \text{ mL min}^{-1}$) seguido da temperatura no nível baixo também (35°C).

Figura 10 - Gráfico de Pareto para o tempo de retenção do TCC para a coluna de 150 mm.

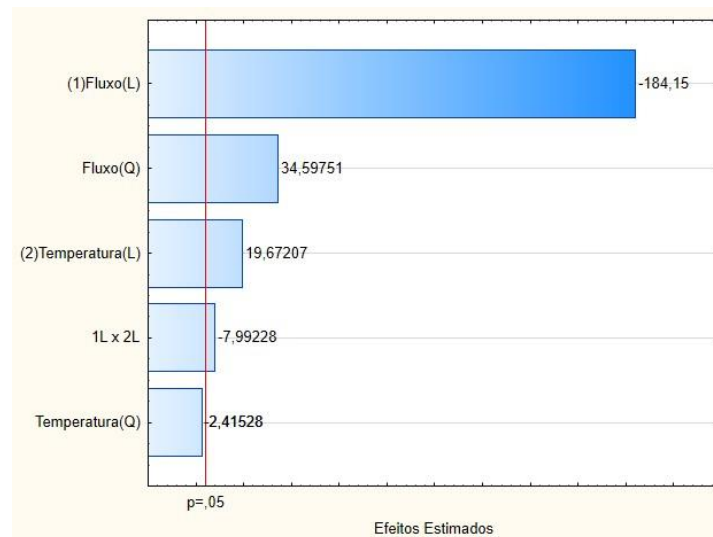


Fonte: A autora.

Assim como na interpretação dos resultados para a coluna de 250 mm, o desejável é o contrário. Fluxo e temperatura maiores para um menor tempo de retenção, porém sem perdas apreciáveis na resolução dos picos, buscando assim, corridas cromatográficas mais rápidas economizando reagentes e diminuindo a geração de resíduos. Para o TCS os mesmos resultados são observados.

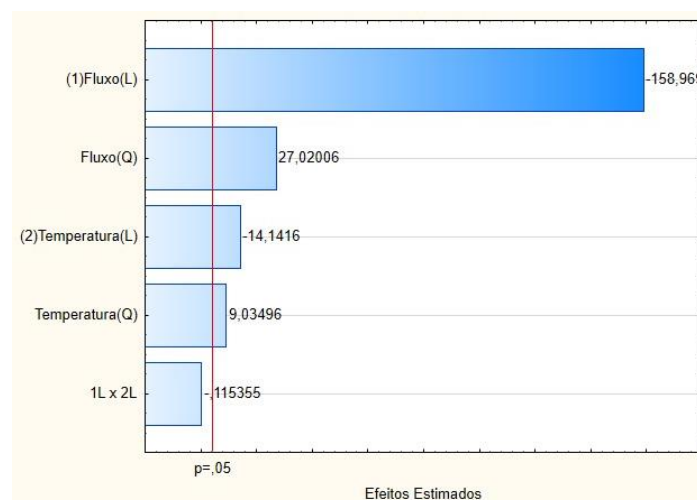
Tanto para a área do pico do TCS, TCC e a resolução, a interpretação é a mesma que para a coluna de 250 mm. Como mostra as Figuras 11, 12 e 13 as melhores condições são fluxos menores e temperaturas mais altas.

Figura 11 - Gráfico de Pareto para a área do pico do TCC para a coluna de 150 mm.



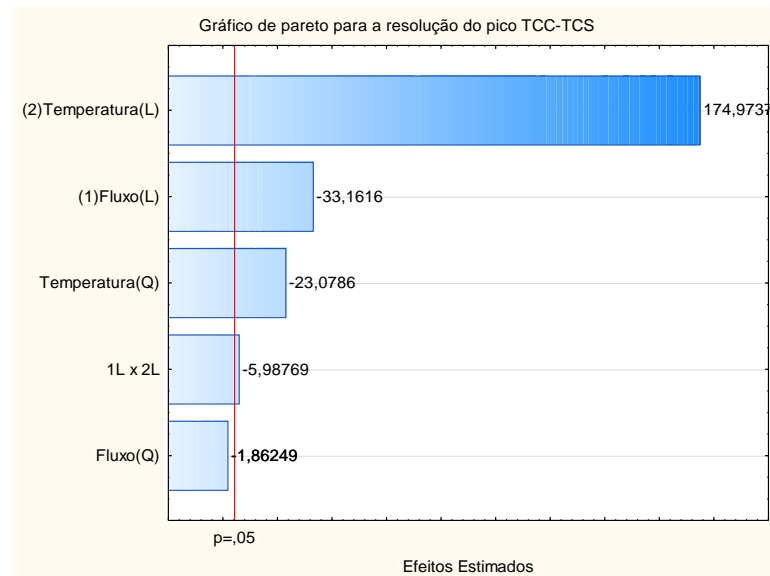
Fonte: A autora.

Figura 12 - Gráfico de Pareto para a área do pico do TCS para a coluna de 150 mm.



Fonte: A autora.

Figura 13 - Gráfico de Pareto para a resolução entre os picos de TCS e TCC para a coluna de 150 mm.



Fonte: A autora.

Do mesmo modo que para a coluna de 250 mm, a Tabela 9 apresenta os dados obtidos pela ANOVA para todos os modelos aplicados à coluna de 150 mm. Todos foram significativos com coeficientes de correlação maiores que 0,99 e não apresentam falta de ajuste indicando que o modelo quadrático é adequado e capaz de prever satisfatoriamente as melhores condições experimentais.

Tabela 9 - Análise de variância do planejamento Doehlert para a coluna de 150 mm.

(continua)

| | R | SQ | MQ | F | P |
|--------------------------|--------|------------------------|------------------------|--------|-----------------------|
| T_r TCC | | | | | |
| Fluxo | 0,9993 | 0,3608 | 0,3608 | 349,2 | 2,80x10 ⁻³ |
| Temperatura | | 4,560x10 ⁻³ | 4,560x10 ⁻³ | 4,420 | 0,1703 |
| T_r TCS | | | | | |
| Fluxo | 0,9991 | 0,4107 | 0,4107 | 342,2 | 2,90x10 ⁻³ |
| Temperatura | | 5,600x10 ⁻⁴ | 5,600x10 ⁻⁴ | 0,4700 | 0,5639 |
| Área (u.a) TCC | | | | | |
| Fluxo | 0,9995 | 0,03333 | 0,03333 | 1000 | 9,90x10 ⁻⁴ |
| Temperatura | | 3,300x10 ⁻⁴ | 3,300x10 ⁻⁴ | 10,00 | 8,7x10 ⁻² |

Fonte: A autora.

Notas: R – coeficiente de correlação; SQ – soma quadrática; MQ – média quadrática; F – teste F; p – p-value

Tabela 9 - Análise de variância do planejamento Doehlert para a coluna de 150 mm.

| | | | | | (conclusão) |
|-----------------------|--------|------------------------|------------------------|-------|-----------------------|
| Área (u.a) TCS | | | | | |
| Fluxo | 0,9998 | 0,0300 | 0,0300 | 902,5 | $1,10 \times 10^{-3}$ |
| Temperatura | | $4,560 \times 10^{-3}$ | $4,560 \times 10^{-3}$ | 136,9 | $7,20 \times 10^{-3}$ |
| Resolução | | | | | |
| Fluxo | 0,9989 | $1,630 \times 10^{-4}$ | $1,630 \times 10^{-4}$ | 4,900 | 0,1570 |
| Temperatura | | $1,10 \times 10^{-2}$ | $1,10 \times 10^{-2}$ | 324,9 | $3,10 \times 10^{-3}$ |

Fonte: A autora.

Notas: R – coeficiente de correlação; SQ – soma quadrática; MQ – média quadrática; F – teste F; p – p-value

A Tabela 10 expressa as condições ótimas de fluxo e temperatura para cada resposta, sendo os mesmos que para a coluna de 250 mm. Sendo preciso utilizar a função de desejabilidade para encontrar a melhor condição capaz de satisfazer todas as respostas estudadas.

Tabela 10 - Condições ótimas de fluxo e temperatura para cada resposta analisada para coluna de 150mm.

| Resposta | Fluxo (mL.min ⁻¹) | Temperatura (°C) |
|-----------------------|-------------------------------|------------------|
| Tempo de Retenção TCC | 1,0 | 45 |
| Tempo de Retenção TCS | 1,0 | 45 |
| Área do pico TCC | 0,6 | 45 |
| Área do pico TCS | 0,6 | 45 |

Fonte: A autora.

Aplicando a função de desejabilidade através do Programa Statistica obteve-se o valor de 0,47, sendo apresentados na Tabela 11 os valores fornecidos pelo programa e também os obtidos experimentalmente mostrando que a melhor condição é o ponto central.

A Figura 14 apresenta a superfície de resposta para a desejabilidade podendo observar que a melhor condição está onde a desejabilidade está mais próxima de 1.

Tabela 11 - Função de desejabilidade para a coluna de 150 mm.

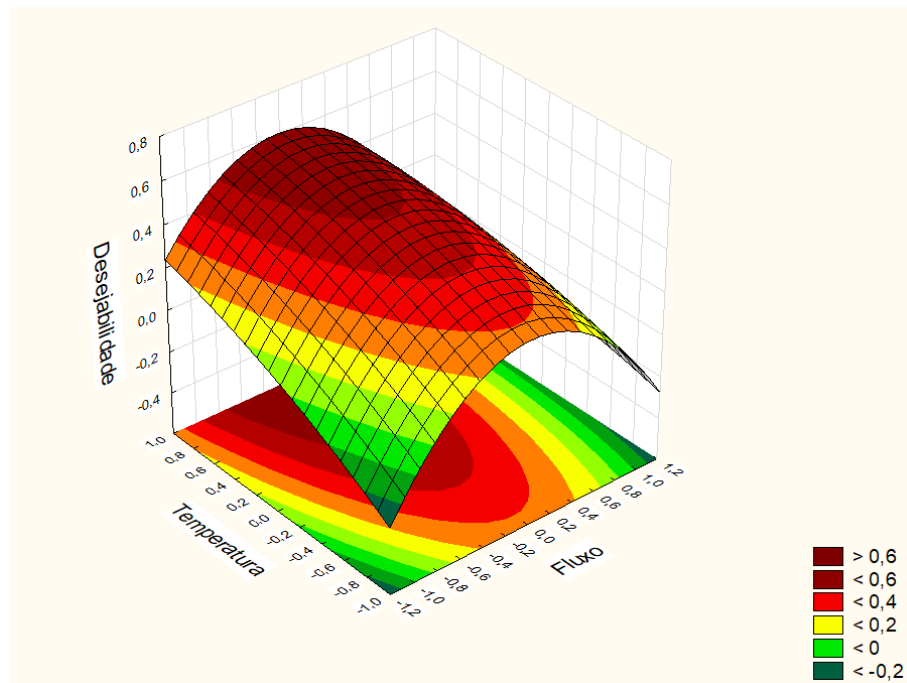
| | Área (TCC) | Área (TCS) | Resolução | t_r (TCC) | t_r (TCS) |
|--------------------------|---------------|---------------|-----------|-------------|-------------|
| Valores Statística | 215018 | 223100 | 1,48 | 7,94 | 8,51 |
| Valores experimentais | 215018 | 223100 | 1,48 | 7,94 | 8,51 |

Fonte: A autora.

Comparando os valores da desejabilidade para as colunas utilizadas, a coluna de 250 mm apresentou o melhor valor, 0,68, enquanto a de 150 mm obteve 0,47 e o que se deseja é que quanto mais próximo de 1 melhor.

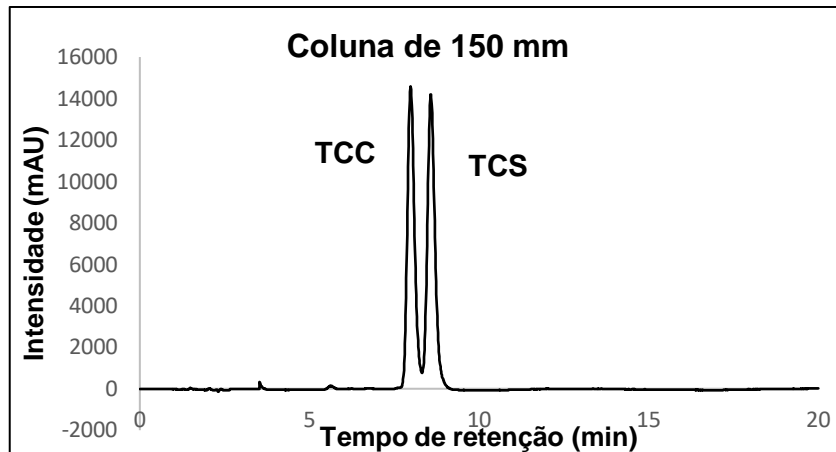
A Figura 15 e 16 apresentam os cromatogramas para a coluna de 150 e 250 mm, respectivamente. O primeiro pico é característico da saída do TCC e em seguida o pico do TCS.

Figura 14- Superfície de resposta para a desejabilidade para a coluna de 150 mm.



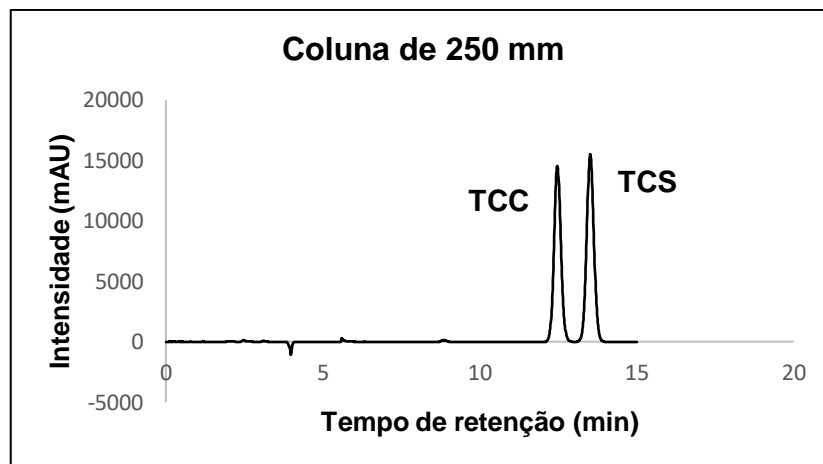
Fonte: A autora.

Figura 15 - Cromatograma para a coluna de 150 mm.



Fonte: A autora.

Figura 16 - Cromatograma para a coluna de 250 mm.



Fonte: A autora.

Na coluna de 250 mm os compostos saem evidentemente melhor separados e os picos com alturas mais parecidas conferindo maior sensibilidade ao método, o que corrobora com os resultados proporcionados pelo planejamento experimental indicando a utilização da coluna de 250 mm.

Assim ficou estabelecido o fluxo da fase móvel de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A otimização de maneira multivariada, ou seja, a partir de planejamento experimental é a melhor alternativa para o desenvolvimento de novas metodologias analíticas. Ainda é encontrada na literatura a aplicação de métodos univariados, analisando a Tabela 4, 83% dos trabalhos descritos utilizam metodologia univariada. Essas estudam uma variável por vez para encontrar as melhores condições experimentais. Isso faz com que as interações entre as variáveis não sejam

avaliadas, apenas um conhecimento específico é gerado enquanto que na análise multivariada tem-se um conhecimento global, de todo o domínio experimental (LEARDI, 2009).

Além de que o número de experimentos necessários em um planejamento experimental é menor do que o número de experimentos em uma abordagem univariada reduzindo custos e tempo.

Das metodologias descritas (Tabela 3) apenas quatro autores estudaram o tipo de coluna sendo uma variável importante para a separação dos analitos, visto que o seu comprimento influencia na resolução dos picos. Assim como nesse trabalho em que a coluna de maior extensão teve melhor valor de resolução, seu tempo de corrida foi maior, porém essa separação significativa é o principal objetivo de uma determinação simultânea entre compostos com estruturas parecidas que fazem interações semelhantes com a coluna cromatográfica.

Ainda analisando esses trabalhos, a maioria dos autores não faz o estudo da temperatura que é de grande significância para a resolução podendo gerar melhores resultados de separação. O fluxo também é pouco estudado sendo que pode influenciar tanto no tempo de corrida, como para se obter melhores áreas dos picos e interações dos analitos com a coluna.

Por fim, das poucas metodologias multivariadas descritas (Tabela 3) nenhuma utiliza a função de desejabilidade que é uma ferramenta estatística muito útil para o estudo de métodos cromatográficos em busca de diferentes respostas. O que traz uma maior importância ao método proposto nesse trabalho.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

5.2.1 Linearidade, Sensibilidade e Robustez

A linearidade do método proposto foi determinada pela elaboração de uma curva analítica relacionando o valor da área do pico com a concentração de TCS. As concentrações foram de 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Essa curva por ser obtida experimentalmente está sujeita a erros e desvios. Como esses dados podem oscilar fica difícil encontrar uma equação que os represente com confiabilidade (VALENTE; RIEDO; AUGUSTO, 2003). Por isso a necessidade de realizar replicatas, para esse método foram elaboradas cinco curvas.

A partir dos valores obtidos em quintuplicata geralmente calcula-se as médias das áreas correspondentes a cada concentração, aplicando a regressão linear sobre essas médias. Porém em alguns casos valores chamados anômalos podem estar entre os usados para calcular a média. Podendo estar associado a algum erro significativo, como por exemplo, devido ao volume aplicado de amostra e, se utilizado no cálculo pode descaracterizar o significado de média (VALENTE; RIEDO; AUGUSTO, 2003).

Sendo assim, o Teste de Huber pode ser uma alternativa para identificar e desprezar valores anômalos, baseado em um conjunto de critérios bastante seguro. Primeiramente são calculados os quocientes das áreas pelas concentrações correspondentes (A/C) para cada uma das cinco curvas totalizando em 35 valores.

Desse conjunto de valores, agora ordenados, é extraído a mediana (md) que é o valor central e que não é afetado pelos anômalos. Em seguida, o intervalo de confiança precisa ser estabelecido, sendo necessário inicialmente calcular as diferenças absolutas entre cada valor de A/C e a md , conforme a equação 10:

$$|A/C_n - md| \quad (10)$$

A seguir é obtido o desvio absoluto da mediana (mad) dos 35 valores de $|A/C_n - md|$ e então o intervalo de confiança (IC) é calculado como:

$$IC = k * mad \quad (11)$$

Onde k é um fator que pode variar de 2 a 8, sendo de escolha do analista e que ao final do tratamento dos dados é analisado se o valor escolhido foi adequado. Assim, podem ser encontrados os limites superior e inferior para desprezar os valores anômalos:

$$IC_{s,i} = md \pm k * mad \quad (12)$$

Considerando esses cálculos, a Tabela 12 apresenta os dados obtidos através do Teste de Huber para o TCS.

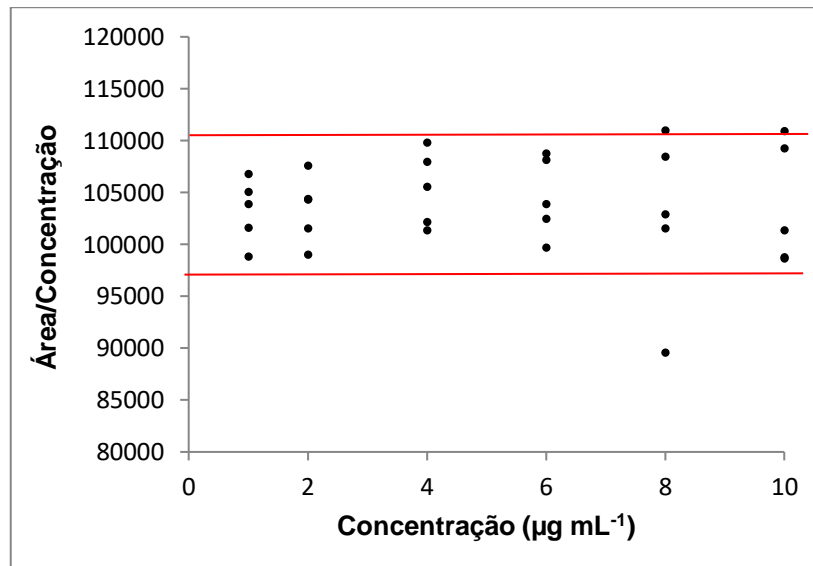
Tabela 12 - Dados obtidos pelo Teste de Huber para o TCS.

| | |
|----------------------------------|----------|
| Mediana (md) | 103905,8 |
| Desvio absoluto da mediana (mad) | 4180,5 |
| K | 2 |
| Limite inferior | 95544,83 |
| Limite superior | 112266,8 |

Fonte: A autora.

A Figura 17 demonstra o gráfico com a distribuição dos valores de área/concentração pelas concentrações.

Figura 17 - Gráfico dos valores anômalos encontrados no Teste de Huber.

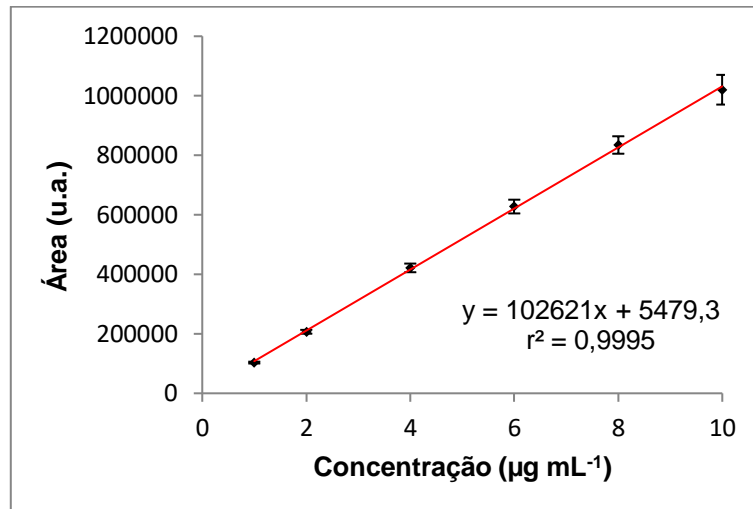


Fonte: A autora.

As linhas representam os limites superior e inferior sendo que os valores fora desse intervalo são os anômalos e devem ser excluídos.

Desse modo a curva analítica pode ser construída, Figura 18, a partir da média das áreas pelas concentrações correspondentes juntamente com os desvios.

Figura 18 - Curva analítica para o TCS.



Fonte: A autora.

O coeficiente de correlação (r^2) é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva sendo que quanto mais próximo de 1 maior a precisão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (AUGUSTO; ANDRADE; CUSTÓDIO, 2000). De acordo com a ANVISA, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação deve ser de 0,99. Deste modo, o valor obtido neste trabalho foi de 0,9995 demonstrando ótima correlação entre a área do pico cromatográfico e a concentração do TCS.

A equação matemática que descreve a relação linear existente entre a área e a concentração de triclosan é:

$$\text{Área} = 102621 \cdot C + 5479,3 \quad (13)$$

Onde C é a concentração de triclosan. Substituindo os valores das concentrações da curva é possível obter os valores interpolados das áreas (A_{int}). Assim podem ser calculadas as diferenças relativas (%) entre estas A_{int} e as médias das correspondentes áreas experimentais A_{exp} que são os resíduos.

Os resíduos são as medidas de quanto as áreas interpoladas se afastam das experimentais (VALENTE; RIEDO; AUGUSTO, 2003). A Tabela 13 apresenta esses dados para o TCS.

Tabela 13 - Áreas interpoladas, áreas experimentais e os resíduos para a curva do TCS.

| Concentração TCS ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Área Interpolada | Área Experimental | Resíduo (%) |
|---|------------------|----------------------|-------------|
| 1,00 | 108100 | 103240 | -0,620 |
| 2,00 | 210720 | 206747 | -0,507 |
| 4,00 | 415961 | 421512 | +0,708 |
| 6,00 | 621203 | 627691 | +0,828 |
| 8,00 | 826444 | 834575 | +1,03 |
| 10,0 | 1031685 | 1020348 | -1,44 |

Fonte: A autora.

Os resíduos sugerem que o erro máximo a ser cometido em interpolações com a equação obtida para a curva analítica do TCS está em torno de 1,44% com suficiente compensação entre resíduos positivos e negativos. Juntando essas informações com o valor do coeficiente de correlação obtido de 0,9995, sendo indicativo de boa precisão da curva obtida, pode-se concluir que a escolha de $k=2$ foi adequada para a rejeição dos valores anômalos.

A Análise de Variância da regressão linear foi realizada e seus resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise de Variância para a regressão do triclosan.

| | SQ | gl | MQ | F_{calculado} | valor – p | F_{crítico} |
|-----------|-----------------------------|-----------|--------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Regressão | $6,41 \times 10^{11}$ | 1 | $6,41 \text{E} \times 10^{11}$ | 8347,828 | $8,6 \times 10^{-8}$ | 7,71 |
| Resíduo | $3,07 \text{E} \times 10^8$ | 4 | 76742790 | | | |
| Total | $6,41 \times 10^{11}$ | 5 | | | | |

Fonte: A autora.

Notas: SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste F; valor – p = probabilidade de significância

Analisando a Tabela 14 é possível verificar que o valor do F calculado é maior que do F crítico demonstrando a existência de uma relação linear entre a concentração do TCS e a área do pico. Além disso, o valor de p é menor que 0,05 comprovando que a regressão é significativa.

Para o TCC, a linearidade também foi determinada pela elaboração da curva analítica relacionando o valor da área do pico com a concentração deste analito. As concentrações foram de 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O teste de Huber foi aplicado e os dados são apresentados na Tabela 15.

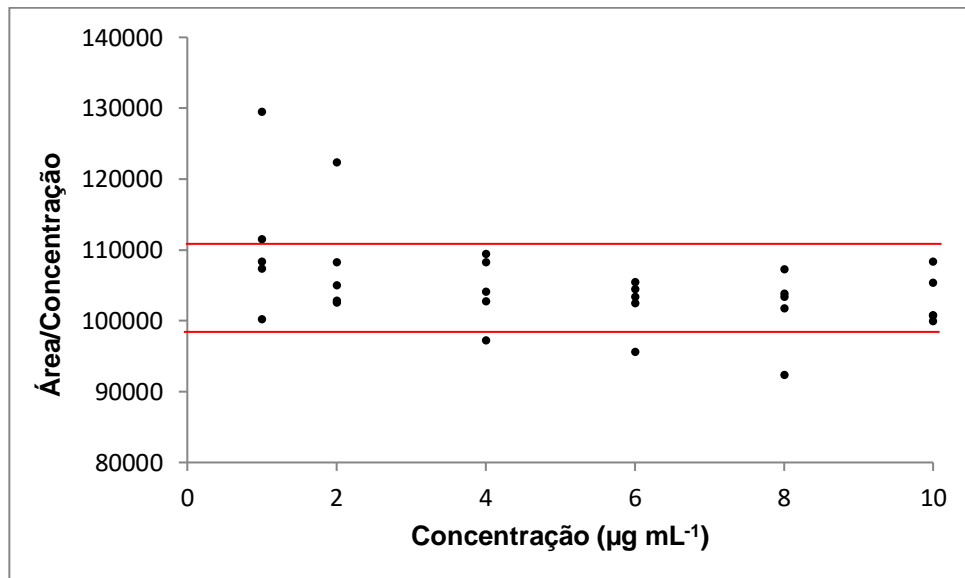
Tabela 15 - Dados obtidos pelo Teste de Huber para o TCC.

| | |
|----------------------------------|----------|
| Mediana (md) | 104027,9 |
| Desvio absoluto da mediana (mad) | 3241,738 |
| K | 2 |
| Limite inferior | 97544,42 |
| Limite superior | 110511,4 |

Fonte: A autora.

A Figura 19 apresenta a distribuição dos valores de área/concentração pelas concentrações para as cinco curvas do triclocarban.

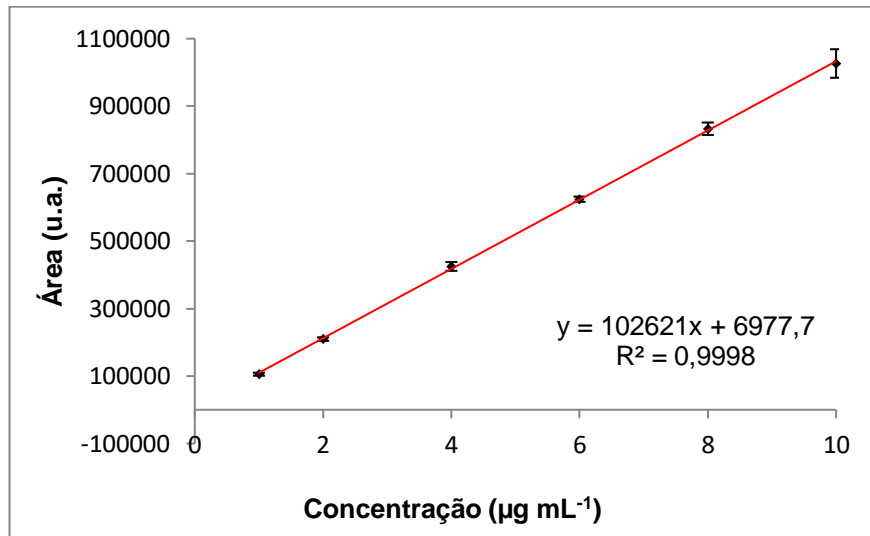
Figura 19 - Gráfico dos valores anômalos encontrados pelo teste de Huber para o triclocarban.



Fonte: A autora.

Os valores que ficaram fora do intervalo estipulado pelo teste foram retirados e a curva analítica, Figura 20, foi construída com os demais e seus respectivos desvios.

Figura 20 - Curva analítica para o triclocarban.



Fonte: A autora.

Por meio da curva obteve-se um coeficiente de correlação de 0,9998 comprovando ótima correlação entre a área do pico cromatográfico e a concentração de TCC.

A Análise de Variância da regressão linear foi então realizada e a Tabela 16 apresenta os resultados.

Tabela 16 - Análise de Variância para a regressão do triclocarban.

| | SQ | gl | MQ | F _{calculado} | valor – p | F _{crítico} |
|-----------|------------------------|----|----------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| Regressão | 6,41x10 ⁻¹¹ | 1 | 6,41E+11 | 16749,39 | 2,1378x10 ⁻⁸ | 7,71 |
| Resíduo | 1,53x10 ⁸ | 4 | 38248375 | | | |
| Total | 6,41x10 ¹¹ | 5 | | | | |

Fonte: A autora.

Notas: SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste F; valor – p = probabilidade de significância

Para o TCC também o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ sendo assim o método pode ser considerado linear na faixa de concentração estudada e a regressão é significativa pois o valor de p está acima de 0,05.

Os resíduos foram calculados para o TCC tendo os valores apresentados na Tabela 17.

Tabela 17- Áreas interpoladas, áreas experimentais e os resíduos para a curva do TCC.

| Concentração TCC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Área Interpolada | Área Experimental | Resíduo (%) |
|---|------------------|----------------------|-------------|
| 1,00 | 109598 | 105354 | -0,767 |
| 2,00 | 212219 | 209493 | -0,492 |
| 4,00 | 417460 | 424838 | +1,33 |
| 6,00 | 622702 | 624163 | +0,264 |
| 8,00 | 827943 | 832893 | +0,894 |
| 10,0 | 1033185 | 1026367 | -1,23 |

Fonte: A autora.

O erro máximo a ser cometido em interpolações com a equação obtida para a curva analítica do TCC está em torno de 1,33% com suficiente compensação entre resíduos positivos e negativos. O valor do coeficiente de correlação obtido foi de 0,9998, concluindo que a escolha de $k=2$ foi adequada para a rejeição dos valores anômalos.

A sensibilidade sob o ponto de vista prático corresponde ao coeficiente angular do gráfico analítico. A Tabela 18 apresenta os valores encontrados para os analitos em estudo juntamente com os coeficientes lineares correspondentes.

Tabela 18 - Coeficientes angulares das curvas analíticas do triclosan e triclocarban.

| Analito | Coeficiente angular | Coeficiente linear |
|--------------|---------------------|--------------------|
| Triclosan | 102621 | 6977,7 |
| Triclocarban | 102621 | 5479,3 |

Fonte: A autora.

Os altos valores dos coeficientes angulares obtidos confere sensibilidade ao método visto que uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor da área medida assegurando a distinção entre picos cromatográficos de concentrações próximas.

Na avaliação da robustez podem ser aplicados experimentos estatísticos que examinam simultaneamente os efeitos das alterações em diferentes variáveis do método. No caso de métodos cromatográficos as variações referem-se a diferentes tipos de colunas, temperatura e fluxo, entre outras (BRITO et al., 2003).

Sendo assim, com a etapa da otimização deste método foi possível analisar a robustez. Visto que a variação no fluxo, na temperatura e no comprimento da coluna pode influenciar significativamente no método alterando o tempo de retenção, a área do pico e a resolução entre os picos. Com isso, é possível concluir que o método não é robusto com relação às variáveis: fluxo, temperatura e extensão da coluna para a determinação simultânea de triclosan e triclocarban, pois pequenas alterações nos valores destes parâmetros causam mudanças significativas nas respostas avaliadas.

5.2.2 Limites de Detecção e Quantificação

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação do TCS e TCC estão apresentados na Tabela 19.

Como as concentrações dos analitos nas amostras certamente tendem a ser superiores aos valores dos limites de detecção e quantificação, o método será capaz de determiná-las com precisão e exatidão.

Tabela 19 - Limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico para o TCS e TCC.

| Analito | Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Limite de Quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|--------------|---|--|
| Triclosan | 0,011 | 0,034 |
| Triclocarban | 0,29 | 0,87 |

Fonte: A autora.

A Tabela 20 apresenta a comparação dos limites de detecção e quantificação desse trabalho frente a outros métodos encontrados na literatura que calcularam esses limites através dos parâmetros da curva, assim como no presente trabalho.

Os limites de detecção e quantificação variam de acordo com a concentração exigida para a matriz a ser estudada. Para determinação em produtos de cuidados pessoais os limites de detecção são maiores comparados aos limites para amostras de águas o que é esperado, pois esses compostos estão em menor concentração em matrizes ambientais, precisando de métodos capazes de detectá-los em baixas concentrações. Além disso, sabe-se que essas matrizes são complexas precisando de uma etapa adicional de pré-concentração o que influencia nesses valores mais baixos de limites de detecção.

Tabela 20 - Comparação dos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico.

| Analito | LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Matriz | Referência |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|
| TCS | 0,011 | 0,034 | Produtos de cuidados pessoais | Esse método |
| TCC | 0,29 | 0,87 | Produtos de cuidados pessoais | Esse método |
| TCS | 2,0 | - | Produtos de cuidados pessoais | Piccoli et al.,2002 |
| TCS | 1,0 | 3,03 | Produtos de cuidados pessoais | Rusdiana; Wibowo; Kartasasmita, 2021 |
| TCS | 0,0285 | - | Detergente | Tsai; Shih; Pan, 2008 |
| TCS | $4,00 \times 10^{-5}$ | $1,1 \times 10^{-4}$ | Águas superficiais | Baranowska; Magiera; Bortniczuk, 2010 |
| TCC | $1,7 \times 10^{-4}$ | $5,0 \times 10^{-4}$ | Águas superficiais | Baranowska; Magiera; Bortniczuk, 2010 |

Fonte: A autora.

5.2.3 Precisão, Exatidão e Especificidade

A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, através do desvio padrão relativo. A Tabela 21 apresenta os valores obtidos para os analitos em estudo.

O método pode ser considerado preciso visto que os desvios não excederam o valor máximo de 5% estabelecido pela ANVISA. Indicando que não houve variabilidade significativa nos resultados em diferentes períodos do dia (repetibilidade) nem em dias diferentes com analistas diferentes.

Tabela 21 - Precisão intradia e intermediária para o triclosan e triclocarban.

| Parâmetro | Triclosan | Triclocarban |
|---------------------------------------|-----------|--------------|
| Precisão intradia (repetibilidade) | 1,10% | 1,18% |
| Precisão intermediária | 2,02% | 2,54% |

Fonte: A autora.

A exatidão e a especificidade podem ser determinadas pelo método de adição de padrão e recuperação (POLONINI et al., 2011; FAVORETTO et al., 2010). Adicionando concentrações diferentes dos analitos às amostras comerciais.

As quantidades encontradas e os percentuais de recuperação para o TCS são apresentados na Tabela 22 e para o TCC na Tabela 23.

Tabela 22 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método cromatográfico desenvolvido.

(Continua)

| Amostras | TCS adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | TCS encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Recuperação % |
|----------------|---|---|-----------------------|
| A ^a | ---- | 1,49 | |
| | 1,5 | 3,01 | 101,7 |
| | 3,0 | 4,50 | 101,0 |
| | 6,0 | 7,52 | 99,77 |
| | 8,0 | 9,57 | 100,6 |
| | | | $\mu = 100,8 \pm 0,6$ |
| B ^a | ---- | 1,51 | |
| | 1,5 | 3,00 | 101,0 |
| | 3,0 | 4,53 | 99,58 |
| | 6,0 | 7,57 | 99,87 |
| | 8,0 | 9,53 | 100,7 |
| | | | $\mu = 100,3 \pm 0,5$ |

Fonte: A autora.

Notas: ^a hidratantes; ^b Desodorantes; ^d Média \pm desvio padrão (DP) de 3 análises independentes.

Tabela 23 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método cromatográfico desenvolvido.

(Continuação)

| Amostras | TCS adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | TCS encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperação % |
|----------------|---|--|-----------------------|
| C ^b | ---- | 1,49 | |
| | 1,5 | 3,01 | 100,8 |
| | 3,0 | 4,52 | 99,65 |
| | 6,0 | 7,58 | 100,9 |
| | 8,0 | 9,60 | 101,0 |
| | | | $\mu = 100,6 \pm 0,7$ |
| D ^b | ---- | 1,52 | |
| | 1,5 | 3,01 | 101,8 |
| | 3,0 | 5,08 | 98,50 |
| | 6,0 | 7,22 | 100,3 |
| | 8,0 | 9,00 | 100,6 |
| | | | $\mu = 100,3 \pm 0,7$ |
| E ^c | ---- | 1,55 | |
| | 1,5 | 3,08 | 102,5 |
| | 3,0 | 4,62 | 101,5 |
| | 6,0 | 7,69 | 101,9 |
| | 8,0 | 9,60 | 102,4 |
| | | | $\mu = 102,1 \pm 0,7$ |
| F ^c | ---- | 1,52 | |
| | 1,5 | 3,08 | 101,9 |
| | 3,0 | 4,59 | 101,0 |
| | 6,0 | 7,70 | 102,0 |
| | 8,0 | 9,65 | 102,1 |
| | | | $\mu = 101,7 \pm 0,5$ |

Fonte: A autora.

Notas: ^b Desodorantes; ^c Pastas de dentes; ^d Média \pm desvio padrão (DP) de 3 análises independentes.

tabela 24 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método cromatográfico desenvolvido.

(Conclusão)

| Amostras | TCS adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | TCS encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperação % |
|----------------|---|--|------------------|
| G ^c | ---- | 1,48 | |
| | 1,5 | 3,02 | 102,3 |
| | 3,0 | 4,50 | 99,72 |
| | 6,0 | 7,51 | 100,8 |
| | 8,0 | 9,46 | 100,6 |
| | | | |
| H ^c | ---- | 1,46 | |
| | 1,5 | 3,01 | 101,0 |
| | 3,0 | 4,49 | 100,1 |
| | 6,0 | 7,62 | 99,87 |
| | 8,0 | 9,55 | 101,5 |
| | | | |

Fonte: A autora.

Notas: ^c Pastas de dente

^d Média \pm desvio padrão (DP) de 3 análises independentes

Tabela 25 - Resultados de recuperação de triclocarban pelo método de adição de padrão para o método cromatográfico desenvolvido.

| Amostras | TCB adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | TCB encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Recuperação ^b % |
|----------------|--|--|-------------------------------|
| A ^a | ---- | 1,51 | |
| | 1,5 | 2,98 | 98,0 |
| | 3,0 | 4,53 | 100,7 |
| | 6,0 | 7,61 | 101,7 |
| | 8,0 | 9,50 | 99,9 |
| | | | |

Fonte: A autora.

Notas: ^a sabonete em barra; ^b Média \pm desvio padrão (DP) de 3 análises independentes

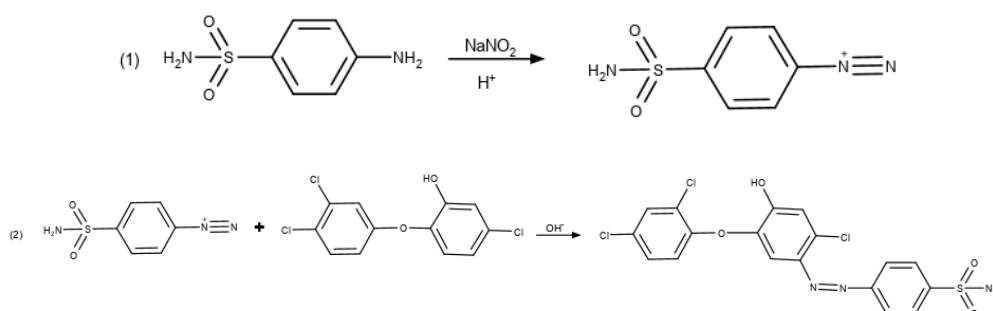
As recuperações variaram de 98,50 – 102,5% para o TCS e de 98,0 – 101,7% para o TCC estando dentro do estimado pela ANVISA que é de variação de 95,0 a 105%, sendo assim o método pode ser considerado exato.

5.3 FORMAÇÃO DO COMPOSTO AZO E SUA ESTABILIDADE

Um estudo preliminar foi realizado para verificar a viabilidade do uso da sulfanilamida e carbonato de sódio como reagentes precursores para a formação de um composto azo, a fim de determinar TCS por espectrofotometria de UV-Visível. Visto que na literatura há relatos do uso desses reagentes ou com características semelhantes para esse fim (TEIXEIRA et al., 2011; YAKABE; HONDA; MAGALHÃES, 2005; DELFRATE; FONSECA; SCHEFFER, 2021; LU; MA; TAO, 2009).

O mecanismo proposto para a reação é apresentado na Figura 21, abaixo.

Figura 21 - Mecanismo proposto para a reação de diazotação do triclosan.



Fonte: A autora.

Nota: Estrutura elaborada no software MarvinSketch20.11.

A sulfanilamida foi empregada na primeira fase da reação em que reage com o nitrito de sódio em meio ácido a fim de formar o sal de diazônio. Este por sua vez, reage com o TCS em meio básico através do carbonato de sódio, formando o composto colorido.

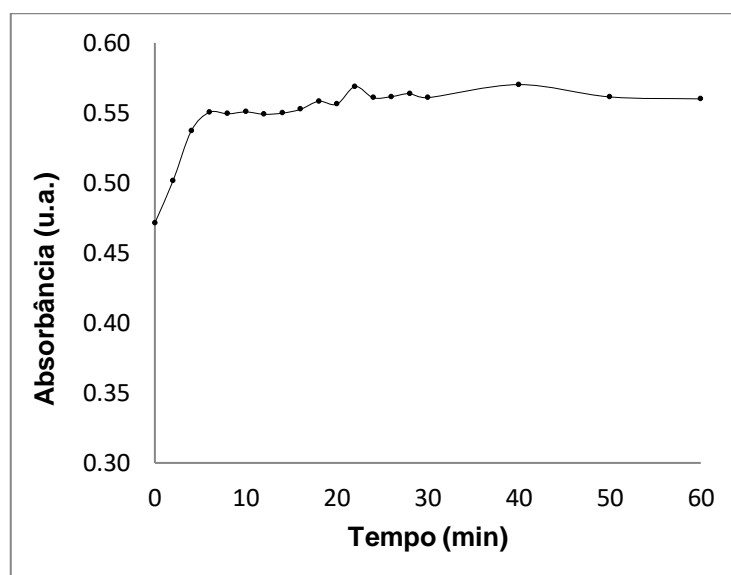
Marques e Borges (2007) relatam que para a formação de compostos azo, agitação e baixa temperatura é indicado. Desta forma a reação foi realizada em temperatura abaixo de 5,00°C e sob agitação. O que também favoreceu a estabilidade óptica do produto formado como pode ser observado na Figura 22.

Os reagentes utilizados neste estudo possibilitaram a formação de um produto amarelo que absorve a 452 nm e apresenta boa estabilidade óptica.

Portanto, esses resultados indicam que é possível utilizar esses reagentes para propor o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação do triclosan.

Além disso, a Figura 22 mostra que com o uso da sulfanilamida a reação ocorre rapidamente e atinge o equilíbrio após 8 minutos. No intervalo de tempo entre 8 e 60 minutos, a intensidade de absorbância em 452 nm permanece praticamente constante e há tempo suficiente para realizar a reação e ler a absorbância do produto formado. Neste trabalho, todas as medidas de absorbância foram feitas após 10 minutos.

Figura 22 - Estabilidade óptica do produto formado após a reação de diazotação do triclosan.



Fonte: A autora.

5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi empregado nos estudos iniciais para determinar como os fatores volume de nitrito de sódio, sulfanilamida e concentrações de ácido clorídrico influenciam a formação do produto colorido.

O objetivo foi obter a melhor condição experimental, na qual se obtenha um valor ótimo para a variável resposta (absorbância medida em 452 nm). Os fatores considerados com os níveis examinados (reais e codificados) e a matriz experimental com os resultados obtidos são apresentados na Tabela 24.

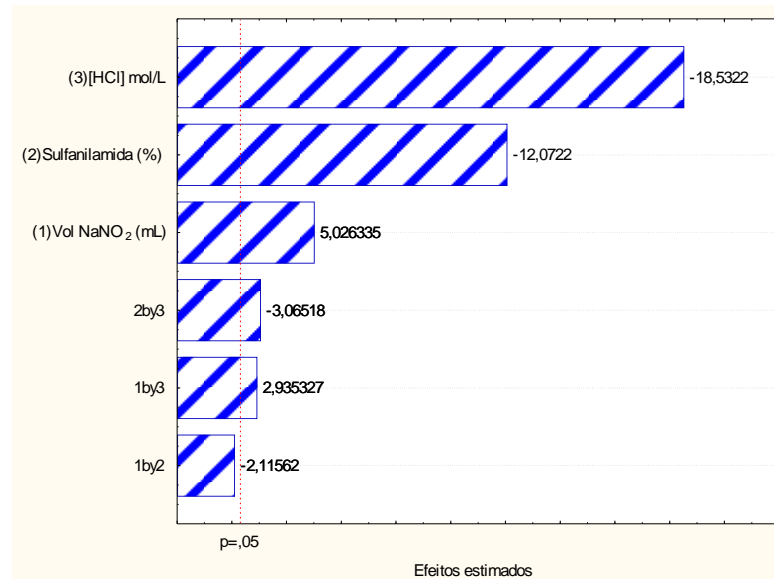
Este estudo exigiu 8 experimentos, que foram replicados para estimar o erro experimental e os dados foram analisados usando o programa Statistica 13.0. A Figura 23 apresenta o gráfico de Pareto.

Os efeitos mais significativos foram as concentrações de sulfanilamida e ácido clorídrico, obtendo melhor resposta quando ambos são ajustados em nível inferior (-1). O fator volume de nitrito nas condições avaliadas foi significativo, porém, apresentou menor influência e quando ajustado em seu nível alto (+1) obtém-se a melhor resposta. Portanto, para continuar o processo de otimização, o volume de nitrito foi fixado no nível mais alto nos experimentos seguintes, ou seja, em 0,8 mL.

Tabela 26- Planejamento fatorial completo 2^3 para o estudo do método espectrofotométrico.

| Ensaio | Fatores codificados | | | Fatores não codificados | | | A_{452nm} \pm desvio (10^{-2}) |
|--------|------------------------|-----------------|-------|--------------------------------|------------------------|---------------------------------|--|
| | V NaNO ₂ | [Sulfanilamida] | [HCl] | V NaNO ₂ (mL) | [Sulfanilamida] (%) | [HCl] mol L ⁻¹ | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,9117 \pm 0,52 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 0,8 | 0,2 | 0,1 | 0,9222 \pm 1,94 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,8026 \pm 0,55 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 0,8 | 0,4 | 0,1 | 0,8372 \pm 1,59 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,6786 \pm 2,11 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 0,8 | 0,2 | 0,2 | 0,8220 \pm 4,90 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,5731 \pm 1,29 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,6013 \pm 0,26 |

Fonte: A autora.

Figura 23 - Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2^3 .

Fonte: A autora.

Para desenvolver o procedimento de otimização, foi adotada a metodologia de superfície de resposta por meio de um planejamento composto central.

Através da superfície de resposta foi possível analisar como a resposta relevante (medição da absorvância do produto colorido) foi influenciada simultaneamente pelos fatores selecionados. Neste estudo, os fatores sulfanilamida e concentração de ácido clorídrico foram avaliados em cinco níveis diferentes, totalizando 11 experimentos.

Os fatores em estudo e seus respectivos níveis (codificados e não codificados), a matriz experimental e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 25. Os experimentos do ponto central foram realizados com repetições ($n=3$) para estimar o erro experimental. Os resultados foram analisados por meio do programa Statistica, versão 13.0.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar a significância do modelo matemático obtido. O modelo foi significativo com coeficiente de correlação superior a 0,99 e não apresenta falta de ajuste indicando que o modelo quadrático é adequado e capaz de prever satisfatoriamente as melhores condições experimentais.

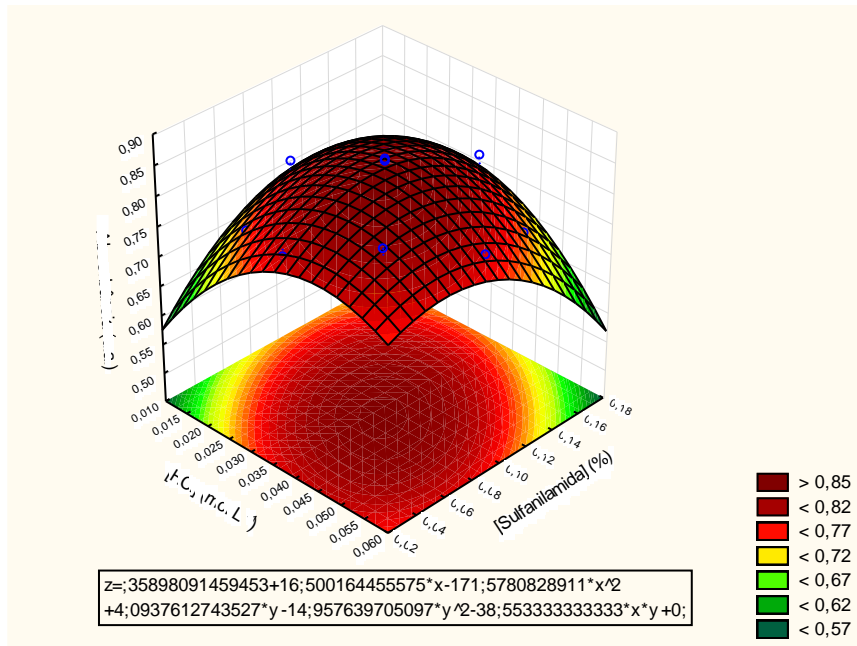
Tabela 27 - Matriz do planejamento composto central para o método espectrofotométrico.

| Ensaio | Fatores codificados | | Fatores não codificados | | $A_{452\text{nm}}$ |
|--------|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|--------------------|
| | [HCl] mol L ⁻¹ | Sulfanilamida (%) | [HCl] mol L ⁻¹ | Sulfanilamida (%) | |
| 1 | -1 | -1 | 0,020 | 0,05 | 0,7447 |
| 2 | 1 | -1 | 0,050 | 0,05 | 0,8352 |
| 3 | -1 | 1 | 0,020 | 0,15 | 0,7591 |
| 4 | 1 | 1 | 0,050 | 0,15 | 0,7340 |
| 5 | 0 | 0 | 0,035 | 0,10 | 0,8548 |
| 6 | 0 | 0 | 0,035 | 0,10 | 0,8603 |
| 7 | 0 | 0 | 0,035 | 0,10 | 0,8378 |
| 8 | -1,41 | 0 | 0,014 | 0,10 | 0,7789 |
| 9 | 1,41 | 0 | 0,056 | 0,10 | 0,7810 |
| 10 | 0 | 1,41 | 0,035 | 0,17 | 0,7861 |
| 11 | 0 | -1,41 | 0,035 | 0,03 | 0,7889 |

Fonte: A autora.

A superfície de resposta (Figura 24) mostra a relação entre as variáveis dependentes. Nesta Figura, a região mais escura apresenta as melhores respostas de absorvância. A equação do modelo quadrático gerado para este planejamento está na mesma Figura 24, e através desta equação é possível prever a condição ótima para realizar a reação proposta. Para este estudo, as condições ideais devem fornecer um valor de absorvância máxima de 0,8537 ($\pm 0,0427$) quando a concentração de sulfanilamida for 0,088% e o ácido clorídrico for 0,038 mol L⁻¹.

Figura 24 - Superfície de resposta para a otimização do método espectrofotométrico.



Fonte: A autora.

Os experimentos foram realizados em triplicata em condições ótimas determinadas pelo modelo matemático para verificar a concordância entre o resultado obtido experimentalmente com o calculado pelo programa. Verificou-se que o resultado fornecido pelo modelo matemático (0,8537) para a medida de absorbância em condições ótimas, concorda com os obtidos experimentalmente ($0,8268 \pm 4,84 \times 10^{-3}$ (R.S.D = 0,6%), com 95% de confiabilidade.

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

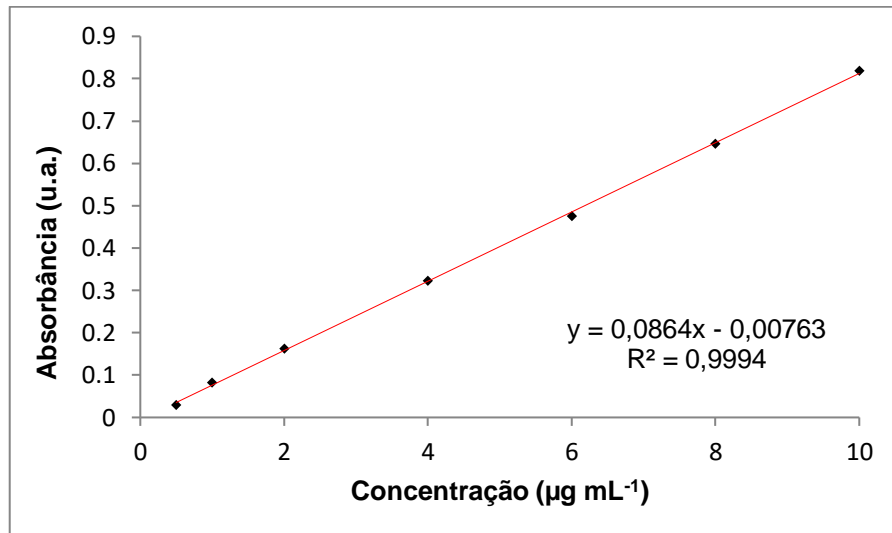
5.5.1 Linearidade

A linearidade do método proposto foi determinada pela elaboração de uma curva analítica, Figura 25, feita em triplicata relacionando o valor da absorbância com a concentração de TCS. As concentrações foram de 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A equação matemática que descreve a relação linear existente entre $A_{452\text{nm}}$ e a concentração de triclosan é: $A_{452\text{nm}} = 0,0864 \times C - 7,63 \times 10^{-3}$, onde C = concentração de triclosan, com coeficiente de correlação de 0,9994. De acordo com a ANVISA, o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação deve ser

0,99. Portanto, o coeficiente de correlação obtido neste estudo demonstra excelente correlação entre absorvância e a concentração do analito relevante.

Figura 25 - Curva analítica do triclosan pelo método espectrofotométrico.



Fonte: A autora.

Além disso, a Análise de Variância para a regressão da curva foi realizada, a Tabela 26 apresenta os dados encontrados.

Como pode ser visto, o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o $F_{\text{crítico}}$, o que comprova a relação linear entre a absorvância e a concentração de triclosan. Além do mais, o valor de p é bem menor que 0,05 sendo assim, a regressão pode ser considerada significativa.

Tabela 28 - Análise de Variância para a regressão da curva do TCS via método espectrofotométrico.

| | SQ | gl | MQ | F_{calculado} | valor – p | F_{crítico} |
|-----------|-----------|-----------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Regressão | 0,532126 | 1 | 0,532126 | 11342,93 | 1,38x10 ⁻⁹ | 6,61 |
| Resíduo | 0,000235 | 5 | 4,69x10 ⁻⁵ | | | |
| Total | 0,53236 | 6 | | | | |

Fonte: A autora.

Notas: SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste F; valor – p = probabilidade de significância

5.5.2 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com a mesma resolução da ANVISA e pelo método da curva analítica, obtendo-se os valores de $0,018 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,060 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 27 apresenta os limites de detecção e quantificação do método espectrofotométrico desenvolvido nesse trabalho e de outros retirados da literatura para o TCS por espectrofotometria.

Tabela 29 - Comparação dos limites de detecção e quantificação do método espectrofotométrico.

| LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Matriz | Referência |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 0,018 | 0,060 | Produtos de higiene pessoal | Esse trabalho |
| 0,079 | - | Produtos de higiene pessoal | Lu; Ma; Tao., 2009 |
| $2,8 \times 10^{-4}$ | $9,5 \times 10^{-4}$ | Águas residuais | Mpupa; Mashile; Nomngongo., 2017 |

Fonte: A autora.

Os limites de detecção e quantificação assim como para o método cromatográfico, variam de acordo com a concentração exigida pela matriz em que serão empregados. Para a determinação de triclosan em produtos de higiene pessoal os limites de detecção e quantificação obtidos são suficientes para essa finalidade. Comparando com o método de Lu; Mao e Tao (2009) o método proposto obteve um limite de detecção mais baixo, ou seja, é mais sensível e capaz de detectar concentrações menores de TCS. Já o método de Mpupa; Mashile; Nomngongo (2017) a matriz sendo águas residuais houve uma etapa de pré-concentração o que provavelmente contribuiu para o baixo valor de limite de detecção encontrado.

5.5.3 Precisão, Exatidão e Especificidade

As precisões intradia e intermediária foram de 1,92 e 1,90%, respectivamente. Demonstrando que o método pode ser considerado preciso uma vez que os valores estão abaixo de 5%.

A especificidade e exatidão foram avaliadas pelo teste de adição de padrão e recuperação, os resultados são apresentados na Tabela 28.

As recuperações variaram de 99,3 – 104,0% estando dentro do estimado pela ANVISA que é de variação de 95,0 a 105%, sendo assim o método pode ser considerado exato.

Tabela 30 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método espectrofotométrico desenvolvido.

(continua)

| Amostras | TCS adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | TCS encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Recuperação ^d % |
|----------------|---|---|-------------------------------|
| A ^a | ---- | 1,46 | |
| | 1,5 | 2,98 | 101,3 |
| | 3,5 | 5,04 | 102,3 |
| | 5,5 | 7,18 | 104,0 |
| | 7,5 | 9,08 | 101,6 |
| | | | $\mu = 102,3 \pm 1,2$ |
| B ^a | ---- | 1,52 | |
| | 1,5 | 3,03 | 100,7 |
| | 3,5 | 5,07 | 101,4 |
| | 5,5 | 7,15 | 102,4 |
| | 7,5 | 9,23 | 102,8 |
| | | | $\mu = 101,8 \pm 1,0$ |
| C ^b | ---- | 1,48 | |
| | 1,5 | 2,99 | 100,7 |
| | 3,5 | 5,06 | 102,3 |
| | 5,5 | 7,18 | 103,6 |
| | 7,5 | 9,10 | 101,6 |
| | | | $\mu = 102,0 \pm 1,2$ |

Fonte: A autora.

Notas: ^a Hidratantes; ^b Desodorantes; ^d Média \pm desvio padrão (DP) de 3 análises independentes

Tabela 28 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método espectrofotométrico desenvolvido.

(continuação)

| Amostras | TCS adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | TCS encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Recuperação ^d % |
|----------------|---|---|-------------------------------|
| D ^b | ---- | 1,52 | |
| | 1,50 | 3,01 | 99,3 |
| | 3,50 | 5,08 | 101,7 |
| | 5,50 | 7,22 | 103,6 |
| | 7,50 | 9,00 | 99,7 |
| | | | $\mu = 101,1 \pm 2,0$ |
| E ^c | ---- | 1,54 | |
| | 1,50 | 3,09 | 100,0 |
| | 3,50 | 5,14 | 102,9 |
| | 5,50 | 7,19 | 102,7 |
| | 7,50 | 9,30 | 103,5 |
| | | | $\mu = 102,3 \pm 1,6$ |
| F ^c | ---- | 1,52 | |
| | 1,50 | 3,05 | 102,0 |
| | 3,50 | 5,10 | 102,3 |
| | 5,50 | 7,19 | 103,1 |
| | 7,50 | 9,19 | 102,3 |
| | | | $\mu = 102,4 \pm 0,5$ |
| G ^c | ---- | 1,54 | |
| | 1,50 | 3,03 | 99,3 |
| | 3,50 | 5,13 | 102,6 |
| | 5,50 | 7,19 | 102,7 |
| | 7,50 | 9,14 | 101,3 |
| | | | $\mu = 101,5 \pm 1,6$ |

Fonte: A autora.

Notas: ^b Desodorantes; ^c Pastas de dente; ^d Média \pm desvio padrão (DP) de 3 análises independentes

Tabela 28 - Resultados de recuperação de TCS pelo método de adição de padrão para o método espectrofotométrico desenvolvido.

| Amostras | TCS adicionado | TCS encontrado | Recuperação ^d |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | % |
| H ^c | ---- | 1,48 | |
| | 1,50 | 3,01 | 102,0 |
| | 3,50 | 4,99 | 100,3 |
| | 5,50 | 7,02 | 100,7 |
| | 7,50 | 9,00 | 100,3 |
| | | | $\mu = 100,8 \pm 0,8$ |

Fonte: A autora.

Notas: ^c Pastas de dente; ^d Média \pm desvio padrão (DP) de 3 análises independentes

5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS PROPOSTOS

Tendo os dois métodos validados, a Tabela 29 apresenta uma comparação entre os parâmetros obtidos na validação para o TCS. A faixa linear de ambos os métodos está dentro do necessário para a determinação de TCS em produtos de cuidados pessoais, pois sua concentração está em torno de 0,3% estando dentro da curva analítica.

Pela equação linear obtida é possível perceber que o método cromatográfico é mais sensível que o espectrofotométrico considerando que quanto maior o valor do coeficiente angular maior a sensibilidade. Em contrapartida o coeficiente linear obtido pela espectrofotometria é menor que por cromatografia que é o desejável, indicando menores desvios e erro experimental. Os coeficientes de correlação foram bem próximos, ambos apresentam boa concordância entre as respostas (área e absorbância) e a concentração do analito.

Os limites de detecção e quantificação foram menores para o método cromatográfico conferindo maior sensibilidade a este. Para a repetibilidade a CLAE apresentou melhor resultado sendo mais preciso nas determinações em diferentes períodos do dia. Já a precisão em dias diferentes com analistas diferentes a espectrofotometria de UV-Visível demonstrou melhor valor. Para o estudo da exatidão também o método cromatográfico foi melhor apresentando as maiores recuperações.

Tabela 31 - Comparação dos parâmetros de validação entre os métodos cromatográfico e espectrofotométrico.

| Parâmetro | Método Cromatográfico | Método espectrofotométrico |
|---|--------------------------|----------------------------|
| Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 1,00 – 10,0 | 0,500 – 10,0 |
| Equação da reta | Área = 102621.C + 5479,3 | Abs = 0,0864.C – 0,00763 |
| Coefficiente linear | 0,9995 | 0,9994 |
| Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,011 | 0,018 |
| Limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,034 | 0,060 |
| Repetibilidade (%) | 1,10 | 1,92 |
| Precisão intermediária (%) | 2,02 | 1,90 |
| Exatidão (%) | 98,50 – 102,5 | 99,30 – 104 |

Fonte: A autora.

De um modo geral, o método cromatográfico se sobressaiu ao método espectrofotométrico. Isso era o esperado devido à CLAE ser um método de separação que consegue avaliar com maior precisão e exatidão o analito individualmente e simultaneamente com outros compostos.

O método espectrofotométrico também tem suas vantagens, pois pode ser considerado mais simples o seu manuseio, mais barato com relação ao equipamento, seus gastos com reagentes e manutenção e mais rápido para se obter a resposta.

Enfim, não se tem um método considerado melhor ou pior, cada um pode atender as necessidades do objetivo que se quer alcançar.

5.7 DETERMINAÇÃO DE TCS E TCC POR CLAE E TCS POR UV-VIS

A Tabela 30 apresenta as concentrações encontradas de TCS e TCC nas amostras de produtos de cuidados pessoais para o método cromatográfico e a Tabela 31 de TCS pelo método espectrofotométrico.

Tabela 32 - Valores de triclosan e triclocarban encontrados em amostras de produtos de cuidados pessoais pelo método cromatográfico.

| Amostra | % média ^e ± SD (m/m) | RSD (%) |
|----------------|---------------------------------|---------|
| A ^a | 0,29 ± 1,0 x 10 ⁻² | 3,4 |
| B ^a | 0,30 ± 5,6 x 10 ⁻³ | 1,9 |
| C ^a | 0,30 ± 9,4 x 10 ⁻³ | 3,1 |
| D ^a | 0,29 ± 1,1 x 10 ⁻³ | 0,4 |
| E ^b | 0,29 ± 1,8 x 10 ⁻³ | 0,6 |
| F ^b | 0,31 ± 5,5 x 10 ⁻³ | 1,8 |
| G ^c | 0,29 ± 1,1 x 10 ⁻³ | 0,4 |
| H ^c | 0,30 ± 9,9 x 10 ⁻³ | 3,3 |
| I ^d | 1,39 ± 1,9 x 10 ⁻² | 1,4 |

Fonte: A autora.

Notas: ^aPasta de dente contendo TCS; ^bCreme corporal contendo TCS; ^cDesodorante contendo TCS; ^dSabonete em barra contendo TCC; ^eTriplicata.

De acordo com a mais recente Resolução RDC nº 528 de 2021 da ANVISA o TCS pode ser adicionado em concentração máxima de 0,3% nos produtos de cuidados pessoais. Sendo assim, em conformidade com ambos os métodos propostos, sua concentração está dentro da margem estabelecida pelo órgão competente.

O TCC nesta nova resolução não pode exceder 0,2%, o método indicou uma concentração de 1,39% bem acima do limite estabelecido.

Tabela 33 - Valores de triclosan encontrados em amostras de produtos de cuidados pessoais pelo método espectrofotométrico.

| Amostra | % média ^d ± SD (m/m) | RSD (%) |
|----------------|---------------------------------|---------|
| A ^a | 0.30 ± 1,0 x 10 ⁻² | 3,3 |
| B ^a | 0.29 ± 7,6 x 10 ⁻³ | 2,6 |
| C ^a | 0.30 ± 6,4 x 10 ⁻³ | 2,1 |
| D ^a | 0.28 ± 1,1 x 10 ⁻² | 3,9 |
| E ^b | 0.29 ± 7,8 x 10 ⁻³ | 2,7 |
| F ^b | 0.28 ± 2,5 x 10 ⁻³ | 0,9 |
| G ^c | 0.29 ± 1,1 x 10 ⁻² | 3,8 |
| H ^c | 0.29 ± 9,9 x 10 ⁻³ | 3,4 |

Fonte: A autora.

Notas: ^a Pasta de dente contendo TCS; ^b Creme corporal contendo TCS; ^c Desodorante contendo TCS;

^d Triplicata.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho duas novas metodologias para a determinação de agentes antimicrobianos em produtos de higiene pessoal são propostos. Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos para separar e quantificar triclosan e triclocarban e um método espectrofotométrico a partir de uma reação de diazotação para a determinação de triclosan.

O desenvolvimento do método cromatográfico utilizando como fase móvel metanol e água permitiu a obtenção de um método mais simples e barato. O planejamento experimental através da matriz de Doehlert facilitou avaliar que o fluxo, a temperatura e o tamanho da coluna cromatográfica influenciam no tempo de retenção, área do pico e resolução entre os picos. Por meio da função de desejabilidade foi possível encontrar uma única condição capaz de satisfazer todas essas respostas.

Para o desenvolvimento do método espectrofotométrico o estudo da estabilidade óptica foi fundamental para a comprovação de que o composto colorido formado é estável, podendo ser usado para a determinação de triclosan. A partir do planejamento fatorial completo foi possível concluir que a concentração de ácido clorídrico e sulfanilamida influenciam na reação de diazotação com interação significativa. Assim a otimização através do planejamento composto central possibilitou encontrar a condição ótima desses parâmetros para a obtenção da maior absorvância possível.

Sendo assim, a otimização multivariada contribuiu para a obtenção das melhores condições experimentais para ambos os métodos propostos de maneira eficiente utilizando menos experimentos e podendo avaliar as interações entre as variáveis do sistema, o que não é possível em estudos univariados.

Através da validação foi possível certificar-se de que os métodos apresentaram boa correlação linear entre as respostas (área do pico e absorvância) e a concentração de TCS e TCC, todos com fator de correlação acima de 0,99 e pela Análise de Variância todas as regressões foram significativas. O teste de Huber aplicado ao estudo da linearidade para o método cromatográfico conferiu maior confiabilidade ao retirar os valores anômalos da curva analítica.

Todos apresentaram sensibilidade e limites de detecção e quantificação adequados para a determinação dos analitos em produtos de higiene pessoal, sendo comparáveis aos valores encontrados na literatura para esse tipo de matriz.

Não tiveram variações significativas nas determinações em diferentes períodos do dia, dias diferentes e com analistas diferentes. Além de alcançar percentuais de recuperação dentro dos 95 – 105% nas adições de padrão, que é o recomendado pela ANVISA. Sendo assim, ambos os métodos puderam ser considerados precisos e exatos.

O método cromatográfico se sobressaiu ao método espectrofotométrico devido a sua melhor sensibilidade, limites de detecção e quantificação mais baixos e melhores percentuais de recuperação. Sendo que pode determinar além do triclosan, outros analitos simultaneamente por ser um método de separação e quantificação. Porém o método espectrofotométrico é mais simples, barato e também consegue determinar com precisão e exatidão a concentração do triclosan.

A avaliação da concentração de TCS nos produtos de higiene pessoal por ambos os métodos demonstrou que todas as amostras estavam dentro do valor estipulado pelo órgão competente. Para o TCC a concentração encontrada estava bem acima do recomendado.

Por fim, os métodos mostraram-se viáveis para a determinação de TCS e TCC (com o método cromatográfico) em produtos de higiene pessoal podendo ser utilizado para confirmar se suas concentrações estão dentro do valor limite permitido e também podem ser incluídos em rotina de laboratório para controle de qualidade. Além de que, o método cromatográfico pode ser utilizado para a determinação simultânea de TCS e TCC em amostras ambientais, efluentes, águas residuais como contaminantes de preocupação emergente.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC. **A indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos: Essencial para o Brasil**. Disponível em: https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2021/04/Panorama_do_Setor_Atualizado_Novembro2021_V2.pdf. Acesso em: 13 dez. 2021.

ALSHISHANI, A.; SAAID, M.; BASHEER, C.; SAAD, B. High performance liquid chromatography determination of triclosan, triclocarban and methyl-triclosan in wastewater using mini-bar microsolid phase extraction. **Microchemical Journal**, Penang, v. 147, p. 339-348, mar. 2019.

AMORIM, A. F. V. **Métodos Cromatográficos**. Fortaleza: Editora da Universidade Estadual do Ceará, 2019.

AMINU, N.; CHAN, S.; TOH, S. Development and Validation of a stability-indicating HPLC-UV method for the simultaneous determination of flurbiprofen and triclosan in dental nanogel formulations. **Journal of Physical Science**, Penang, v. 29, p.1-7, fev. 2018.

ARAÚJO, C. R. M. Desenvolvimento De Fármacos por Hibridação Molecular: Uma Aula Prática de Química Medicinal usando Comprimidos de Paracetamol e Sulfadiazina e a Ferramenta Virtual. **Química Nova**, Petrolina, v. 38, n. 6, p. 868-873, abr. 2015.

ARAÚJO, P.; GRUNG, B. Chemometrics in chromatography. **Journal of Chromatography B**, Bergen, v. 910, p. 1, nov. 2012.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, Bergen, v.877, p. 2224–2234, jan. 2009.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. Faixa Linear de Uma Curva de Calibração. **Chemkeys**, Campinas, p. 1-8.

BARANOWSKA, I.; MAGIERA, S.; BORTNICZUK, K. Reverse-phase HPLC method for the simultaneous analysis of triclosan and triclocarban in surface waters. **Water Science & Technology: Water Supply**, Gliwice, p. 173-180, 2010.

BARWICK, V. J. Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Teddington, v. 849, p. 13-33, abr. 1999.

BEDOUX, G.; ROIG, B.; THOMAS, O.; DUPONT, V.; LE BOT, B. Occurrence and toxicity and antimicrobial triclosan and by-products in the environment. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, Vannes, v. 19, p. 1044-1065, nov. 2011.

BONFILIO, R. *et al.* Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. **Talanta**, Alfenas, v. 80, p. 236-241, jul. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução N° 211, de 14 de julho de 2005. Dispõe sobre a atualização das normas e procedimentos constantes na Resolução n° 79 de 28 de agosto de 2000, referentes a registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e outras abrangências neste contexto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 211, 14 jul. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 166, 24 jul. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 528, de 04 de agosto de 2021. Dispõe sobre a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL n° 35/20. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 528, 04 ago. 2021.

BRASIL. Decreto nº10329, de 28 de abril de 2020. Dispõe sobre a definição dos serviços públicos e atividades essenciais. **Lex**: Coletânea de Legislação e Jurisprudência, Brasília, 28. abr. 2020. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10329.htm#:~:text=DECRETO%20N%C2%BA%2010.329%2C%20DE%2028,p%C3%BAblicos%20e%20as%20atividades%20essenciais. Acesso em: 21 ago. 2021.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008-Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. **Coordenação Geral de Acreditação**, revisão 09, jun. 2020.

BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environment concentrations and toxicity. **Chemosphere**, Miami, v. 82, p. 1518-1532, ago./ dez. 2010.

BRITO, A. **Metodologia Científica**. Disponível em: <http://www.ppgia.pucpr.br/~alceu/mestrado/MC/MCIC_01_v4.pdf> Acesso em: 16 de jun. 2019.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p. 129-146, dez. 2003.

CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M.; CÂMARA, M.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development . **Talanta**, Santa Fé, v. 124, p. 13-138, fev. 2014.

CHEN, J.; MENG, X.; BERGMAN, A.; HALDEN, R. U. Nationwide reconnaissance of five parabéns, triclosan, triclocarban and its transformation products in sewage sludge from China. **Journal of Hazardous Materials**, Tempe, v. 365, p. 502-510, nov. 2018.

CHEN, M.; LIU, Y.; LIN, C.; PONNUSAMY, V. K.; JEN, J. Rapid determination of triclosan in personal care products using new in-tube based ultrasound-assisted salt-induced liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Analytica Chimica Acta**, Taichung, v. 767, p. 81-87, jan. 2013.

COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 107-114, 2011.

COSTA, I. F. Vantagens e limitações da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. LinkedIn, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.linkedin.com/pulse/vantagens-e-limita%C3%A7%C3%B5es-da-t%C3%A9cnica-de-cromatografia-ferreira-costa/?originalSubdomain=pt>. Acesso em: 12 ago. 2020.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907-938, dez. 1999.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, maio. 1998.

DELFRATE, G. FONSECA, R. I. D.; SCHEFFER, E. W. O. Determinação do composto triclosan em amostras de água superficial. **Brazilian Journal of Development**, Ponta Grossa, v. 7, n. 1, jan. 2021.

DIAS, A. N.; SILVA, A. C. da; SIMÃO, V.; MERIB, J.; CARASEK, E. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, Florianópolis, v. 888, p. 59-66, ago. 2015.

DING, S.; WANG, X.; JIANG, W.; ZHAO, R.; SHEN, T.; WANG, C.; WANG, X. Influence of pH, inorganic anions, and dissolved organic matter on the photolysis of antimicrobial triclocarban in aqueous systems under simulated sunlight irradiation. **Environmental Science and Pollution Research**, Jinan, v. 22, p. 5204-5211, out. 2014.

FANG, J.; STINGLEY, R. L.; BELAND, F. A.; HARROUK, W. LUMPKINS, D. L.; HOWARD, P. Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. **Journal of Environmental Science and Health**, Jefferson, v.28, p. 147-171, set. 2010.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª edição, Volume II, Brasília, 2010.

FAVORETTO, L. B.; *et al.* Validação de Método Espectrofotométrico na Região do UV para Quantificação de Famotidina em Cápsulas. **Química Nova**, Alfenas, v. 33, n. 7, p. 1585-1589, jun. 2010.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, Salvador, v. 63, p. 1061-1067, mar. 2004.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, São José do Rio Preto, v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009.

HALDEN, R.; PAULL, D. H. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 1420-1426, jan. 2005.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, Sydney, p. 2-13, jan. 2012.

HOUTMAN, C. J. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. **Journal of Integrative Environmental Sciences**, Baltimore, v. 7, N°4, p.271-295, dez. 2010.

KAUR, I. *et al.* Spectrophotometric determination of triclosan based on diazotization reaction: response surface optimization using Box–Behnken design. **Water Science & Technology**, Amritsar, p. 1-9, mar. 2018.

KAZAKEVICH, Y. V.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (HPLC). **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2012.

LEAL, C. S. M. **Solubilidade de Corantes Azo**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Genova, v. 652, p. 161–172, jun. 2009.

LIU, T.; WU, D. High-performance liquid chromatographic determination of triclosan and triclocarban in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, p. 1–6, jul. 2012.

LU, H.; MA, H.; TAO, G. Spectrophotometric determination of triclosan in personal care products. **Spectrochimica Acta Part A**, Jiangsu, v. 73, p. 854-857, abr. 2009.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, Campinas, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, jun. 2010.

MARQUES, J. A.; BORGES, C. P. F. **Práticas de Química Orgânica**. 1ª ed. São Paulo: Átomo, 2007.

MATEUS, N. B.; BARBIN, A.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

McDONNELL, G. E. **Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action, and resistance**. Washington: American Society for Microbiology, 2007.

MONTASERI, H.; FORBES, P. B. C. A review of monitoring methods for triclosan and its occurrence in aquatic environments. **Trends in Analytical Chemistry**, Pretória, v. 85, p.221–231, 2016.

MPUPA, A.; MASHILE, G. P.; NOMNGONGO, P. N. Ultrasound-assisted dispersive solid phase nanoextraction of selected personal care products in wastewater followed by their determination using high performance liquid chromatography-diode array detector. **Journal of Hazardous Materials**, Johannesburgo, v. 370, p. 33-41, ago. 2018.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 1978. p. 7-10.

PADHYE, L. P. *et al.* Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. **Water Research**, Atlanta, v. 51, p. 266-276, nov. 2013.

PERES, T. B. Noções Básicas de Cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, dez. 2002.

PECK, A. M. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. **Anal Bioanal Chem**, Nova York, v. 386, p. 907-939, set. 2006.

PICCOLI, A.; FIORI, J.; ANDRISANO, V.; ORIOLI, M. Determination of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC). **Il Farmaco**, Bolonha, v. 57, p. 369-372, fev. 2002.

PINTADO-HERRERA, M. G.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; LARA-MARTÍN, P. A. Atmospheric pressure gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (APGC-ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE). **Analytica Chimica Acta**, Cádiz, p. 1-13, maio. 2014.

POLONINI, H. C. *et al.* Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação do Teor de Sinvastatina em Cápsulas Magistrais. **Química Nova**, Juiz de Fora, v. 34, n.3, p. 516-519, jan. 2011.

REICHERT, G. *et al.* Determination of Parabens, Triclosan, and Lipid Regulators in a Subtropical Urban River: Effects of Urban Occupation. **Water Air Soil Pollut**, Curitiba, v. 231, n. 133, p. 1-11, fev. 2020.

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

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

ROUTMAN, C. J. Emerging contaminants in surface water and their relevance for the production of drinking water in Europe. **Journal of Integrative Environmental Sciences**, Harleem, v. 7, n. 4, p. 271-295, dez. 2010.

ROZAINI, M. H. *et al.* Green adsorption–desorption of mixed triclosan, triclocarban, 2-phenylphenol, bisphenol A and 4-*tert*-octylphenol using MXene encapsulated polypropylene membrane protected micro-solid-phase extraction device in amplifying the HPLC analysis. **Microchemical Journal**, Seri Iskandar, v. 170, p.106695, jul. 2021.

RUSDIANA, N.; WIBOWO, M. S.; KARTASASMITA, R. E. Determination of Triclosan in Indonesian Household, Personal Care, and Cosmetic Products by Isocratic Reversed-Phase Highperformance Liquid Chromatography. **Rasayan J. Chem.**, West Java, v. 14, n. 2, p. 1435-1440, jun. 2021.

SALIMI, M. *et al.* Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP technologies. **Environ. Monit. Assess**, Teerão, v. 189, n. 414, p.1-22, jun. 2017

SCOTT, R. P. W. **Principles and Practice of Chromatography**. Disponível em: https://www.academia.edu/40280802/Chrom_Ed_Book_Series_PRINCIPLES_AND_PRACTICE_OF_CHROMATOGRAPHY. Acesso em: 24 abr. 2020.

SHARIATI-RAD, M.; IRANDOUST, M.; MOHAMMADI, S. Spectrophotometric determination of nitrite in soil and water using cefixime and central composite design. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kermanshah, v. 149, p.190–195, maio. 2015.

SHI, Q.; ZHUANG, Y.; HU, T.; LU, C.; WANG, X.; HUANG, H.; DU, G. Developmental toxicity of triclocarban in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Wiley Periodicals**, Nanjing, v. 33, p. 1-6, jan. 2019.

SILVA, A. R.; NOGUEIRA, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. **Talanta**, Lisboa, n. 74, p. 1498–1504, jan. 2008.

SILVA, C. G. A. da.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química nova**, Campinas, v. 34, n. 4, p. 665-676, fev. 2011.

TEIXEIRA, L. S. G. Use of nitroanilines for spectrophotometric determination of ethinylestradiol in pharmaceutical formulations. **Analytical Methods**, Salvador, v. 3, p. 1198-1201, fev. 2011.

Triclocarban. Pubchem, Open Chemistry Database. Disponível em: Pubchem, Open Chemistry Database. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=triclocarban>. Acesso em: 20 abr. 2020.

TSAI, S.; SHIH, M.; PAN, Y. Determinations and residual characteristics of Triclosan in household food detergents of Taiwan. **Chemosphere**, Taipei, v. 72 p. 1250–1255, jun. 2008.

VAILAYA, A. Fundamentals of Reversed Phase Chromatography: Thermodynamic and Exothermodynamic Treatment. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Nova Jersey, v. 28, p. 965-1054, fev. 2007.

VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F.; AUGUSTO, F. Análise Quantitativa por Cromatografia. **Chemkeys**, Campinas, p. 1-10.

WESTON, A.; BROWN, R. B. **HPLC and CE: Fundamentals and applications**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 24-61.

WU, H. *et al.* The extraction of four endocrine disrupters using hollow N-doped mesoporous carbon spheres with encapsulated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles coupled to HPLC-DAD determination. **Microchemical Journal**, Xian, v. 164, p. 105984, fev. 2021.

YAKABE, C.; HONDA, A. M.; MAGALHÃES, J. F. Determinação do 17β-estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, jul./set. 2005.

YIN, J.; WEI, L.; SHI, Y.; ZHANG, J.; WU, Q.; SHAO, B. Chinese population exposure to triclosan and triclocarban as measured via human urine na nails. **Environ Geochem Health**, Beijing, out. 2015.