



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE
EUTÉTICO PROFUNDO PARA A DETERMINAÇÃO DE PARABENOS
EM COSMÉTICOS POR FLUORESCÊNCIA E CALIBRAÇÃO DE
SEGUNDA ORDEM

DANIELLA IRIS DE OLIVEIRA SILVA



João Pessoa - PB

Julho/2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE
EUTÉTICO PROFUNDO PARA A DETERMINAÇÃO DE PARABENOS
EM COSMÉTICOS POR FLUORESCÊNCIA E CALIBRAÇÃO DE
SEGUNDA ORDEM**

DANIELLA IRIS DE OLIVEIRA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título Doutora em Ciências, área de concentração Química Analítica

Orientador: **Prof. Dr. Márcio José Coelho de Pontes**

* **Bolsista CAPES**

João Pessoa - PB

Julho/2024

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me dar forças pra não desistir perante as dificuldades.
- Aos meus pais pelo incentivo a trilhar o caminho dos estudos e da educação.
- Ao meu esposo Thiago pela nossa família e todo apoio que me deu nos momentos difíceis dessa pesquisa em que precisei chegar em casa apenas para dormir e voltar no dia seguinte pra mais um dia de luta pelos resultados desta tese.
- Ao Professor Márcio, pela orientação e contribuição para minha formação acadêmica.
- A Mayara e Nayara por toda amizade, apoio e contribuição na leitura da tese dessa doutoranda com as vistas cansadas e saturadas de seu texto.
- A Kelly pela parceria e amizade nesses anos todos de doutorado.
- A Ruth por todo empenho e ajuda no plano A, B... e pela amizade que construímos.
- A Willyan Costa e prof^a Liliana pela colaboração intelectual e de recursos para essa pesquisa.
- A Alcides Siqueira e ao prof. Wallace Fragoso pela colaboração ativa nesta pesquisa.
- A Manu por toda ajuda e conhecimento em cromatografia que me foi passado. Não entrou nessa tese, mas vai ficar pra vida.
- A técnica Milena e a prof^a Ana Flávia do Laboratório de Microbiologia Industrial pela utilização da centrífuga usada no procedimento experimental.
- Aos amigos Tamires, Flaviana, Wallis, Andreia... pelo apoio e incentivo.
- Ao LAQA onde desenvolvi parte dessa pesquisa.
- A CAPES, pela bolsa concedida.
- A UFPB, pela formação acadêmica.

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586m Silva, Daniella Iris de Oliveira.

Microextração líquido-líquido com solvente eutético profundo para a determinação de parabenos em cosméticos por fluorescência e calibração de segunda ordem / Daniella Iris de Oliveira Silva. - João Pessoa, 2024. 77 f. : il.

Orientação: Márcio José Coelho de Pontes.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Parabenos DES. 2. Espectroscopia de fluorescência. 3. Cremes preventivos de assaduras. 4. PARAFAC. I. Pontes, Márcio José Coelho de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.5(043)

Microextração líquido-líquido com solvente eutético profundo para a determinação de parabenos em cosméticos por fluorescência e calibração de segunda ordem.

Trabalho de Tese de Doutorado apresentada pela discente Daniella Iris de Oliveira Silva e aprovada pela Comissão Examinadora composta abaixo, realizada no dia 26 de julho de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **MÁRCIO JOSÉ COELHO DE PONTES**
Data: 06/08/2024 14:23:30-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Márcio José Coelho de Pontes
DQ/UFPB
Orientador/Presidente

Documento assinado digitalmente
 **KELVIN COSTA DE ARAÚJO**
Data: 02/08/2024 20:21:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Kelvin Costa de Araújo
Pesquisador Pós-Doc/UFSCar-SP
Examinador

Documento assinado digitalmente
 **SÓFACLES FIGUEREDO CARREIRO SOARES**
Data: 02/08/2024 08:42:18-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Sófacles Figueredo Carreiro Soares
CT/UFPB
Examinador

Documento assinado digitalmente
 **KÁTIA MESSIAS BICHINHO**
Data: 01/08/2024 20:47:46-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Kátia Messias Bichinho
DQ/UFPB
Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **SHERLAN GUIMARÃES LEMOS**
Data: 02/08/2024 10:21:11-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
DQ/UFPB
Examinador

Ao meu filho Pedro Henrique

Eu dedico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Caracterização da problemática	11
1.2	Objetivos.....	14
1.2.1	Objetivo geral	14
1.2.2	Objetivos específicos.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Cosméticos.....	16
2.2	Técnicas de preparo de amostra.....	17
2.3	Solventes eutéticos profundos.....	18
2.4	Espectrometria de fluorescência molecular	20
2.5	Quimiometria	22
2.5.1	Planejamento experimental.....	22
2.5.2	Calibração multivias	25
2.5.2.1	Análise de fatores paralelos.....	28
2.6	Estado da arte da determinação de parabenos em cosméticos	30
3	METODOLOGIA	36
3.1	Reagentes e soluções.....	36
3.2	Síntese e caracterização do solvente eutético profundo.....	37
3.3	Otimização do procedimento de extração	37
3.4	Quantificação em amostras comerciais.....	39
3.5	Aquisição dos espectros e processamento dos dados	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Caracterização.....	43
4.2	Otimização do procedimento de extração	44
4.3	Análise quantitativa do conjunto de validação e de predição	48
4.4	Matrizes espectrais de excitação e emissão de amostras comerciais	52
4.5	Comparação com outros métodos	59
	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Estrutura química dos parabenos: (a) metilparabeno; (b) etilparabeno; (c) propilparabeno e (d) butilparabeno. Fonte: autora.	11
Figura 2 - Representação das interações moleculares na formação de um DES com cloreto de colina como HBA (Adaptado de Santos, 2022).	19
Figura 3 - Diagrama de fases de dois componentes com representação do ponto eutético (Smith; Abbott; Ryder, 2014).	19
Figura 4 - Representações espectrais de matriz de excitação-emissão de PP: superfície 3D (a); gráfico de contorno (b). Fonte: autora.	21
Figura 5 - Planejamento composto central para três fatores. (●) Pontos do fatorial 2^3 , (●) pontos axiais, (○) ponto central (Adaptado de Barros Neto, 2010).	23
Figura 6 - Classificação dos dados de variáveis preditoras e suas respectivas metodologias de calibração (Peña et al., 2015).	26
Figura 7 - Tensor de três vias obtido a partir do empilhamento das matrizes de dados no modo de amostras (Adaptado de Olivieri, 2014).	27
Figura 8 - Representação gráfica da decomposição de X realizada para um modelo PARAFAC com dois componentes em duas tríades de vetores (Adaptado de Bro, 1997).	29
Figura 9 - Esquema de síntese do solvente eutético profundo. Fonte: autora.	37
Figura 10 - Preparo de amostras para os ensaios do planejamento experimental. Fonte: autora.	39
Figura 11 - Interface gráfica do MVC2 com destaque para a escolha do modelo, o tamanho dos dados e as restrições utilizadas. Fonte: autora.	40
Figura 12 - Espectros FTIR: cloreto de colina (—); etileno glicol (—), e ChEg (—). Fonte: autora.	43
Figura 13 - Gráfico de Pareto dos efeitos para a recuperação de parabenos. Fonte: autora.	45
Figura 14 - Gráfico de superfície de resposta para o planejamento composto central da recuperação de parabenos como função de dois fatores: tempo de extração (B) e %EtOH (C). Fonte: autora.	47
Figura 15 - (a) gráfico de contorno para a amostra de validação com concentração de 600 ng g^{-1} ; (b) modo de excitação e (c) modo de emissão recuperados pelo PARAFAC. Fonte: autora.	48
Figura 16 - Gráfico do s_{fit} versus o número de componentes para a amostra de validação com concentração de 600 ng g^{-1} . Fonte: autora.	49

Figura 17- Curva pseudo-unuvariada com amostra de teste destacada em vermelho. Fonte: autora.	49
Figura 18- Gráfico de contorno de amostra comercial isenta de parabenos.....	51
Figura 19- (a) gráfico de contorno para amostra de predição isenta fortificada com 600 ng g ⁻¹ ; (b) modo de emissão e (c) modo de excitação recuperados pelo PARAFAC. Fonte: autora. ..	51
Figura 20- Gráfico de contorno para uma solução de calibração com concentração de 300 ng g ⁻¹ de PP.	53
Figura 21- Gráficos de contorno bidimensionais de EEFM para as amostras comerciais a) S1, b) S2, c) S3, d) S4, e) S5, f) S6. Fonte: autora.	54
Figura 22- Gráfico do s_{fit} versus o número de componentes para amostras de creme preventivo de assaduras a) S1, b) S2, c) S3, d) S4, e) S5, f) S6. Fonte: autora.	56
Figura 23- Modos de excitação e de emissão recuperados pelo PARAFAC para as amostras comerciais a) S1, b) S2, c) S3, d) S4, e) S5, f) S6. Fonte: autora.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista dos DESs obtidos com cloreto de colina e algumas das diversas combinações de HBDs.	18
Tabela 2- Análise de variância para modelo matemático ajustado a um conjunto de dados experimentais.	24
Tabela 3- Concentração dos quatro parabenos nas misturas-padrão de validação	36
Tabela 4- Níveis das variáveis independentes reais e codificadas utilizadas para o CCD.	38
Tabela 5- Experimentos gerados pelo CCD e suas respostas correspondentes.	44
Tabela 6- ANOVA para o CCD avaliando a recuperação de parabenos como resposta.	46
Tabela 7- Resultados experimentais obtidos sob condições otimizadas.	47
Tabela 8- Concentração preditas de parabenos pelo modelo PARAFAC no conjunto de validação. Modelo construído com três fatores e predições realizadas com uma amostra por vez.	50
Tabela 9- Concentrações preditas pelo modelo PARAFAC no conjunto de predição. Modelos PARAFAC construído com três fatores e predições realizadas com uma amostra por vez.	52
Tabela 10- Recuperação dos parabenos em amostras de creme preventivo de assaduras utilizando o método proposto.	58
Tabela 11- Comparação do desempenho de diferentes métodos analíticos destinados a determinar parabenos em amostras de cosméticos.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN- acetonitrila

ANOVA- análise de variância

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATLD- decomposição trilinear alternada

BP- butilparabeno

CCD- planejamento composto central

ChCl- cloreto de colina

CV- coeficiente de variação

DAD- detector de arranjo de diodos

DLLME- microextração líquido-líquido dispersiva

DES- solventes eutéticos profundos

EDCs- endocrine disrupting chemicals

EEFM- matriz de fluorescência de excitação-emissão

EG- etilenoglicol

EP- etilparabeno

GL- graus de liberdade

HBA- receptores de ligação de hidrogênio

HBD- doadores de ligação de hidrogênio

HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD- cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HPLC-UV- cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta

ILs- líquidos iônicos

LLE- extração líquido-líquido

LLME- microextração líquido-líquido

LOD- limite de determinação

MP- metilparabeno

MQ- média quadrática

MSPD- dispersão de matriz em fase sólida

MCR-ALS- resolução de curvas multivariadas

OVAT- uma variável por vez (*one variable at time*)

PARAFAC- análise de fatores paralelos

PP- propilparabeno

REP- erro relativo de predição

RDC- resolução da diretoria colegiada

RMSE- raiz quadrada do erro médio quadrático

RMSEP- raiz quadrada do erro médio quadrático de predição

RSM- metodologia de superfície de resposta

RSD- desvio padrão relativo

SCCS- Comitê Científico Europeu de Segurança do Consumidor

SQ- soma quadrática

SUPRAS-ME- microextração à base de solvente supramolecular

THF- tetrahidrofurano

UE- União Europeia

UV-vis- radiação ultravioleta-visível

VA-LLME- micro extração líquido-líquido assistida por vórtex

RESUMO

A utilização de cosméticos para cuidados pessoais vem aumentando entre a população, levando a um crescimento concomitante da exposição a substâncias potencialmente desreguladoras do sistema endócrino. Devido à imaturidade do sistema metabólico e da barreira cutânea, as crianças têm sido alvo de preocupação por parte dos pesquisadores com respeito ao uso desses cosméticos. Neste trabalho, os parabenos, que são ésteres amplamente utilizados como conservantes, foram quantificados em amostras comerciais de creme preventivo de assaduras. Para tal finalidade, foi realizado um método de microextração líquido-líquido (LLME) eficiente e ambientalmente amigável utilizando um solvente eutético profundo (DES). Para melhorar a eficiência de extração, a quantidade de solvente, o tempo e o teor de etanol foram otimizados usando um planejamento composto central (CCD) em amostras de matriz em branco fortificadas. A quantificação foi baseada na espectroscopia de fluorescência de excitação-emissão, combinada com a decomposição por análise de fatores paralelos (PARAFAC), que provou ser uma ferramenta vantajosa para resolver a sobreposição de constituintes não calibrados na matriz complexa. A estratégia de modelagem PARAFAC proporcionou resultados satisfatórios na faixa linear de 100–1.300 ng g⁻¹, com limite de detecção (LOD) igual a 23 ng g⁻¹. Um conjunto de validação, com várias proporções de padrões de metil, etil, propil e butilparabeno, foi usado para validar o modelo de calibração, resultando em valores de raiz quadrada do erro médio quadrático (RMSE) e erro relativo de predição (REP) de 32 ng g⁻¹ e 4,5%, respectivamente. Ainda, foram obtidos valores aceitáveis de raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP) e REP (105 ng g⁻¹ e 15%, respectivamente) quando um conjunto de amostras de matriz em branco fortificadas foi aplicado. O método proposto foi empregado com sucesso para quantificar o teor de parabenos totais em amostras comerciais de creme para assaduras, produzindo recuperações que variaram de 83% a 125%. O método demonstrou ser rápido, sensível, preciso e ambientalmente amigável, pois reduziu significativamente o consumo de solventes orgânicos. Além disso, pode servir como alternativa para a determinação de conservantes em amostras complexas de cosméticos.

Palavras-chave: parabenos, DES, espectroscopia de fluorescência, cremes preventivos de assaduras, PARAFAC

ABSTRACT

The use of personal care cosmetics has been increasing among the population, leading to a concomitant increase in exposure to substances that could potentially disrupt the endocrine system. Due to the immaturity of the metabolic system and the skin barrier, children have been the target of concern on the part of researchers with regard to the use of these cosmetics. In this work, parabens, which are esters widely used as preservatives in cosmetics, were quantified in commercial samples of diaper rash cream. For this purpose, a green and efficient liquid–liquid microextraction (LLME) method was accomplished using a deep eutectic solvent (DES).

To improve extraction efficiency, the amount of solvent, time and ethanol content were optimized using a central composite design (CCD) on blank matrix samples spiked. The quantification was based on excitation-emission fluorescence spectroscopy, combined with parallel factor analysis (PARAFAC) decomposition, which proved to be an advantageous tool to solve the overlap of uncalibrated constituents in the complex matrix. The PARAFAC modeling strategy provided satisfactory results within a linear range response of 100–1,300 ng g⁻¹, with limit of detection (LOD) equal to 23 ng g⁻¹. A validation set, with various proportions of methyl, ethyl, propyl, and butyl paraben standards, was used to validate the calibration model, resulting in root mean square error (RMSE) and relative error of prediction (REP) values of 32 ng g⁻¹ and 4.5%, respectively. Moreover, acceptable root mean square error of prediction (RMSEP) and REP values (105 ng g⁻¹ and 15%, respectively) were obtained, when a set of blank matrix samples spiked was applied. The proposed method was successfully applied to quantify total paraben content in commercial samples of diaper rash cream, yielding recoveries ranging from 83% to 125%. The method proved to be fast, sensitive, accurate, and eco-friendly, as it significantly reduced the consumption of organic solvents. Furthermore, it could serve as an alternative for the determination of preservatives in complex cosmetic samples.

Keywords: parabens, DES, fluorescence spectroscopy, diaper rash cream, PARAFAC

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da problemática

Atualmente, a utilização de cosméticos para cuidados pessoais vem aumentando entre a população, levando a um aumento concomitante da exposição a substâncias consideradas potencialmente desreguladoras do sistema endócrino (Matwiejczuk; Galicka; Brzóska, 2020). Os desreguladores do sistema endócrino (EDCs- *Endocrine Disrupting Chemicals*) são substâncias que causam efeitos adversos na saúde de um organismo intacto, ou da sua descendência, através de alterações nas funções endócrinas (Nowak *et al.*, 2018).

Um grupo de substâncias relacionadas, amplamente utilizado em cosméticos como conservantes, é a classe dos parabenos, devido ao seu amplo espectro antimicrobiano, estabilidade química e térmica, baixo custo e inalteração na consistência dos produtos (Błedzka; Gromadzińska; Wasowicz, 2014; FDA, 2023). Os conservantes mencionados são ésteres sintéticos de ácido *p*-hidroxibenzoico produzidos a partir de sua esterificação com um álcool apropriado em presença de catalisador. Os compostos mais utilizados para esta finalidade, cujas estruturas químicas são apresentadas na **Figura 1**, são o metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno (BP) (Błedzka; Gromadzińska; Wasowicz, 2014; FDA, 2023).

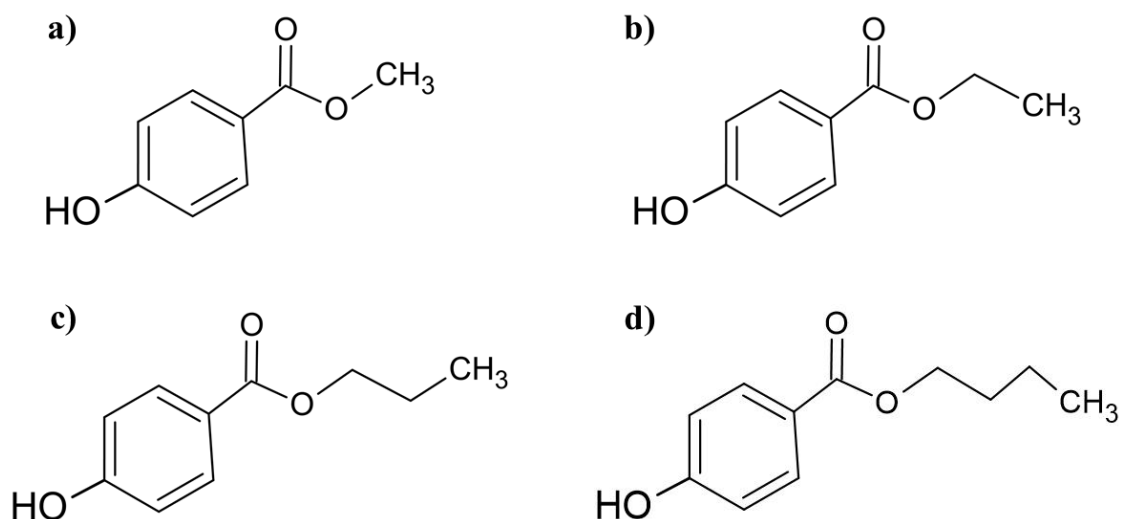


Figura 1-Estrutura química dos parabenos: (a) metilparabeno; (b) etilparabeno; (c) propilparabeno e (d) butilparabeno. Fonte: autora.

Os parabenos mimetizam o estrogênio no organismo e o efeito mimético aumenta proporcionalmente ao tamanho da cadeia alquílica, bem como à presença de ramificações e

anéis aromáticos na sua estrutura química (Aker *et al.*, 2016; Matwiejczuk; Galicka; Brzóska, 2020). Embora sejam tradicionalmente considerados compostos de baixa toxicidade, as preocupações sobre os potenciais impactos dos parabenos na saúde humana têm aumentado (Ocaña-González *et al.*, 2015). Muitos estudos têm associado os parabenos a efeitos adversos como câncer de mama, indução de estresse oxidativo em espermatozoides humanos e desregulação das funções da tireoide (Aker *et al.*, 2016; Barr *et al.*, 2012; Charles; Darbre, 2013; Darbre; Harvey, 2014; Hu *et al.*, 2023; Matwiejczuk; Galicka; Brzóska, 2020; Samarasinghe *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018).

Os danos para a saúde associados aos parabenos são particularmente preocupantes no caso de bebês até os 12 meses de idade, devido à sua barreira cutânea incompleta, ao sistema metabólico imaturo e à falta de enzimas para decompor e eliminar as toxinas, o que os torna mais vulneráveis a determinados produtos químicos que podem afetar o sistema endócrino (Amer *et al.*, 2017; Celeiro *et al.*, 2015).

Os cremes preventivos de assaduras são aplicados diariamente na área da fralda para ajudar a manter a função de barreira da pele do bebê (Amer *et al.*, 2017). Porém, a utilização de um cosmético destinado a permanecer em contato prolongado com a pele do bebê suscita preocupações quanto à presença e aos níveis de concentração de parabenos devido à sua rápida absorção transdérmica (Giulivo *et al.*, 2016). Ainda, vale salientar que a utilização direta de cosméticos não é a única via de exposição à essas substâncias pelos organismos desses indivíduos. A presença de parabenos já vem sendo reportada no leite humano, que por sua vez, tem origem na absorção dérmica de produtos de higiene pessoal por parte da mãe, gerando um efeito cumulativo no organismo dos lactentes (Azzouz *et al.*, 2016; Dualde *et al.*, 2020; Fisher *et al.*, 2017).

O Comité Científico Europeu de Segurança do Consumidor (SCCS) regula o teor máximo de parabenos nos cosméticos, fixando-o em 0,4% $m\ m^{-1}$ para cada éster e 0,8% $m\ m^{-1}$ para misturas de parabenos (SCCS, 2009). Ainda, a soma do teor de PP e BP e de seus sais não pode exceder 0,14% $m\ m^{-1}$ (UE, 2014). Além disso, considerando a emprego de parabenos em produtos cosméticos sem enxágue destinados à aplicação na área da fralda de crianças com menos de três anos, a utilização de butilparabeno e propilparabeno como conservantes foi proibida (UE, 2014).

No Brasil, o teor de parabenos em cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). De acordo Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº29, de 2012, apenas o teor individual (0,4% $m\ m^{-1}$) e para misturas de parabenos (0,8% $m\ m^{-1}$) era regulamentado (BRASIL, 2012). Somente em

2021, a legislação foi atualizada a partir da RDC Nº 528, entrando em concordância com o SCCS e proibindo o uso de butilparabeno e propilparabeno em cosméticos sem enxágue para área da fralda de crianças menores de três anos (BRASIL, 2021). Ainda, a resolução estabelece um prazo de trinta e seis meses a partir da vigência da norma para que os fabricantes se adequem aos requisitos (BRASIL, 2021).

O método oficial para a quantificação de parabenos foi estabelecido pela União Europeia (UE), em que a extração líquido-líquido (LLE) é utilizada para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV (Cabaleiro *et al.*, 2014; OJEC, 1996). No entanto, o método é laborioso e demorado, envolvendo etapas como acidificação, aquecimento e resfriamento (Cabaleiro *et al.*, 2014; Khesina *et al.*, 2021; OJEC, 1996). Ainda, há a possibilidade de coeluição dos aditivos cosméticos e de outros conservantes (Cabaleiro *et al.*, 2014; Khesina *et al.*, 2021). Por conseguinte, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para contornar estes inconvenientes e que, para tal, não recorram a métodos de extração laboriosos e/ou que demandem o emprego de solventes tóxicos.

Recentemente, uma classe de solventes verdes denominada solventes eutéticos profundos (DESs) tem se destacado nos procedimentos de extração como alternativa aos solventes orgânicos (Abbott *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022). Seu potencial tem sido demonstrando, inclusive, na extração de parabenos de várias matrizes cosméticas (Nezami *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2022; Dalmaz; Sivrikaya Özak, 2022; Ge *et al.*, 2020; Sivrikaya, 2019). No entanto, até o momento não foi reportada a extração de parabenos com DES preparado a partir de cloreto de colina e etilenoglicol (ChCl:EG) de matrizes semissólidas.

Apesar das vantagens do uso de DESs na extração de parabenos em cosméticos, a complexidade das matrizes pode resultar na extração simultânea de substâncias interferentes, levando à sobreposição de sinais analíticos. Tal sobreposição pode impedir a quantificação adequada usando métodos espectrofotométricos univariados. Para superar essa limitação, as técnicas de calibração multivias surgem como uma alternativa promissora para a quantificação (Dantas *et al.*, 2021; Long *et al.*, 2021; Vosough *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2018).

Nas estratégias de calibração de segunda ordem, a quantificação em matrizes complexas torna-se possível mesmo na presença de interferentes não calibrados (vantagem de segunda ordem), permitindo a recuperação dos perfis espectrais puros dos analitos (Olivieri; Escandar, 2014; Wu; Wang; Yu, 2020).

Dado o exposto, a proposta deste trabalho é desenvolver e validar um método baseado em calibração multivias para a determinação do teor total de parabenos em amostras de creme

preventivo de assaduras infantil, utilizando a espectrometria de fluorescência. Para isto, a extração será efetuada através de um método verde e otimizado, utilizando um DES como solvente extrator no procedimento de microextração líquido-líquido (LLME).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método baseado em calibração multivariadas para a determinação do teor total de parabenos em amostras de creme preventivo de assaduras infantil, utilizando a espectrometria de fluorescência molecular.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Construir o modelo de calibração para propilparabeno empregando soluções padrão e posterior modelagem dos dados com o PARAFAC;
- ✓ Validar o modelo empregando misturas quaternárias preparadas a partir de padrões de parabenos em diferentes proporções;
- ✓ Sintetizar o solvente eutético profundo a partir de cloreto de colina e etilenoglicol e caracterizá-lo;
- ✓ Otimizar o procedimento de micro extração líquido-líquido utilizando um planejamento composto central;
- ✓ Empregar o procedimento de extração otimizado na extração de parabenos em amostra isenta fortificada;
- ✓ Aplicar o modelo validado na predição do teor de parabenos totais em amostra isenta fortificada em três níveis de concentração;
- ✓ Determinar o teor de parabenos totais em amostras comerciais de creme preventivo de assaduras infantil com a presença de constituintes não calibrados, para explorar a vantagem de segunda ordem.

Capítulo 2

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Cosméticos

Produtos cosméticos são preparações compostas por substâncias de origem natural ou sintética utilizadas nas diversas partes do corpo como sistema capilar, lábios, dentes, membranas mucosas da cavidade oral, unhas e órgãos genitais externos, com a finalidade exclusiva ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais, protegê-los e/ou mantê-los em bom estado (Brasil, 2015).

De acordo com a RDC nº752, de 19 de setembro de 2022, a Anvisa classifica os produtos cosméticos em grau 1 e grau 2, sendo esta classificação relacionada ao grau de risco oferecido (Brasil, 2022). Os produtos de grau 1 caracterizam-se por apresentarem propriedades básicas ou elementares, as quais não necessitam, inicialmente, de comprovação e não demandem informações detalhadas quanto ao seu modo e restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto. Esta classe abrange produtos como sabonete corporal, desodorante, esmalte, xampu, batom e produtos pós-barba, por exemplo. Já os produtos de grau 2 têm indicações específicas, sendo obrigatória a comprovação de segurança e/ou eficácia destas características, assim como informações e cuidados, modo e restrições de uso. A exemplo de produtos de grau 2, podem ser citados antitranspirante, batom infantil, maquiagem com fotoprotetor, repelentes, xampu anticaspa, sabonete antisséptico e pomadas ou cremes preventivos de assaduras infantis (Brasil, 2022).

A maioria dos cosméticos proporciona condições ideais para a proliferação de microorganismos, como o pH, a alta proporção de água e ingredientes que podem ser degradados acarretando risco para os consumidores (Salvador; Chisvert, 2017). Adicionados aos cosméticos de forma ampla, os conservantes são utilizados para impedir a deterioração ocasionada pelo crescimento microbiano durante a fabricação, estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso (Brasil, 2021; Salvador; Chisvert, 2017). Dentre os conservantes, os parabenos são amplamente utilizados, sendo metil-4-hidroxibenzoato, etil-4-hidroxibenzoato, propil-4-hidroxibenzoato e butil-4-hidroxibenzoato os mais comuns (FDA, 2023).

Aspectos como uso diário extensivo e repetido, em alguns casos (sabonetes, creme dental etc.), durante um grande período de tempo, associados ao destaque que os produtos cosméticos vêm ganhando no mercado, geram uma atenção especial com relação à qualidade desses produtos, visto que podem causar problemas de pele localizados e/ou sistêmicos (Mesko *et al.*, 2020; Rito *et al.*, 2012). Apesar de a compatibilidade com a pele ser testada antes da

comercialização do cosmético, alguns dos ingredientes da formulação, a exemplo dos parabenos, podem ser responsáveis por irritações ou alergias na pele, logo, é de extrema importância o monitoramento da qualidade desses produtos para assegurar que as concentrações dos diversos constituintes estejam dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente aplicável (Rito *et al.*, 2012).

2.2 Técnicas de preparo de amostra

Embora o desenvolvimento de instrumentos analíticos eficientes esteja em constante evolução, a maioria desses equipamentos não suporta o uso direto da matriz (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015). Desta forma, o preparo de amostra tem por objetivo tornar o soluto a ser determinado compatível com a realização da análise química, de acordo com a técnica a ser empregada (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015; Zhong; Li, 2017). Trata-se de uma etapa de extrema importância para adquirir parcela da amostra enriquecida e livre de interferentes, que afetará diretamente na sensibilidade e seletividade do método (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015).

A técnica de preparo de amostras deve estar em conformidade com o instrumento analítico a ser utilizado e, preferencialmente, ser rápida, de fácil realização e baixo custo (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015). Para a promoção do procedimento de limpeza (*clean up*) em amostras complexas e adequação do nível de concentração dos analitos para sua determinação, a seleção do tipo de preparo deve se embasar em propriedades físico-químicas dos componentes da amostra como solubilidade, polaridade, estabilidade térmica e química (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015).

A etapa de extração, que consiste em transferir o analito da matriz para um solvente adequado, é uma das mais importantes dentro do preparo de amostras. Diversas técnicas de extração podem ser usadas para redução ou eliminação dos interferentes a fim de que não afetem a exatidão do método, como por exemplo a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015; Ocaña-González *et al.*, 2015). O desenvolvimento de técnicas baseadas em microextração tem se destacado, visto que demandam baixo consumo de reagentes e, consequentemente, promovem a redução do volume de solventes orgânicos tóxicos, pois a fase de extração é empregada na ordem de microlitros (Ocaña-González *et al.*, 2015).

Em se tratando de matrizes de composição complexa, como é o caso dos cosméticos, a remoção de interferentes em potencial antes da determinação de parabenos é tradicionalmente realizada por LLE empregando diferentes solventes orgânicos isolados ou combinados (Ocaña-

González *et al.*, 2015). Nessa técnica, a partição do analito se dá entre dois líquidos ou entre fases imiscíveis (Figueiredo; Borges; Queiroz, 2015).

Em busca de um método de extração com baixo consumo de reagentes e ambientalmente amigável, neste trabalho de tese optou-se por empregar a micro extração líquido-líquido, utilizando DES como solvente extrator, em substituição a solventes orgânicos tóxicos. A adição de proporções de etanol como adjuvante foi avaliada com intuito de promover a redução da viscosidade do DES para favorecer o processo de transferência de massa.

2.3 Solventes eutéticos profundos

Em se tratando de preparo de amostras e extração de analitos, vem crescendo o interesse por métodos mais ambientalmente amigáveis que evitem ou empreguem quantidades reduzidas de solventes orgânicos tóxicos. Neste contexto, uma classe de solventes verdes denominados solventes eutéticos profundos (DESs) surgiu recentemente como uma alternativa a solventes orgânicos em procedimentos de extração (Abbott *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

O termo DES foi introduzido na literatura por Abbott *et al.* e trata-se de líquidos que podem ser preparados facilmente pela mistura de doadores de ligação de hidrogênio (HBDs) e de receptores de ligação de hidrogênio (HBAs) biodegradáveis. Geralmente, um sal quaternário de amônio e um outro constituinte orgânico que possui átomos eletronegativos ligados ao hidrogênio (flúor, carbono ou oxigênio) estão envolvidos na síntese como HBAs e HBDs, respectivamente (Abbott *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2022).

O cloreto de colina é o HBA mais utilizado, porém existem inúmeras combinações com moléculas de HBDs, como pode ser exemplificado na **Tabela 1** (Radošević *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022).

Tabela 1- Lista dos DESs obtidos com cloreto de colina e algumas das diversas combinações de HBDs.

DES	Abreviação	Razão molar
Cloreto de colina:ácido oxálico	ChOx	1:1
Cloreto de colina:sorbitol	ChSol	2:3
Cloreto de colina:xilitol	ChXylol	5:2
Cloreto de colina:uréia	ChU	1:2
Cloreto de colina:etilenoglicol	ChEg	1:2

Fonte: Radošević *et al.* (2018); Santos *et al.* (2022)

As interações entre HBA-HBD levam à formação de ligações de hidrogênio (**Figura 2**) resultando em misturas eutéticas com um ponto de fusão significativamente mais baixo do que os constituintes puros (Santos *et al.*, 2022).

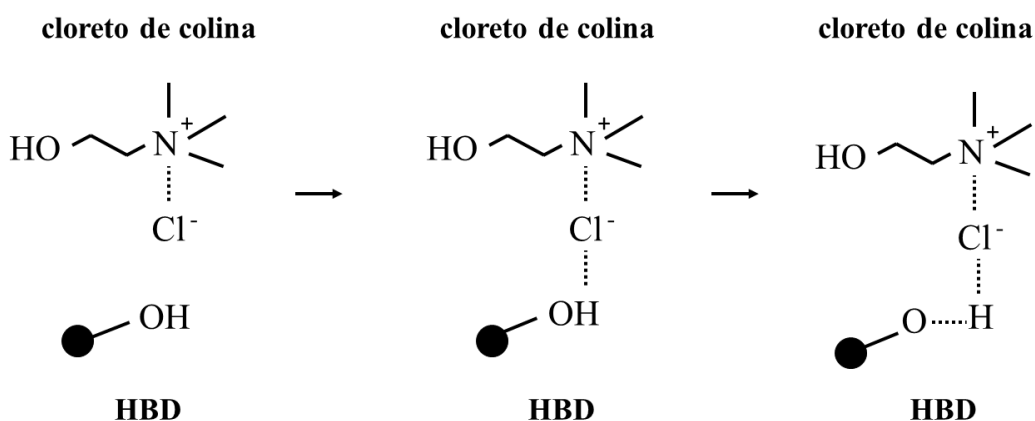


Figura 2- Representação das interações moleculares na formação de um DES com cloreto de colina como HBA (Adaptado de Santos, 2022).

A representação de uma mistura eutética pode ser observada na **Figura 3**. Onde PF(A) e PF(B) representam os pontos de fusão dos componentes puros e ΔT_f corresponde à diferença de temperatura entre o sistema eutético e a temperatura que o sistema apresentaria se não houvesse sua formação.

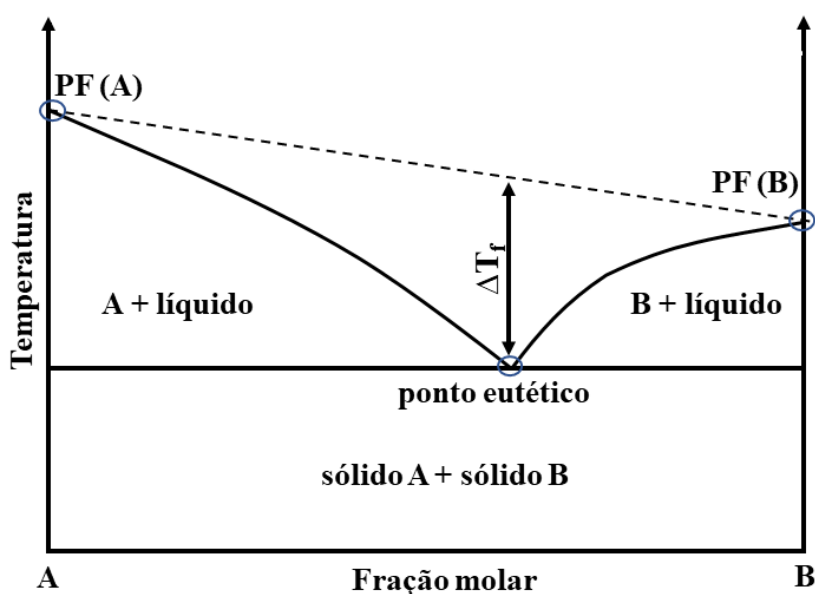


Figura 3- Diagrama de fases de dois componentes com representação do ponto eutético (Smith; Abbott; Ryder, 2014).

Além de todas as vantagens do uso de DESs, aqueles derivados do cloreto de colina como HBA não requerem pré-tratamento adicional e são solúveis em água e em certos solventes orgânicos (Abbott *et al.*, 2003; Shishov *et al.*, 2017; Sivrikaya, 2019). Tal solubilidade é vantajosa em virtude das altas viscosidades que a formação de ligações de hidrogênio confere aos DESs. O que limitaria sua aplicação na extração de analitos, pode ser contornado pela adição de água ou de etanol, por exemplo, aumentando a transferência de massa no procedimento de extração (Costa *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022; Sivrikaya, 2019).

Os solventes eutéticos profundos vêm sendo empregados na extração de parabenos de diversas matrizes como enxaguantes bucais, xampus, cremes para mãos e rosto, cremes antiacne, gel de aloe vera, óleos e creme dental, demonstrando seu potencial em procedimentos de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e, principalmente, em LLME (Nezami *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2022; Dalmaz; Özak, 2022; Ge *et al.*, 2020; Sivrikaya, 2019). Neste trabalho de tese optou-se por empregar LLME como técnica de extração utilizando DES à base de cloreto de colina e etilenoglicol.

2.4 Espectrometria de fluorescência molecular

A espectrometria de fluorescência molecular é um método óptico de análise inserido nos métodos de luminescência molecular, em que moléculas do analito são excitadas e o espectro de emissão da espécie resultante gera informação para análise qualitativa ou quantitativa. Dentre os métodos de luminescência molecular, a fluorescência e a fosforescência são conhecidas pelo termo genérico fotoluminescência, dada sua similaridade na excitação, que ocorre por absorção de fótons. No entanto, a fluorescência se origina de transições de mesma multiplicidade de spin (singleto/singleto), tendo maior probabilidade de ocorrer.

A aromaticidade é uma importante característica para que o composto apresente fluorescência (Lakowicz, 2006; Skoog; Holler; Nieman, 2002). Desta forma, a estrutura aromática presente nos parabenos evidencia a aplicabilidade da técnica de fluorescência molecular para a investigação dos analitos. Na literatura, somente a HPLC com detector de fluorescência foi utilizada para a quantificação de parabenos em cosméticos com comprimentos de onda de excitação e de emissão de 254 e 310 nm, respectivamente (Yilmaz; Tokat, 2020; Zgoła-Grzeskowiak *et al.*, 2016).

Geralmente, dados espectrais de fluorescência são apresentados como espectros de emissão em que a excitação ocorre em um comprimento de onda fixo à medida que a emissão é registrada em função do comprimento de onda. Já nos espectros de excitação, o comprimento

de onda de excitação (λ_{ex}) varia numa faixa definida enquanto o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) é fixo (Skoog; Holler; Nieman, 2002).

É possível obter um espectro tridimensional variando o comprimento de onda de excitação de modo que para cada λ_{ex} um espectro de emissão é registrado. O conjunto de espectros resultantes é conhecido como Matriz de Excitação-Emissão ou espectro de fluorescência total (Olivieri; Escandar, 2014). A **Figura 4** mostra representações de um espectro 3D de excitação-emissão

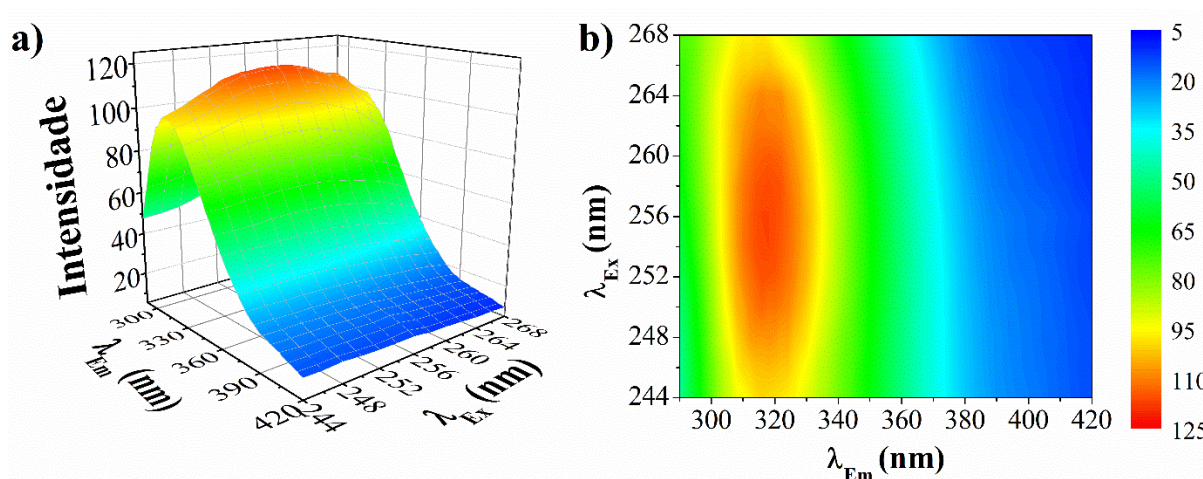


Figura 4- Representações espectrais de matriz de excitação-emissão de PP: superfície 3D (a); gráfico de contorno (b). Fonte: autora.

A espectrofluorimetria possibilita, em um único instrumento, um modo conveniente de obter dados de matrizes de fluorescência de excitação-emissão (EEFM) que, por sua vez, apresentam caráter trilinear. No entanto, outros sinais que não são provenientes do fenômeno de fluorescência podem ser detectados. Fenômenos como os espalhamento Rayleigh, Raman e o segundo harmônico do Rayleigh podem produzir bandas e os dados de EEFM serão acompanhados desses sinais de dispersão. Porém, esses sinais são indesejados, visto que não são trilineares e tornam a análise dos dados menos simples. Uma forma de lidar com esses dados não trilineares é restringir a faixa de excitação para evitar a contribuição dos sinais de dispersão no sinal geral (Olivieri; Escandar, 2014).

Apesar da maior sensibilidade e seletividade da espectrometria de fluorescência molecular comparada ao fenômeno de absorção UV-Vis, amostras complexas podem apresentar diversos constituintes fluorescentes. Esses constituintes podem apresentar sinais significativamente sobrepostos, levando ao emprego de processamento quimiométrico avançado para recuperar sinais de analitos individuais (Olivieri; Escandar, 2014).

2.5 Quimiometria

A Quimiometria é a área que adota métodos estatísticos e matemáticos para, a partir de dados químicos, obter o máximo de informações relevantes possível (Varmuza; Filzmoser, 2008). Trata-se de métodos eficazes bastante utilizados em Química Analítica, cujas aplicações vem crescendo com a maior capacidade de exploração e, conseqüente crescimento na quantidade e variedade de dados experimentais proporcionada pelo desenvolvimento tecnológico (Ferreira, 2015; Peris-Díaz; Krężel, 2021).

A interdisciplinaridade característica da Quimiometria, favorece um papel importante na interpretação correta de dados multivariados. Sua atuação vai desde o planejamento dos experimentos, para melhorar a qualidade das informações provenientes, até o tratamento dos grandes conjuntos de dados obtidos de modo a analisá-los e estruturá-los (Ferreira, 2015; Peris-Díaz; Krężel, 2021; Varmuza; Filzmoser, 2008).

Dentro da área de Quimiometria, destacam-se as técnicas de planejamento e otimização de experimentos, métodos de reconhecimento de padrões e aqueles baseados em calibração multivariada (Gemperline, 2006). Neste trabalho de tese, foram empregados os métodos de planejamento e otimização de experimentos e calibração multivariada, cuja abordagem teórica é apresentada nas próximas seções.

2.5.1 Planejamento experimental

O planejamento e otimização de experimentos tem importante função dentro da quimiometria. Seu objetivo é planejar e realizar os experimentos de forma eficiente, investigando o domínio experimental de forma sistemática, com a menor quantidade de experimentos possível (Brown; Tauler; Walczak, 2009). Em Química Analítica, o termo é bastante empregado no sentido de obter a melhor resposta possível a partir da descoberta das condições a serem empregadas em um procedimento (Bezerra *et al.*, 2008).

Em contrapartida, a abordagem clássica de avaliar uma variável por vez (OVAT), a metodologia de superfície de resposta (RSM) consiste numa técnica estatística multivariada capaz de otimizar simultaneamente os níveis das variáveis visando o melhor desempenho do sistema (Bezerra *et al.*, 2008). A RSM tem a vantagem de incluir a interação entre as variáveis estudadas, retratando de modo mais completo os efeitos dos parâmetros na resposta. Como consequência dessa característica, é necessário um número reduzido de experimentos e, conseqüentemente, menor demanda de reagentes, materiais e menor consumo de tempo (Bezerra *et al.*, 2008).

A RSM é baseada no ajuste dos dados experimentais a uma equação polinomial que descreve o comportamento dos dados relacionados ao planejamento experimental, a fim de fazer previsões estatísticas com base nesse modelo (Bezerra *et al.*, 2008). Sua aplicação é de extrema importância quando uma ou mais respostas sofrem influência de diversas variáveis (Bezerra *et al.*, 2008).

Mesmo antes de empregar a RSM, é necessário escolher o planejamento experimental que definirá quais experimentos serão realizados (Bezerra *et al.*, 2008). Para a escolha do planejamento mais adequado, é necessário definir o objetivo a ser atingido com os experimentos. Dele depende todas as operações experimentais especificadas detalhadamente a serem realizadas, o que implica em planejamentos distintos para objetivos diferentes (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010). Ainda, quando o conjunto de dados não apresenta curvatura, planejamentos para modelos de primeira ordem podem ser utilizados. Porém, quando se deseja explorar a curvatura da função resposta, planejamentos experimentais para superfícies de resposta quadráticas devem ser utilizados (Bezerra *et al.*, 2008).

O planejamento composto central (CCD) é amplamente utilizado em modelos de segunda ordem para descrever sistemas empíricos (Caglar *et al.*, 2018). Em geral, esse planejamento consiste em três partes: um planejamento fatorial completo ou fracionado (cúbico); axial (ou estrela) em que os pontos estão a uma distância α do centro; e n pontos centrais (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010; Bezerra *et al.*, 2008). A **Figura 5** mostra a representação do planejamento composto central para a otimização de três fatores.

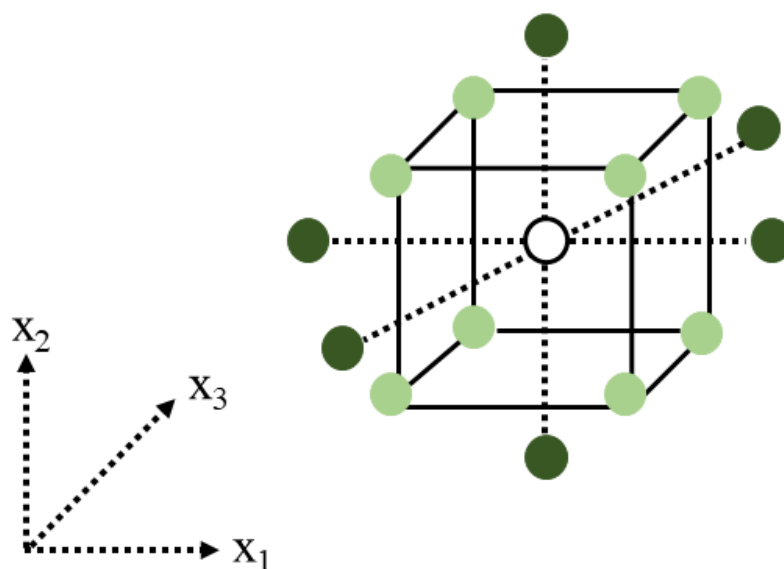


Figura 5- Planejamento composto central para três fatores. (●) Pontos do fatorial 2^3 , (●) pontos axiais, (○) ponto central (Adaptado de Barros Neto, 2010).

O número total de experimentos necessários para um CCD é descrito pela **Equação 1**

$$N = 2^k + 2k + c_p \quad (1)$$

Onde k corresponde ao número de fatores e c_p é o número de réplicas no ponto central (Carabajal *et al.*, 2020).

Após ajustar a função aos dados experimentais, é necessário analisar se o modelo matemático encontrado descreve satisfatoriamente o domínio experimental. A qualidade do ajuste do modelo pode ser avaliada pela análise de variância (ANOVA), **Tabela 2**.

Tabela 2- Análise de variância para modelo matemático ajustado a um conjunto de dados experimentais.

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	
% de variação explicada (R^2)	$\frac{SQ_R}{SQ_T}$		
% máxima de variação explicável	$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$		

n_i = números de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo (Adaptado de Barros Neto, 2010).

Na análise de variância, SQ_R corresponde à parcela da variação total das observações em torno da média descrita pela equação de regressão, enquanto SQ_r corresponde a parcela descrita pelos resíduos. Quanto maior o valor de R^2 (coeficiente de determinação), ou seja,

quanto maior a fração descrita pela regressão, mais bem ajustado será o modelo às respostas observadas (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

É possível, ainda, avaliar a significância estatística da equação de regressão a partir das médias quadráticas MQ's, que são obtidas dividindo as somas quadráticas (SQ's) pelos respectivos graus de liberdade (GL). Se não houver relação entre X e y e o coeficiente angular β_1 for igual a zero a razão dada pela **Equação 2** segue uma distribuição *F* (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

$$\frac{MQ_R}{MQ_r} \approx F_{p-1, n-p} \quad (2)$$

Logo, se $MQ_R/MQ_r > F$ crítico é possível demonstrar a existência de relação linear entre X e y e quanto maior que o *F* crítico for o valor da razão, maior a significância da equação (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

A MQ_r pode ser dividida em duas partes: a médias quadráticas devido à falta de ajuste (MQ_{faj}) e ao erro puro (MQ_{ep}). Estas médias correspondem respectivamente, à falta de ajuste do modelo às respostas observadas e à medida do erro aleatório (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010). Utilizando o valor MQ_{faj}/MQ_{ep} e comparando com o valor de *F* crítico para os respectivos graus de liberdade, pode-se verificar que não há falta de ajuste no modelo se MQ_{faj}/MQ_{ep} for menor que *F* crítico (Pimentel; Neto, 1996).

Após o modelo matemático que descreve o comportamento da resposta ser encontrado e ter seu ajuste avaliado, com a superfície de resposta gerada, pode se verificar a possibilidade e necessidade de realizar um deslocamento na direção apontada como ideal. No entanto, há casos em que a região experimental não pode ser deslocada por razões físicas ou instrumentais, ficando a cargo do analista encontrar a melhor condição operacional dentro da condição experimental estudada (Bezerra *et al.*, 2008).

2.5.2 Calibração multivias

Apesar de sua simplicidade, o método univariado possui limitações por assumir que apenas o constituinte de interesse exerce influência na resposta medida. Em sistemas com mais de um componente químico, dificilmente uma resposta instrumental (variável) será satisfatória para prever a concentração de um destes componentes (Ferreira, 2015).

Ao introduzir um número maior de variáveis, podem ser realizadas determinações simultâneas ainda que em sistemas complexos, com diferenças espectrais, presença de alta

correlação e de interferentes (Ferreira, 2015). De modo geral, são chamadas de multivariadas as estratégias de calibração nas quais se aplicam medidas múltiplas para cada amostra (Olivieri; Escandar, 2014). As variáveis podem ser geradas a partir de uma faixa espectral (calibração multivariada de primeira ordem) ou de múltiplos sensores (calibração multivias).

Em calibração multivias, para cada amostra analisada um tensor de dados é obtido, que pode corresponder a uma matriz, no caso de calibração de segunda ordem, ou um cubo de dados para calibração de terceira ordem, por exemplo (Olivieri, 2014; Brown; Tauler; Walczak, 2009). A **Figura 6** representa estrutura e organização dos dados para cada amostra, de acordo com sua ordem de calibração associada. A metodologia de calibração multivias abrange as calibrações de segunda ordem em diante.

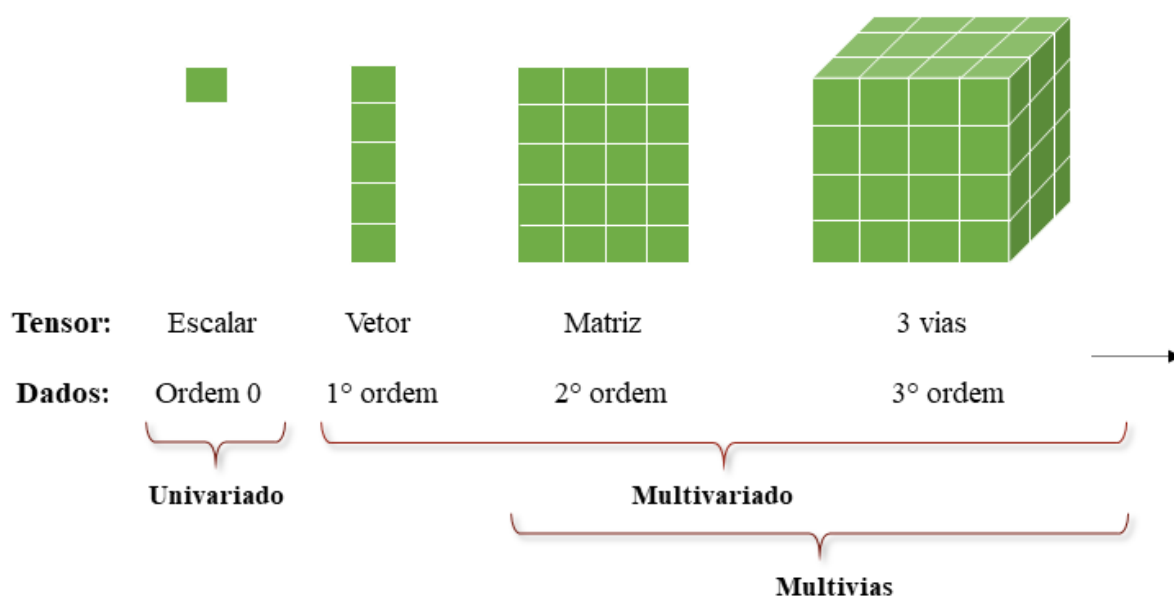


Figura 6- Classificação dos dados de variáveis predictoras e suas respectivas metodologias de calibração (Peña *et al.*, 2015).

Utilizando a notação em termos de vias, em que os dados são organizados para um conjunto de amostras, dois eixos correspondem às respostas instrumentais e um eixo é relacionado à cada amostra formando um cubo para a calibração de segunda ordem, que corresponde à calibração em três vias (Olivieri; Escandar, 2014; Brown; Tauler; Walczak, 2009).

Dados de segunda ordem são obtidos a partir de técnicas hífenadas ou de instrumento como espectrofluorímetro, que registra matrizes de excitação e emissão (Brown; Tauler; Walczak, 2009). O conjunto de calibração é obtido com padrões do analito puro. O tratamento dos dados mais complexos gerados, possibilita a predição em amostras, mesmo na presença de

substâncias não consideradas na etapa de calibração (vantagem de segunda ordem) (Olivieri; Escandar, 2014). Isso ocorre devido ao fato de a contribuição de interferentes poder ser excluída matematicamente (desconsiderados com base no conjunto de calibração), desde que apresente diferença do sinal do analito em algum dos modos de aquisição dos dados (Peña *et al.*, 2015).

A vantagem de segunda ordem, oferece ainda a possibilidade de se trabalhar com um número reduzido de amostras de calibração quando comparado à calibração de primeira ordem, pois não há a necessidade de que o conjunto de calibração seja representativo para amostras futuras (Olivieri; Escandar, 2014).

A escolha do algoritmo de calibração é primordial e deve ser direcionada levando em conta as propriedades específicas dos dados, podendo a partir disto, propor um modelo provável para compreendê-los. Do mesmo modo que a linearidade é importante na calibração univariada, a definição de bilinearidade e trilinearidade é essencial em calibração multivias (Olivieri; Escandar, 2014).

Bilinearidade e trilinearidade relacionam-se a instrumentação da qual os dados são provenientes e de suas singularidades. Como exemplos, dados de HPLC são bilineares e dados de Fluorescência são trilineares, por natureza. Matematicamente, são termos que se relacionam com o modo como é possível representar uma matriz partindo de elementos matemáticos mais básicos, como vetores (Olivieri; Escandar, 2014).

Para um conjunto de amostra, um tensor de dados de três vias X pode ser construído de modo que as matrizes de tamanho $J \times K$ medidas para I amostras sejam arranjadas em um tensor de dados de tamanho $I \times J \times K$ (Figura 7) (Olivieri; Escandar, 2014).

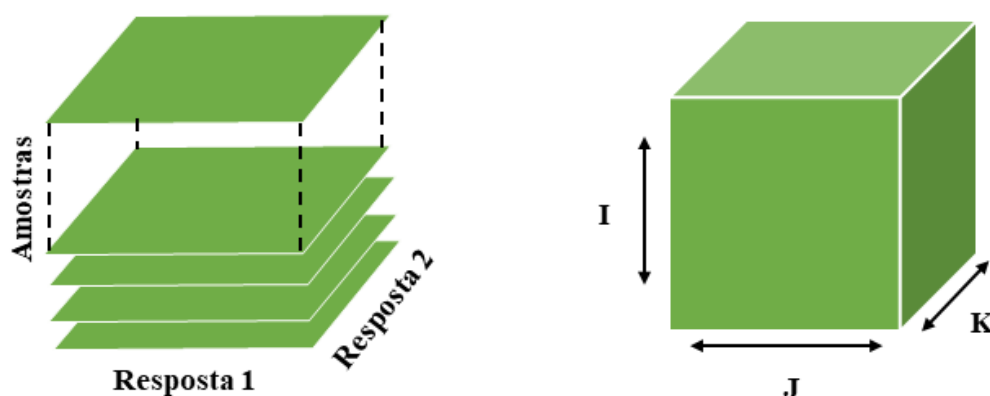


Figura 7- Tensor de três vias obtido a partir do empilhamento das matrizes de dados no modo de amostras (Adaptado de Olivieri, 2014).

A expressão matemática é descrita pela **Equação 3**, para uma mistura de N constituintes que geram sinais trilineares (Peña et al., 2015; Olivieri; Escandar, 2014).

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (3)$$

Em que a_{if} simboliza um elemento no modo de amostra referente ao perfil, isto é, o valor do perfil para o componente f na amostra i . b_{jf} e c_{kf} correspondem ao valor do constituinte nos perfis **b** e **c**, respectivamente. O termo e_{ijk} é referente aos erros aleatórios, inevitáveis em medidas experimentais que incluem ruídos. No caso de dados de dados de fluorescência, os termos b_{jf} e c_{kf} representam os espectros de excitação e emissão, respectivamente (Olivieri; Escandar, 2014).

O tensor X é dito trilinear se os vetores que representam as contribuições em cada dimensão são reprodutíveis entre as amostras (mesmo perfil) e se para amostras diferentes variam apenas as proporções de suas intensidades (Peña et al., 2015; Olivieri; Escandar, 2014).

O procedimento para recuperar os valores de a_{if} , b_{jf} e c_{kf} de X é chamado de decomposição, sendo o tensor de três vias decomposto nas três matrizes **A**, **B** e **C**. Onde **A** corresponde a matriz dos scores, B e C são matrizes de *loadings*. Um algoritmo capaz de realizar essa decomposição é denominado algoritmo de decomposição trilinear (TLD). Dentre os vários algoritmos disponíveis, a análise de fatores paralelos (PARAFAC) é o algoritmo mais utilizado (Olivieri; Escandar, 2014).

2.5.2.1 Análise de fatores paralelos

Desde a primeira aplicação da Análise de fatores paralelos por Appelhof e Davidson em espectros de matrizes de fluorescência de excitação-emissão, o número de aplicações na área de química analítica vem crescendo (Appelhof; Davidson, 1981; Peña et al., 2015). Análise de fatores paralelos é um método de decomposição trilinear cujo objetivo é encontrar os valores dos parâmetros a_{if} , b_{jf} e c_{kf} (**Equação 3**) de modo a minimizar a soma dos erros quadráticos (SSE) descrito na **Equação 4** (Olivieri; Escandar, 2014).

$$SSE = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K e_{ijk}^2 \quad (4)$$

Onde I corresponde ao número de amostras no arranjo trilinear, J e K referem-se aos números de sensores nos modos instrumentais (Olivieri; Escandar, 2014).

A **Figura 8** representa graficamente o esquema de decomposição dos dados pelo PARAFAC para dois componentes ($F=2$) com base na **Equação 3** (Bro, 1997).

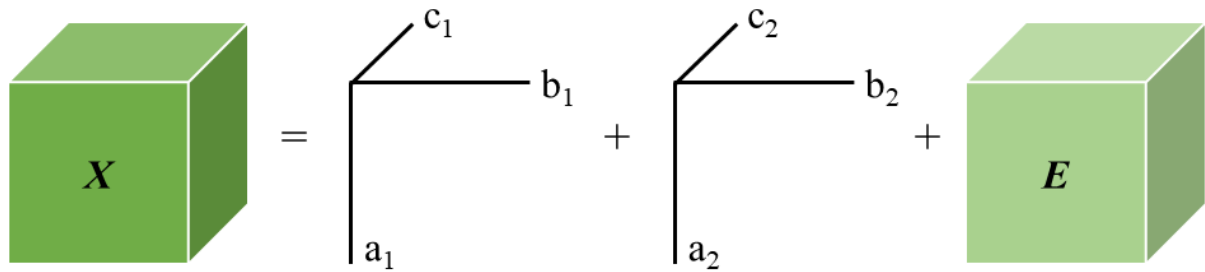


Figura 8- Representação gráfica da decomposição de X realizada para um modelo PARAFAC com dois componentes em duas tríades de vetores (Adaptado de Bro, 1997).

Uma vantagem do PARAFAC é a característica de unicidade da solução, ou seja, há uma única solução para a_{if} , b_{jf} e c_{kf} (Bro, 1997; Olivieri; Escandar, 2014). Se os dados forem realmente trilineares, o espectro da substância de interesse será encontrado desde que o número de componentes esteja correto e a relação sinal-ruído seja apropriada (Bro, 1997). Tal vantagem tem enorme interesse para os métodos de calibração multivias, visto que possibilita prever amostras de teste mesmo se interferentes não calibrados estiverem presentes (Olivieri; Escandar, 2014). No entanto, o modelo PARAFAC é dito indeterminado com relação a escala e ordem dos vetores de *loadings*. A ordem dos componentes não é definida e os perfis recuperados precisam ser identificados a partir de espectros de referência. Para prever amostras de teste, uma referência também é necessária para calcular um modelo de calibração com o perfil obtido (Peña *et al.*, 2015).

O gráfico de regressão gerado a partir dos valores recuperados de a_{if} , que são diretamente proporcionais a concentração de cada constituinte puro em cada amostra (tanto na calibração quanto nas amostras de teste), é chamado de curva pseudo-univariada (Olivieri; Escandar, 2014). Essa separação digital que o PARAFAC realiza dos constituintes como se eles estivessem fisicamente separados das misturas é conhecida como cromatografia virtual (Olivieri; Escandar, 2014).

O número de fatores do modelo pode ser diferente para cada amostra desconhecida, o que implica na modelagem de uma amostra por vez. Além disso, é de extrema importância que

o valor de F seja escolhido corretamente para o melhor desempenho possível. Na literatura existem diferentes abordagens para de terminar o número correto de componentes do modelo como conhecimento químico do sistema (visualização dos *loadings*), análise dos resíduos, variância explicada e diagnóstico de consistência de core (CORCONDIA) (Peña *et al.*, 2015).

Segundo o CORCONDIA, após o número de fatores correto ser alcançado a consistência de core cai para cerca de 50% (Olivieri; Escandar, 2014). No entanto, a eficiência da utilização dessa métrica tem sido questionada, visto que o PARAFAC tem apresentado desempenho satisfatório mesmo ao indicar inconsistência trilinear (Olivieri; Escandar, 2014).

Olivieri e Escandar recomendam o critério baseado no ajuste residual (s_{fit}) dado pela **Equação 5**, pois além de ser um bom indicador para obter o número correto de F , é mais intuitivo. Neste caso, se estuda a estabilização do s_{fit} no nível do ruído à medida que se aumenta o número de componentes (Olivieri; Escandar, 2014).

$$s_{fit} = \sqrt{\frac{SSE}{I \times J \times K}} \quad (5)$$

Olivieri e colaboradores desenvolveram e disponibilizaram a interface gráfica MVC2 para MATLAB, permitindo gerenciar vários algoritmos de calibração multivariada de segunda ordem. O MVC2 toolbox simplificou para os usuários a execução de algoritmos como o PARAFAC para lidar com problemas multivariados de segunda ordem (Olivieri; Wu; Yu, 2009).

2.6 Estado da arte da determinação de parabenos em cosméticos

Os parabenos têm sido quantificados de modo individual em diversas matrizes cosméticas utilizando várias técnicas analíticas como espectrofotometria, voltametria e cromatografia gasosa (Ahmad Rather; Al abri; Kannan, 2020; Altunay; Elik, 2022; Rajabi *et al.*, 2017). No entanto, a HPLC tem se destacado entre métodos para a determinação de vários parabenos, ainda que frequentemente envolva procedimentos de extração laboriosos (Abad-Gil *et al.*, 2021b; Gonçalves; Nagata; Peralta-Zamora, 2020; Gülle *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2020b; Shaaban *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018). Apesar de sua capacidade de identificar e quantificar espécies químicas, a HPLC é uma técnica complexa e de alto custo, que demanda alto consumo de solventes orgânicos, tempo e mão de obra especializada.

Neste contexto, Zgoła-Grzeskowiak *et al.* (2016) desenvolveram a primeira metodologia a empregar HPLC com detector de fluorescência para a determinação de MP, EP,

PP e BP em cosméticos (tônico facial, água micelar e perfume), com um procedimento de preparo de simples diluição (Zgoła-Grzeskowiak *et al.*, 2016).

Elif Yıldız e Cabuk (2018) quantificaram parabenos em amostras semissólidas de cremes, incluindo cremes preventivos de assaduras. A extração foi realizada utilizando, pela primeira vez, MSPD associada com um solvente supramolecular (SUPRAS), apresentado como uma alternativa ao uso de solventes orgânicos. No entanto, o tetrahidrofurano (THF) é usado como eluente, a síntese de SUPRAS demanda solventes orgânicos e sua formação também depende de uma solução de THF. Ainda, devido à complexidade das matrizes, são necessários dois métodos de extração, MSPD e microextração com solvente supramolecular (SUPRAS-ME) (Yildiz; Çabuk, 2018).

Levando em consideração os produtos cosméticos utilizados rotineiramente, é notável uma grande variedade nas formulações (cremes, géis, óleos, etc) (Abad-Gil *et al.*, 2021; Long *et al.*, 2021). Desse modo, à medida que a composição se distancia da base aquosa, se tornando mais complexa, são necessários procedimentos de extração mais elaborados que requerem maior tempo e consumo de reagentes (Abad-Gil *et al.*, 2021; Alvarez-Rivera *et al.*, 2012; Baranowska; Wojciechowska, 2013; Kaur *et al.*, 2020; Long *et al.*, 2021). No entanto, recentemente os DESs vêm sendo introduzidos como alternativa ambientalmente amigável nos procedimentos de extração. Apesar de compartilharem algumas propriedades físico-químicas com os líquidos iônicos (ILs), os DESs são notáveis pela facilidade do preparo, biodegradabilidade e baixo custo (Ge *et al.*, 2020; Kaya; Cetinkaya; Ozkan, 2022; Santos *et al.*, 2022).

Sivrikaya (2019) estudou pela primeira vez a utilização de DES para extração de parabenos. Neste trabalho foram analisadas amostras de óleos cosméticos empregando HPLC-UV e LLME assistida por vórtex, utilizando um DES baseado em cloreto de colina e etilenoglicol (2:1). A otimização da extração foi realizada avaliando uma variável por vez (OVAT) (Sivrikaya, 2019).

Ge *et al.* (2020) desenvolveram um método de extração baseado em microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (VA-DLLME) para a extração e pré-concentração de parabenos em amostras de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. Para os cosméticos em particular (dois cremes e uma loção), houve a necessidade de realizar um pré-tratamento com metanol nas amostras antes de serem submetidas à VA-DLLME. Um novo tipo de DES polimérico sintetizado a partir de DL-mentol e polietileno glicol 400 (1:1) foi estudado para a extração e as condições foram otimizadas pela metodologia OVAT. Neste

estudo as análises foram conduzidas utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) (Ge *et al.*, 2020).

Nezami *et al.* (2021) empregaram o DES feito a partir de timol:ácido enântico (1:1) para a extração de parabenos e inovaram ao introduzir um dispositivo para promover a dispersão do solvente extrator nas amostras de cosméticos (tônico facial, enxaguante bucal, gel de lidocaína e de Aloe Vera). Tanto a estratégia de avaliar uma variável por vez quanto RSM foram empregadas na otimização da DLLME assistida por fluxo de gás (Nezami *et al.*, 2021).

Dalmaz e Özak (2022) promoveram a quantificação de parabenos em enxaguantes bucais utilizando HPLC-UV. Neste trabalho a microextração líquido-líquido assistida por vórtex (VA-LLME) foi empregada, utilizando um DES obtido a partir de DL-mentol e ácido decanóico (4:1) como solvente extrator. A metodologia OVAT foi utilizada para otimizar os parâmetros envolvidos na extração e o método otimizado e validado foi empregado para quantificar parabenos em dez amostras comerciais de enxaguantes bucais (Dalmaz; Özak, 2022).

Também empregando LLME, Cao *et al.* (2022) utilizaram um DES de baixa viscosidade, produzido a partir de cloreto de tetrabutilamônio e etanol (1:5), para extração de parabenos em amostras de creme dental. No entanto, n-hexano foi utilizado na extração juntamente com o DES para a etapa final de limpeza. As variáveis envolvidas na extração foram avaliadas uma por vez e as análises feitas por HPLC-DAD (Cao *et al.*, 2022).

A aplicação de DESs na extração de parabenos de diversas matrizes cosméticas tem demonstrado seu potencial nos procedimentos de extração baseados em DLLME e, principalmente, em LLME. Além de todas as vantagens do uso de DESs, os derivados do cloreto de colina como HBA não exigem pré-tratamento adicional e são solúveis em água e em determinados solventes orgânicos (ABBOTT *et al.*, 2003; SHISHOV *et al.*, 2017; SIVRIKAYA, 2019). Embora os DESs preparados a partir de cloreto de colina e etilenoglicol (ChCl:EG) tenham sido usados na extração de parabenos de amostras de óleos cosméticos, seu uso para extração em matrizes semissólidas ainda não foi relatado (Sivrikaya, 2019).

Na maioria dos trabalhos relatados anteriormente, a otimização dos parâmetros analíticos foi realizada usando a estratégia OVAT (Cao *et al.*, 2022; Dalmaz; Özak, 2022; Ge *et al.*, 2020; Sivrikaya, 2019). No entanto, essa abordagem tem algumas deficiências, como muitos experimentos, resultando em maior consumo de recursos e tempo (Bezerra *et al.*, 2008; Kashani; Ghoreishi; Khoobi, 2019). Além disso, ela impossibilita a determinação de como as variáveis interagem entre si e a influência dessas interações na resposta (Altunay; Elik, 2022; Kashani; Ghoreishi; Khoobi, 2019). Para contornar essas restrições, a RSM tem sido

amplamente empregada como uma técnica estatística multivariada para otimizar simultaneamente os níveis das variáveis e melhorar o desempenho do sistema (Bezerra *et al.*, 2008).

Alguns estudos aplicaram a RSM para a otimização dos procedimentos de DLLME e LLME usando DESs e determinação espectrométrica UV-Vis de parabenos individuais. Entretanto, esses métodos exigiram o pré-tratamento da amostra com solventes orgânicos (Altunay; Elik, 2022).

Apesar das vantagens do uso de DESs na extração de parabenos em cosméticos, ainda pode haver a sobreposição de sinais analíticos proveniente dos constituintes de matrizes complexas. O uso de técnicas de calibração multivariadas tem se destacado para superar essas limitações (Long *et al.*, 2021; Vosough *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2018).

Vosough *et al.* (2017) apresentaram, pela primeira vez, a utilização de ATLD (Decomposição Tri-linear Alternada) e MCR-ALS (Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternados) com dados HPLC-DAD, para análise rápida de filtros UV, MP e PP em amostras de protetor solar. Os autores concluíram que a quantificação foi precisa usando ambos os algoritmos, porém houve um melhor desempenho com MCR-ALS (Vosough *et al.*, 2017).

Yin *et al.* (2018) utilizaram de estratégia HPLC-DAD associada aos métodos de calibração multivariada de segunda ordem baseados nos algoritmos ATDL e MCR-ALS para quantificar MP, EP, PP, BP e mais 4 conservantes (fenoxietanol, ácido salicílico, metilisotiazolinona e 3-iodo-2-propinil-n-butilcarbamato) em máscaras faciais. Os autores inovaram ao investigar o emprego de ATLD para modelar dados de HPLC-DAD com leves deslocamentos de tempo e alta sobreposição de sinais. Não houve a necessidade de preparo de amostras demorados ou da separação cromatográfica completa para a determinação dos analitos. O método mostrou ser rápido e confiável para a quantificação dos conservantes, dentre eles MP, EP, PP e BP (Yin *et al.*, 2018).

Em trabalho desenvolvido por Long *et al.* (2021), os autores propuseram a determinação rápida e simultânea de MP, EP, PP, BP e mais 8 conservantes em vários produtos cosméticos, também empregando HPLC-DAD, calibração de segunda ordem e ATLD para a modelagem. Quando comparado a métodos com preparo de amostra mais complexos, o método apresentado teve limites de quantificação análogos e até inferiores aos destes métodos, além de recuperações aceitáveis, com a vantagem de possuir uma extração simples e menor tempo de eluição cromatográfica (Long *et al.*, 2021).

Nos trabalhos mencionados anteriormente, em que houve o emprego de calibração multivias, o preparo das amostras ocorreu de forma simples, assistido por ultrassom ou vórtex. No entanto, os solventes orgânicos metanol e acetonitrila foram utilizados como extratores (Long *et al.*, 2021; Vosough *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método de calibração multivias para a determinação do teor total de parabenos em amostras de creme preventivo de assaduras utilizando espectroscopia de fluorescência molecular. A extração de parabenos foi realizada por meio de um método ambientalmente amigável, empregando DES como solvente extrator e otimizado por RSM.

Capítulo 3

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e soluções

Padrões de alta pureza (>99%) de metil-4-hidroxibenzoato, etil-4-hidroxibenzoato, propil-4-hidroxibenzoato e butil-4-hidroxibenzoato foram adquiridos da *Sigma Aldrich*. Acetonitrila grau HPLC (J.T Baker) e água ultrapura, obtida de um sistema de purificação de água Mili-Q (Milipore), foram utilizados em todo procedimento.

Soluções estoque individuais dos parabenos foram preparadas, inicialmente em acetonitrila, à concentração de $\cong 300 \text{ mg L}^{-1}$ e armazenadas em frascos âmbar no *freezer* (-20°C) até sua utilização em, no máximo, uma semana. Para a calibração, soluções padrão de PP foram preparadas diariamente por diluição apropriada da solução estoque, em triplicata, em solução de água/acetonitrila (65 : 35, v v⁻¹). Sete níveis de concentração foram empregados na faixa de 100 – 1.300 ng g⁻¹.

O conjunto de validação foi composto de seis misturas quaternárias de parabenos preparadas a partir das soluções estoque de modo a formar misturas com diferentes proporções em cada ponto de concentração de acordo com a **Tabela 3**.

Tabela 3- Concentração dos quatro parabenos nas misturas-padrão de validação

Conjunto de validação	[C] _{individual} ng g ⁻¹				[C] _{nominal} ng g ⁻¹
	MP	EP	PP	BP	
1	50	66	40	44	200
2	30	180	100	90	400
3	198	150	132	120	600
4	180	100	320	200	800
5	330	220	250	200	1000
6	240	264	300	396	1200

O DES foi sintetizado utilizando cloreto de colina e etilenoglicol adquiridos da *Sigma-Aldrich*. O etanol (P.A.) adicionado ao DES para a extração foi obtido da marca Dinâmica.

As amostras de predição foram preparadas através da fortificação de uma amostra comercial isenta, de acordo com o rótulo do produto, com misturas quaternárias de parabenos. Para tal, a amostra isenta foi previamente analisada para a confirmação da ausência dos analitos. As misturas quaternárias foram preparadas em propilenoglicol P.A.(Dinâmica) e obedeceram às mesmas proporções das misturas de validação (**Tabela 3**).

Por fim, seis amostras de creme preventivo de assaduras infantil de diferentes marcas e lotes foram adquiridas em farmácias locais (João Pessoa, Paraíba, Brasil) e utilizadas para

avaliar o desempenho do método desenvolvido. As composições da amostra isenta e das seis amostras contendo parabenos estão dispostas no ANEXO I.

3.2 Síntese e caracterização do solvente eutético profundo

O DES foi preparado utilizando cloreto de colina (ChCl) comoceptor de ligações de hidrogênio e etilenoglicol (EG) como doador de ligações de hidrogênio, numa razão molar de 1:2 (ChCl:EG). O ChCl e o EG foram pesados num tubo Falcon de fundo plano e agitados em vórtex (30 s). Em seguida, a mistura foi colocada num banho térmico a 60°C até o líquido se tornar homogêneo e com aspecto translúcido (aproximadamente 10 minutos). O DES resultante foi resfriado à temperatura ambiente e armazenado em dessecador para evitar oxidação até seu uso na fase de extração. A **Figura 9** dispõe o esquema de preparo do DES.

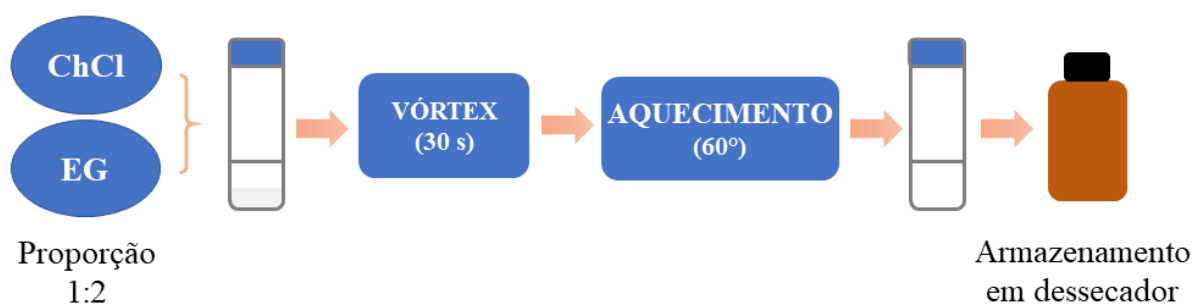


Figura 9- Esquema de síntese do solvente eutético profundo. Fonte: autora.

A caracterização do composto sintetizado foi realizada a partir da obtenção de espectros no infravermelho tanto do DES quanto de seus precursores. A espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) foi realizada em um equipamento *Shimadzu – IRPrestige21*. Os espectros foram registrados com 4 varreduras na faixa de 4.000 – 600 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

3.3 Otimização do procedimento de extração

Um planejamento experimental foi realizado a fim de otimizar o processo de extração e assim definir a melhor condição. Para tal otimização, utilizou-se um planejamento composto central (CCD), uma vez que requer um menor número de ensaios experimentais que um planejamento fatorial completo, ao mesmo tempo que fornece informações suficientes sobre o sistema (Alipanahpour dil *et al.*, 2021).

Inicialmente uma amostra de matriz isenta foi fortificada ao nível de 1% (m m^{-1}) com uma mistura quaternária de parabenos em propilenoglicol, que é um constituinte comum em formulações de cremes para assaduras. A matriz fortificada foi agitada manualmente com o auxílio de uma espátula durante 5 minutos, até a homogeneização completa. Uma porção de 50 mg da matriz fortificada foi pesada em balança analítica, e esta quantidade foi utilizada em cada ensaio de otimização.

De modo geral, as extrações foram realizadas em alíquotas de 50 mg da matriz fortificada pesadas em micro tubos *Eppendorf* de 2 mL e massas do solvente extrator foram adicionadas conforme os níveis apresentados na **Tabela 4**. Cada mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos, sonicada e centrifugada por 5 minutos a 7.000 rpm. A fase líquida de cada ensaio foi coletada e posteriormente diluída para a medida. As medições foram realizadas em soluções preparadas pela diluição adequada dos extratos em uma solução de $\text{H}_2\text{O} / \text{ACN}$ (65 : 35, v v⁻¹) para atingir uma concentração de 600 ng g⁻¹, que corresponde ao ponto médio da curva de calibração. As concentrações de cada parabeno nesse ponto são mostradas na **Tabela 3 (Seção 3.1)**.

A **Tabela 4** dispõe os fatores e seus níveis codificados e reais avaliados no CCD.

Tabela 4- Níveis das variáveis independentes reais e codificadas utilizadas para o CCD.

Fatores	Níveis				
	$-\alpha$	(-1)	(0)	(+1)	$+\alpha$
A: Extrator solvente (g)	0,06	0,20	0,40	0,60	0,74
B: Tempo (min)	3,18	10	20	30	36,82
C: EtOH (%m m ⁻¹)	3,18	10	20	30	36,82

O efeito de três fatores na eficiência de extração de parabenos foi avaliado com base na recuperação, a saber: massa de solvente extrator; tempo de extração no ultrassom e teor de etanol (adjuvante). O solvente extrator foi composto do DES misturado ao EtOH em percentuais determinados pelo planejamento utilizado. A **Figura 10** mostra o modo geral de preparo de amostras para os experimentos do planejamento.

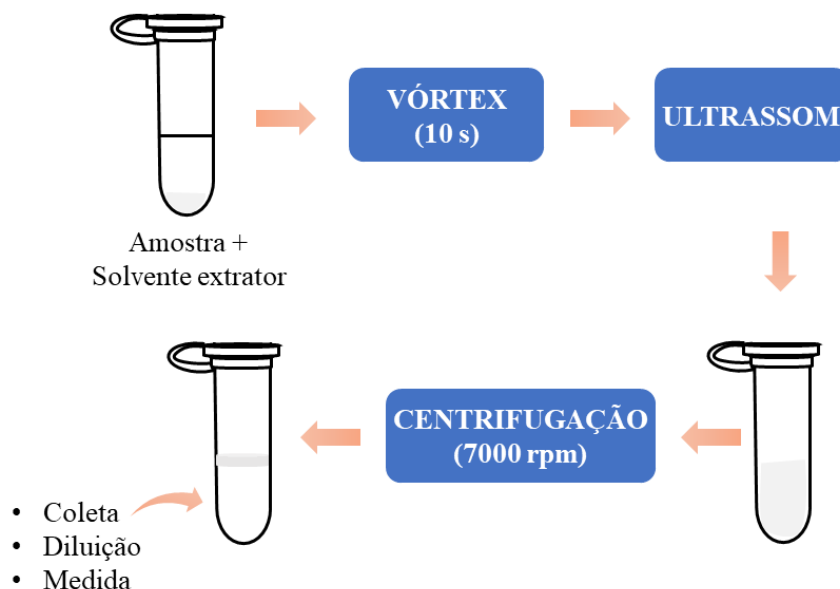


Figura 10- Preparo de amostras para os ensaios do planejamento experimental. Fonte: autora.

O CCD foi desenvolvido com 17 experimentos (**Equação 1**), realizando triplicatas no ponto central para determinar o erro experimental. O emprego desse tipo de planejamento possibilita a análise de curvatura da função que descreve a superfície de resposta (*Carabajal et al.*, 2020). Os experimentos foram conduzidos de modo aleatório para avaliar os efeitos dos fatores na recuperação de parabenos.

Os fatores significativos determinados a partir do CCD e pelo gráfico de Pareto foram selecionados para a otimização RSM subsequente. Para os fatores não significativos, os valores foram mantidos nos pontos centrais. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para avaliar se o modelo matemático descrevia satisfatoriamente o domínio experimental estudado (*Bezerra et al.*, 2008). A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* STATISTICA para estudar as contribuições dos fatores na resposta e obter um modelo de regressão quadrática.

3.4 Quantificação em amostras comerciais

Após a otimização do procedimento de extração e determinação dos níveis dos fatores que maximizam a recuperação, alíquotas de matriz isenta foram fortificadas em seis níveis, conforme procedimento detalhado na **Seção 3.3**. As misturas quaternárias de parabenos obedeceram às mesmas proporções de concentrações utilizadas para a validação com padrões (**Tabela 3**).

As extrações foram realizadas em triplicata para cada nível de fortificação e o teor de parabenos totais foi determinado. A recuperação foi calculada para avaliar a exatidão do método proposto e a eficiência da extração.

Para as amostras comerciais de creme preventivo de assaduras infantil em que conta nos rótulos a presença de parabenos, além do nível zero, foram estudados três níveis de fortificação, a saber: 200 ng g⁻¹; 400 ng g⁻¹ e 600 ng g⁻¹.

3.5 Aquisição dos espectros e processamento dos dados

Os espectros 3D de matrizes de fluorescência de excitação-emissão (EEFM) foram obtidos a temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) utilizando um espectrofluorímetro da marca *Agilent* (*Cary Eclipse model*). Foram realizadas varreduras contínuas de fluorescência de excitação-emissão registrando espectros de emissão de 290 nm a 420 nm variando o comprimento de onda de excitação de 244 nm a 268 nm, passo de 2 nm e os monocromadores de excitação emissão ajustados com uma abertura de fenda de 5 nm.

Na matriz tridimensional gerada, as linhas correspondem aos espectros de emissão, enquanto as colunas correspondem aos espectros de excitação. O tensor de dados de segunda ordem tridimensional, obtido pelo agrupamento das matrizes de amostra, foi processado empregando PARAFAC, executado no Matlab 2021a com a interface gráfica MVC2 (**Figura 11**) desenvolvida por Olivieri e colaboradores (Olivieri; Wu; Yu, 2009). Os espectros das amostras foram decompostos em componentes puros e o teor total de parabenos foi determinado por calibração pseudo-univariada (Bro, 1997; Olivieri; Wu; Yu, 2009; Olivieri; Escandar, 2014).

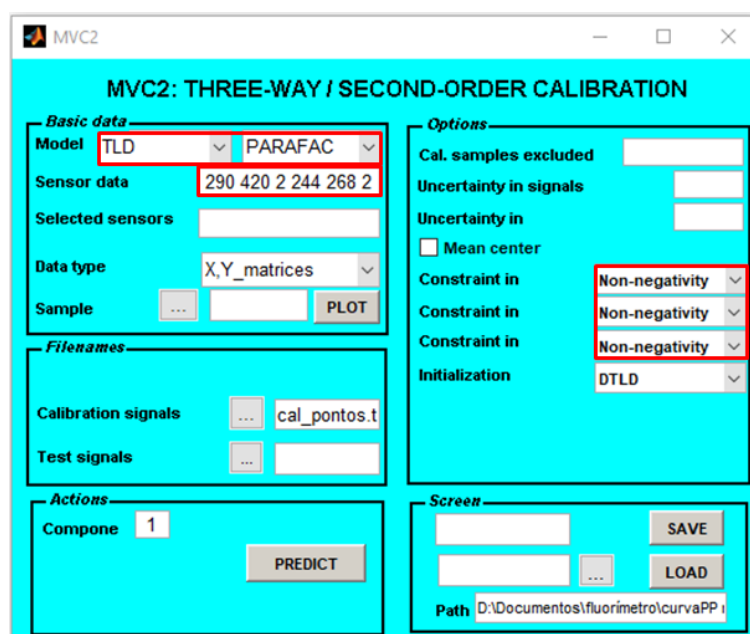


Figura 11- Interface gráfica do MVC2 com destaque para a escolha do modelo, o tamanho dos dados e as restrições utilizadas. Fonte: autora.

Os modelos foram construídos utilizando restrições de não-negatividade nos três modos e as amostras foram modeladas uma por vez. O desvio padrão residual (s_{fit}), foi usado como parâmetro para determinar o número de componentes (Olivieri; Escandar, 2014). Um exame da similaridade entre os modos espectrais recuperados pelo PARAFAC e os espectros de excitação-emissão puros também foi realizado.

Capítulo 5

Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização

Dentre as técnicas empregadas para caracterização de DESs, a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR) tem sido amplamente empregada (Alomar *et al.*, 2016; Gabriele *et al.*, 2019; Santana *et al.*, 2019). A **Figura 12** apresenta os perfis espectrais distintos do solvente eutético estudado (ChEg) e de seus precursores (cloreto de colina e etilenoglicol), mais pronunciados na faixa espectral entre $3600 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, que corresponde à região associada aos grupos hidroxila ($-\text{OH}$) (Costa *et al.*, 2023).

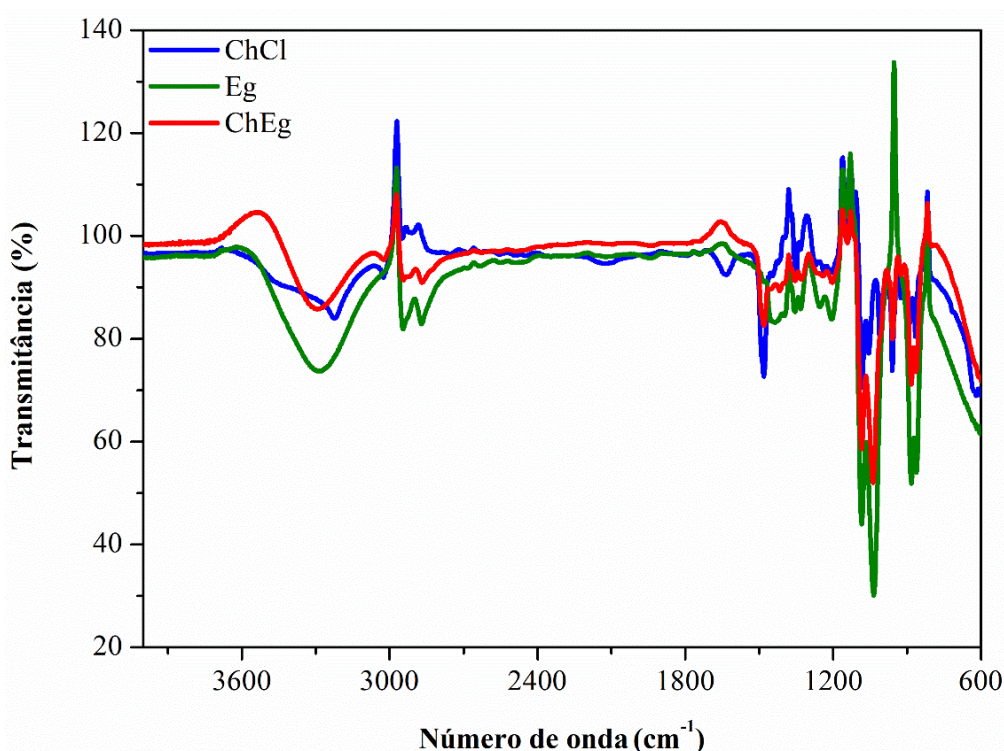


Figura 12- Espectros FTIR: cloreto de colina (—); etileno glicol (—), e ChEg (—). Fonte: autora.

As alterações na vibração OH indicam fortemente a presença de interações referentes a ligações de hidrogênio entre etilenoglicol e cloreto de colina, e a formação do DES. Embora na literatura ainda haja incertezas relacionadas à formação de DESs, é sabido que sua formação está diretamente associada a interações intermoleculares e intramoleculares, principalmente por meio de ligações de hidrogênio (Chen *et al.*, 2019; Gajardo-Parra *et al.*, 2019; Migliorati; Sessa; D'angelo, 2019). Nesse contexto, vale salientar que a eficiência do solvente molecular como extrator no preparo de amostras, depende do estabelecimento de uma rede de ligações de

hidrogênio, que interage com o analito facilitando sua extração (Li *et al.*, 2021; Rente; Paiva; Duarte, 2021).

4.2 Otimização do procedimento de extração

A **Tabela 5** apresenta a lista de experimentos gerada pelo CCD e as respostas correspondentes em termos de recuperação.

Tabela 5-Experimentos gerados pelo CCD e suas respostas correspondentes.

Experimento	A	B	C	R (%)
1	0,20	10,0	10,0	52,8
2	0,20	10,0	30,0	44,3
3	0,20	30,0	10,0	55,0
4	0,20	30,0	30,0	73,6
5	0,60	10,0	10,0	62,1
6	0,60	10,0	30,0	48,4
7	0,60	30,0	10,0	59,2
8	0,60	30,0	30,0	79,7
9	0,06	20,0	20,0	61,2
10	0,74	20,0	20,0	60,2
11	0,40	3,18	20,0	38,9
12	0,40	36,82	20,0	72,0
13	0,40	20,0	3,18	29,0
14	0,40	20,0	36,82	74,2
15	0,40	20,0	20,0	64,6
16	0,40	20,0	20,0	55,8
17	0,40	20,0	20,0	60,0

O modelo estatístico-matemático, em termos de valores codificados para a recuperação de parabenos, é dado pela **Equação 6**.

$$R(\%) = 59,89 + 1,61A + 1,03A^2 + 8,46B - 0,83B^2 + 6,80C - 2,19C^2 - 0,39AB - 0,41AC + 7,66B \quad (6)$$

A influência dos parâmetros estudados na resposta de interesse foi avaliada usando o gráfico de Pareto (**Figura 13**), que mostrou que os fatores mais significativos ($p < 0,05$) foram a proporção de etanol usada como adjuvante, o tempo de extração em ultrassom e sua interação, respectivamente. A **Figura 13** mostra o gráfico de Pareto considerando apenas os parâmetros lineares.

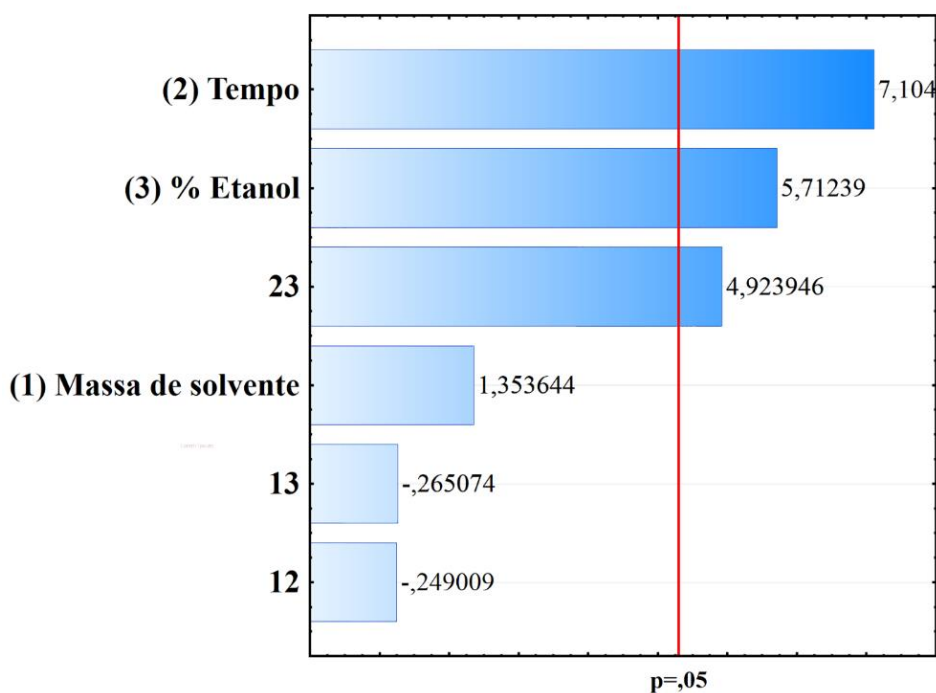


Figura 13- Gráfico de Pareto dos efeitos para a recuperação de parabenos. Fonte: autora.

A **Equação 7** apresenta o modelo estatístico-matemático, em termos de valores codificados para a recuperação de parabenos considerando os fatores significativos.

$$\text{Recuperação (\%)} = 59,89 + 8,46B + 6,80C + 7,66BC \quad (7)$$

Os fatores significativos e seu efeito sinérgico podem estar relacionados ao processo de transferência de massa. O uso de etanol como adjuvante reduz a viscosidade do DES, permitindo assim condições mais favoráveis para a transferência de massa (Costa *et al.*, 2020). Ainda, o aumento do tempo de extração também favorece este fenômeno, devido ao maior tempo de contato entre o solvente e a matriz. Portanto, é possível obter maiores recuperações maximizando esses fatores como consequência do reforço na transferência de massa e da melhoria da eficiência da extração.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada com intuito de avaliar se o modelo matemático descreve satisfatoriamente o domínio experimental estudado (Bezerra *et al.*, 2008). A **Tabela 6** apresenta a ANOVA para a recuperação de parabenos (variável dependente).

Tabela 6- ANOVA para o CCD avaliando a recuperação de parabenos como resposta.

Fonte de variação	Somas quadrática	GL	Média quadrática	F_{cal}
Regressão	2079,8	3	693,3	12,9
Resíduo	698,8	13	53,8	
Falta de ajuste	660,0	11	60,0	3,1
Erro puro	38,7	2	19,4	
Total	2778,6	16		-

$$F_{0,95;(3,13)} = 3,41; F_{0,95;(11,2)} = 19,40; R^2 = 0,75$$

O modelo quadrático mostrou um coeficiente de determinação relevante ($R^2 = 0,75$), indicando que 75% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. A significância do modelo de regressão foi avaliada por meio de um teste F , que compara a média quadrática devido à regressão com a média quadrática residual. O valor de F calculado foi superior ao valor tabelado (3,41), indicando que o modelo matemático é estatisticamente significativo (95% de confiança) e bem ajustado aos dados experimentais. Um teste semelhante foi realizado para a média quadrática devido à falta de ajuste e a média quadrática devido ao erro puro. A relação entre MQ_{faj}/MQ_{ep} resultou em valor menor que o F crítico (19,40) à 95% de confiança e revelou que o modelo é preditivo, sem evidência de falta de ajuste (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

Com base na superfície de resposta (**Figura 14**), as condições operacionais otimizadas para a recuperação foram estimadas em 0,4 g de DES, tempo de extração em ultrassom de 30 minutos e teor de EtOH de 36,8%. Embora a recuperação não seja significativamente afetada pela massa do DES, mantê-la no ponto central proporcionou melhores condições para a coleta da fase enriquecida após a centrifugação.

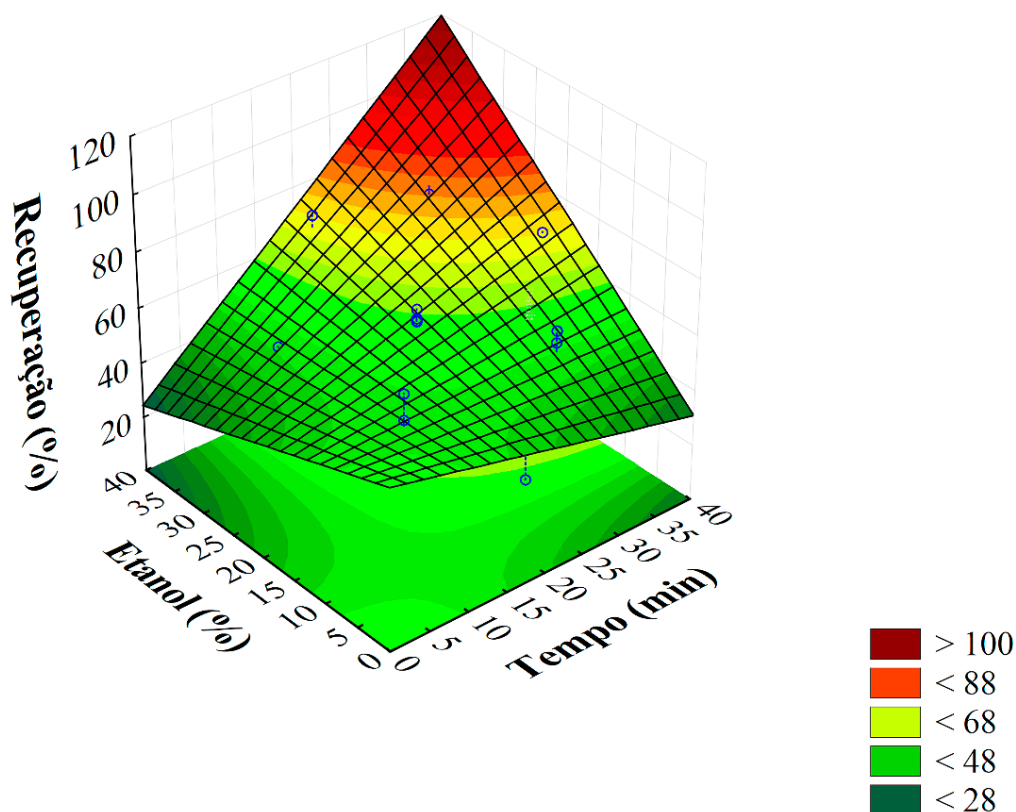


Figura 14- Gráfico de superfície de resposta para o planejamento composto central da recuperação de parabenos como função de dois fatores: tempo de extração (B) e %EtOH (C). Fonte: autora.

Nesse caso, não foi possível realizar o deslocamento da região experimental, pois uma maior quantidade de etanol adicionada ao DES provocaria o desfazimento do sistema eutético. Ainda, testes realizados com maior tempo de extração resultaram em uma queda acentuada da recuperação.

Na **Tabela 7** encontra-se os valores experimentais de recuperação sob condições otimizadas.

Tabela 7- Resultados experimentais obtidos sob condições otimizadas.

Concentração nominal (ng g ⁻¹)	Concentração predita (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)	$\bar{x}$ (%)	s	CV (%)
600	522,6	87,1	85,3	0,02	2,6
	496,6	82,8			
	515,8	86,0			

O valor de recuperação predito pelo modelo sob condições otimizadas foi de 91,0%, sendo a recuperação média obtida experimentalmente ($85,3 \pm 0,02\%$) suficientemente próxima do valor previsto para confirmar a capacidade preditiva do modelo. Vale salientar que uma

equação matemática resultante de uma combinação linear de fatores únicos não representa totalmente a complexidade do fenômeno de transferência de massa difusional envolvido. As condições otimizadas foram usadas em todas as extrações subsequentes neste trabalho.

4.3 Análise quantitativa do conjunto de validação e de predição

No método desenvolvido, os espectros das matrizes de fluorescência de excitação-emissão do conjunto de calibração foram organizados em um tensor de três vias com uma amostra por vez. Devido à presença de interferentes, um modelo PARAFAC específico foi desenvolvido para cada amostra, garantindo, dessa forma, a vantagem de segunda ordem.

A **Figura 15** mostra de forma representativa o gráfico de contorno (**Figura 15 (a)**), os modos de emissão (**Figura 15 (b)**) e de excitação (**Figura 15 (c)**) obtidos pelo PARAFAC para a amostra 3 do conjunto de validação (**Tabela 3**). O perfil em azul, com λ_{em} máximo em 320 nm corresponde ao perfil dos parabenos. Os perfis 2 e 3 estão relacionados a interferentes.

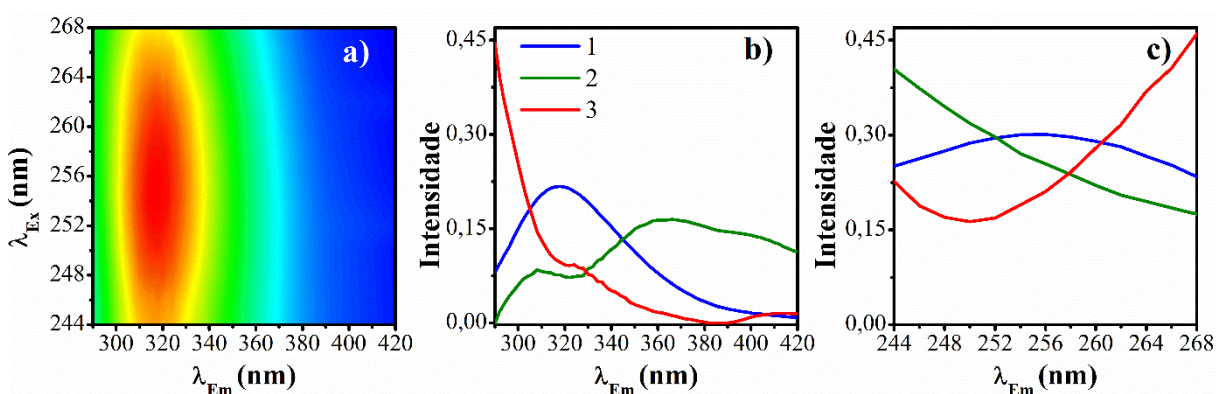


Figura 15- (a) gráfico de contorno para a amostra de validação com concentração de 600 ng g^{-1} ; (b) modo de excitação e (c) modo de emissão recuperados pelo PARAFAC. Fonte: autora.

Na **Figura 16** é apresentado o gráfico do ajuste residual (s_{fit}) em função do número de componentes separados pelo PARAFAC para a mesma amostra.

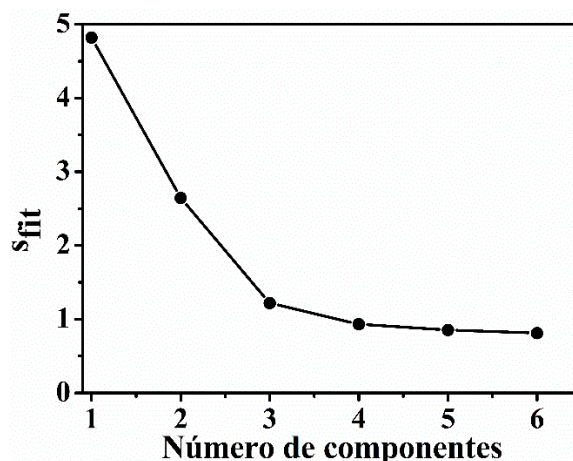


Figura 16- Gráfico do s_{fit} versus o número de componentes para a amostra de validação com concentração de 600 ng g⁻¹. Fonte: autora.

No estudo realizado para essa amostra, apesar de ainda haver um pequeno decréscimo para quatro componentes, ao analisar visualmente o gráfico dos *loadings* observou-se que três componentes eram suficientes para a modelagem. A **Figura 17** demonstra a modelagem dessa amostra junto com os padrões de PP na curva pseudo-univariada.

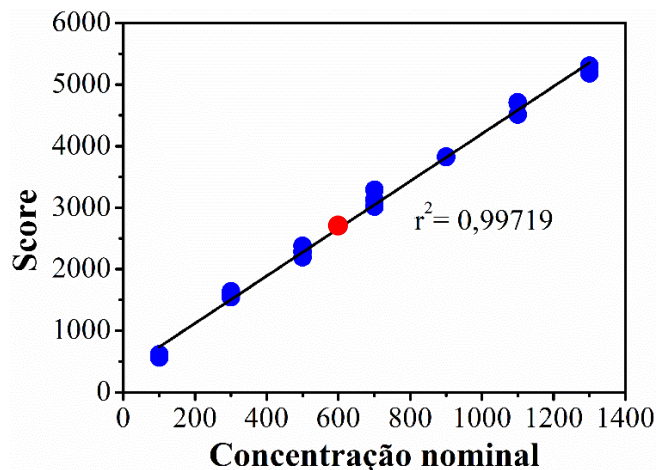


Figura 17- Curva pseudo-univariada com amostra de teste destacada em vermelho. Fonte: autora.

A **Tabela 8** mostra as concentrações preditas do conjunto de validação, composto de misturas quaternárias de parabenos em solução de H₂O / ACN (65 : 35, v v⁻¹).

Tabela 8- Concentração preditas de parabenos pelo modelo PARAFAC no conjunto de validação. Modelo construído com três fatores e predições realizadas com uma amostra por vez.

Conjunto de validação	[C] _{nominal} ng g ⁻¹	[C] _{pred} ng g ⁻¹ (RSD)	RMSE ng g ⁻¹	REP (%)
1	200	176 (0,02)	32	4,5
2	400	406 (0,05)		
3	600	607 (0,03)		
4	800	829 (0,02)		
5	1.000	1.064 (0,01)		
6	1.200	1.178 (0,01)		
s _{fit} (sd)			1,32 (0,14)	
r ²			0,99	

De acordo com os valores preditos apresentados na **Tabela 8**, pode ser observado que o modelo PARAFAC determinou com sucesso a concentração total de parabenos a partir de um modelo de calibração desenvolvido com PP, mesmo com a proporção individual dos parabenos variando em cada mistura de validação conforme especificado na **Seção 3.1**.

O método desenvolvido se beneficia da baixa seletividade da técnica de fluorescência em relação aos parabenos, com a vantagem de permitir a quantificação total empregando tão somente padrões de PP, que é um dos parabenos mais comumente utilizados, normalmente empregado junto com o MP. Essa característica destaca a eficiência do método proposto em termos de tempo e recursos.

Os valores de r² expressaram uma boa variabilidade dos dados explicada pelo modelo e uma correlação linear elevada entre as concentrações preditas e nominais pode ser inferida. O desvio padrão relativo (%RSD) para cada mistura de validação e %REP menores que 5% foram obtidos, além de um RMSEP inferior ao valor mínimo da faixa de calibração. O limite de detecção (LOD) foi determinado como 3,3 vezes o desvio padrão das predições de amostras da matriz em branco no modelo. O valor de LOD de 23 ng g⁻¹ demonstrou ser satisfatório para a aplicação do método proposto, pois foi consideravelmente abaixo da faixa de concentração usada para determinar parabenos neste estudo.

O modelo desenvolvido com o PARAFAC também foi aplicado aos dados obtidos a partir de uma amostra comercial isenta dos analitos, inicialmente sem fortificação, e posteriormente fortificada nos mesmos níveis do conjunto de validação (**Tabela 3**), aumentando assim a complexidade da matriz avaliada.

Na **Figura 18** encontra-se o gráfico de contorno para a mostra isenta de parabenos (ANEXO I) em que é possível observar que não há sinal espectral referente aos parabenos.

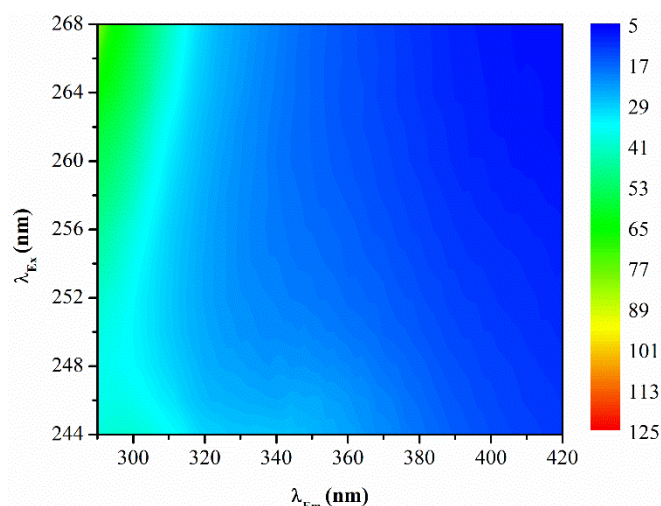


Figura 18- Gráfico de contorno de amostra comercial isenta de parabenos.

A **Figura 19** apresenta o gráfico de contorno (**Fig. 19 (a)**), os modos de emissão (**Fig. 19 (b)**) e de excitação (**Fig. 19 (c)**) obtidos pelo modelo PARAFAC para a amostra comercial isenta fortificada com uma mistura quaternária ao nível de 600 ng g^{-1} (**Tabela 3**). De acordo com o estudo do s_{fit} já demonstrado anteriormente para uma amostra de validação, três componentes foram necessários para a modelagem, entre os quais apenas um componente corresponde ao sinal dos parabenos, enquanto os demais estão relacionados a interferentes desconhecidos.

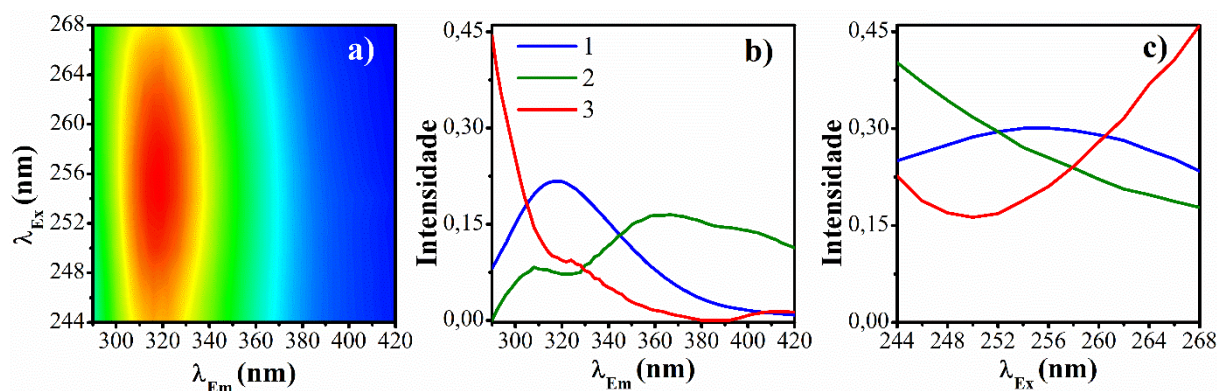


Figura 19- (a) gráfico de contorno para amostra de predição isenta fortificada com 600 ng g^{-1} ; (b) modo de emissão e (c) modo de excitação recuperados pelo PARAFAC. Fonte: autora.

De acordo com o estudo do s_{fit} , demonstrado anteriormente, três componentes foram necessários para a modelagem, entre os quais apenas um componente corresponde ao sinal dos parabenos, enquanto os demais (perfis 2 e 3) estão relacionados a interferentes desconhecidos.

A **Tabela 9** mostra os resultados quantitativos para cada nível de fortificação avaliado nas amostras de predição.

Tabela 9- Concentrações preditas pelo modelo PARAFAC no conjunto de predição. Modelos PARAFAC construído com três fatores e predições realizadas com uma amostra por vez.

Conjunto de predição	[C] _{nominal} ng g ⁻¹	[C] _{pred} ng g ⁻¹ (RSD)	Recuperação (%)	RMSEP ng g ⁻¹	REP (%)
1	200	212 (0,07)	106,1	105	15
2	400	315 (0,08)	78,7		
3	600	512 (0,03)	85,3		
4	800	645 (0,09)	80,6		
5	1.000	941 (0,09)	94,2		
6	1.200	1.046 (0,07)	87,2		
s _{fit} (sd)				1,37 (0,13)	
r ²				0,99	

Além da alta correlação linear observada, o valor médio de s_{fit} corresponde a menos de 5% da intensidade do sinal de padrões e amostras em unidades de fluorescência, indicando um resíduo adequado e a ausência de problemas de ajuste (Olivieri; Escandar, 2014; Siqueira; Almeida; Fragoso, 2023).

Resultados satisfatórios foram obtidos com recuperação variando de 87,2% a 106,1% e REP% de 15%, o que valida a exatidão e a confiabilidade do método proposto. Os resultados obtidos também corroboram a eficiência do procedimento de extração adotado neste estudo, visto que influencia diretamente na exatidão do modelo.

4.4 Matrizes espectrais de excitação e emissão de amostras comerciais

Cremes preventivos de assaduras são matrizes complexas e, dependendo da amostra comercial analisada, diferentes constituintes podem interferir na determinação dos parabenos devido às variações na composição entre fabricantes. Contudo, o perfil espectral dos parabenos permanece o mesmo, conforme determinado no conjunto de calibração. Logo, o desenvolvimento de um modelo PARAFAC específico para cada amostra é justificado para

permitir a determinação dos analitos sem recorrer a etapas de limpeza ou métodos cromatográficos trabalhosos, garantindo assim a vantagem de segunda ordem.

A **Figura 20** mostra o gráfico de contorno para uma solução de PP com concentração de 300 ng g^{-1} .

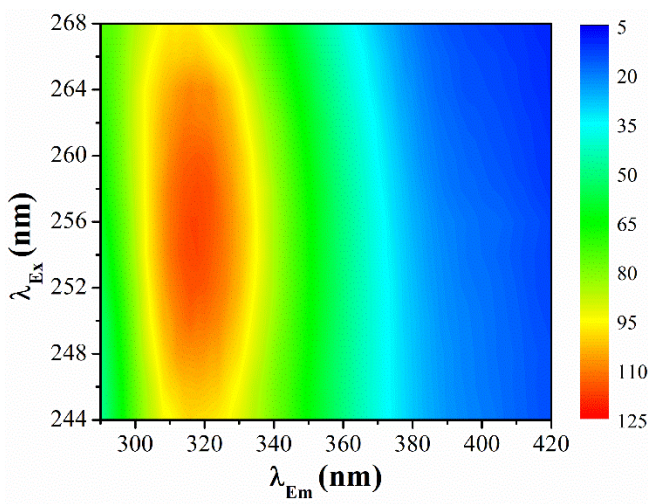


Figura 20- Gráfico de contorno para uma solução de calibração com concentração de 300 ng g^{-1} de PP.

Como pode ser observado na **Figura 21**, ao comparar os perfis encontrados com o perfil de PP puro (**Figura 20**), que é utilizado para realizar a quantificação total de parabenos, mesmo após a realização da extração otimizada, há interferentes com sinal de fluorescência intenso e que se sobrepõem ao dos analitos.

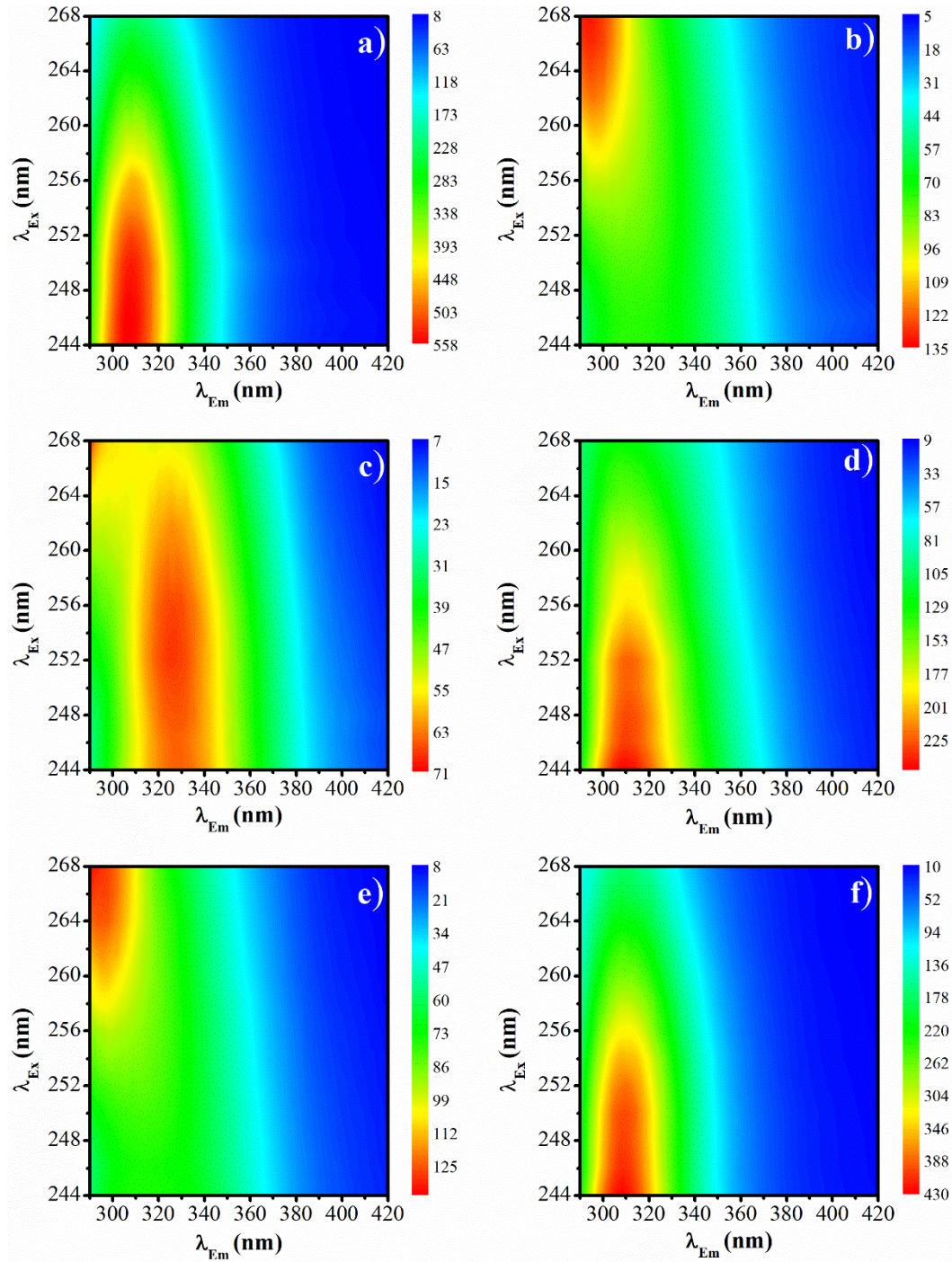


Figura 21- Gráficos de contorno bidimensionais de EEFM para as amostras comerciais a) S1, b) S2, c) S3, d) S4, e) S5, f) S6. Fonte: autora.

No espectro referente à amostra S1 (**Figura 21 (a)**), observa-se uma sobreposição de sinais na faixa de excitação 244–268 nm e emissão de 290–350 nm. Como o λ_{em} máximo do interferente encontra-se abaixo de 320 nm, que corresponde ao λ_{em} máximo dos parabenos (**Figura 20**), o espectro da amostra apresenta um deslocamento em seu máximo de emissão. Ainda, a faixa de excitação que compreende a maior intensidade de sinal foi deslocada para λ_{ex}

menores que 258 nm quando comparado ao espectro dos analitos puros (**Figura 20**). Um comportamento similar ocorreu na amostra S6 (**Figura 21 (f)**).

Já nas amostras S2 e S5 (**Figura 21 (b)**) e **21 (e)**), essa maior intensidade de sinal dos interferentes ocorre de modo a se sobrepor com o sinal de intensidade máxima dos parabenos na mesma faixa de excitação da amostra anterior, porém com faixa de emissão de 290–365 nm, também apresentando um deslocamento no λ_{em} da amostra para comprimentos de onda menores que 320 nm. Neste caso, houve um deslocamento da faixa de excitação de maior intensidade para λ_{ex} maiores que 258 nm.

Na amostra S3 (**Figura 21 (c)**), a sobreposição de sinais se dá na faixa de excitação 244–268 nm e emissão de 290–385 nm. Comparado com o perfil dos parabenos representado pelo PP (**Figura 20**), o pico apresenta-se mais alargado e o máximo de emissão aparece deslocado para λ_{em} maior que 320 nm. No modo de excitação, entre 264–268 nm, ocorre ainda o aparecimento de um outro pico relacionado a um interferente desconhecido.

Avaliando o perfil da mostra S4 (**Figura 21 (d)**), também há sobreposição de sinais na faixa de excitação 244–268 nm e na faixa de emissão entre 290–370 nm. Neste caso houve um deslocamento do máximo de emissão para λ_{em} menor que 320 nm comparado ao perfil de PP puro (**Figura 20**).

O espectro da amostra é uma contribuição aditiva de todos os componentes presentes (analitos e interferentes). As contribuições de sinais mais intensas que a dos analitos podem, contudo, ser separadas pelo PARAFAC, e este é capaz de isolar os espectros dos componentes puros, permitindo que a quantificação seja feita utilizando um perfil de parabeno puro. O número de componentes em cada amostra foi estimado pelo parâmetro s_{fit} , que leva em consideração o desvio padrão dos resíduos na modelagem. Além disso, foi realizada a inspeção dos perfis espectrais recuperados. Na **Figura 22** estão dispostos os gráficos de s_{fit} para cada amostra avaliada.

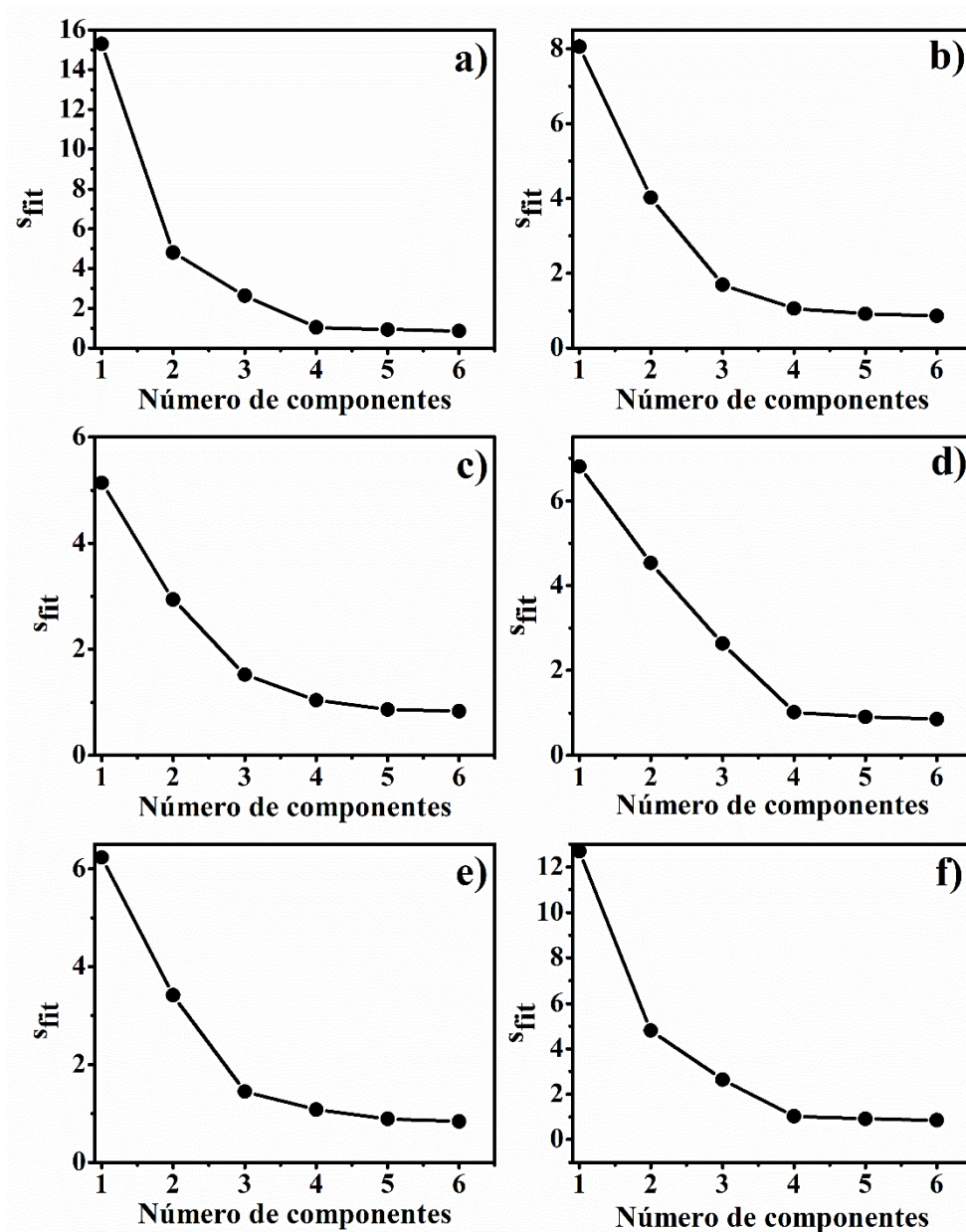


Figura 22- Gráfico do s_{fit} versus o número de componentes para amostras de creme preventivo de assaduras a) S1, b) S2, c) S3, d) S4, e) S5, f) S6. Fonte: autora.

Foram avaliados até seis fatores, analisando tanto o decréscimo do s_{fit} , até que houvesse uma variação mínima, quanto os perfis recuperados com cada número de fatores de modo que o perfil não representasse nenhum sobre ajuste do modelo. A partir do tratamento dos dados realizado com PARAFAC, o número de componentes definido pelo s_{fit} ficou entre 4 e 5 para as amostras comerciais, com os perfis de excitação e de emissão provenientes da deconvolução dos espectros desses componentes variando, devido à diversidade na composição de cada uma. Os modos de excitação e de emissão recuperados são apresentados na **Figura 23**.

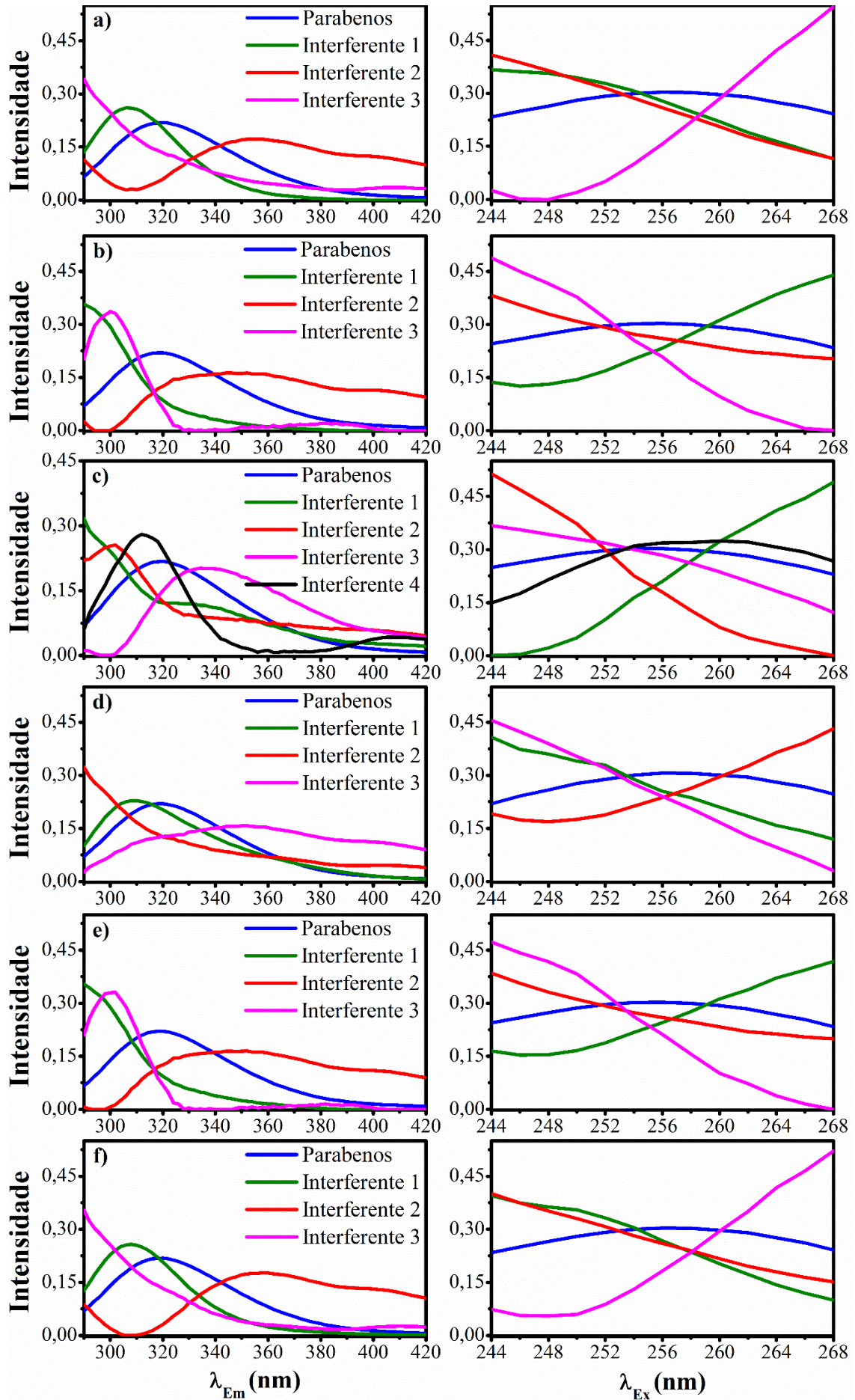


Figura 23- Modos de excitação e de emissão recuperados pelo PARAFAC para as amostras comerciais a) S1, b) S2, c) S3, d) S4, e) S5, f) S6. Fonte: autora.

De fato, ao investigar os espectros recuperados, verificou-se a presença de interferentes distintos. As amostras S1, S2, S4, S5 e S6 (**Figura 23 (a)-(b), (d)-(f)**) apresentaram quatro componentes, enquanto a amostra S3 (**Figura 23 (c)**) apresentou cinco componentes no processo de modelagem. Relacionando o maior número de componentes recuperados da amostra S3 com seu gráfico de contorno (**Figura 21 (c)**), observa-se que há uma possível ligação com a presença do pico associado a um interferente desconhecido na região de excitação entre 264–268 nm. Isso demonstra na prática a vantagem de segunda ordem e reforça a necessidade de modelar uma amostra de cada vez.

Com os perfis separados matematicamente foi possível realizar a quantificação empregando a curva analítica pseudo-univariada construída com soluções de PP. Os resultados obtidos para as seis amostras comerciais estão dispostos na **Tabela 10**.

Tabela 10- Recuperação dos parabenos em amostras de creme preventivo de assaduras utilizando o método proposto.

Amostras	Adicionado	[C] mg g ⁻¹	[C] %m m ⁻¹ (RSD)	%Recuperação
S1	-	1,1	0,11 (0,05)	-
	1	1,8	0,18 (0,04)	94,5
	2	2,3	0,23 (0,00)	83,0
	3	4	0,4 (0,06)	123,0
S2	-	6	0,6 (0,03)	-
	1	16	1,6 (0,05)	124,9
	2	23	2,3 (0,04)	100,3
	3	37	3,7 (0,03)	120,1
S3	-	5	0,5 (0,02)	-
	1	11	1,1 (0,02)	122,4
	2	13	1,3 (0,09)	83,0
	3	22	2,2 (0,06)	111,9
S4	-	3	0,30 (0,04)	-
	1	7	0,7 (0,04)	106,6
	2	11	1,1 (0,03)	124,8
	3	14	1,4 (0,01)	114,6
S5	-	7	0,7 (0,02)	-
	1	15	1,5 (0,03)	89,4
	2	26	2,6 (0,01)	108,7

	3	37	3,7 (0,004)	115,2
	-	1,5	0,15 (0,07)	-
S6	1	3	0,30 (0,07)	111,7
	2	4	0,4 (0,01)	113,6
	3	5	0,5 (0,03)	105,9

Conforme indicado na **Tabela 10**, as taxas de recuperação (Magnusson; Örnemark, 2014) variaram de 83% a 125%, demonstrando a exatidão adequada do método e a aplicação bem-sucedida na determinação do teor de parabenos na presença de interferentes desconhecidos. O teor total de parabenos foi inferior a 0,8% m m⁻¹ em todas as amostras que continham misturas de parabenos, e inferior a 0,4% m m⁻¹ para a amostra S1 (anexo I), em conformidade com a legislação até então aplicável a esses produtos (BRASIL, 2012). No entanto, dentre as amostras estudadas, cinco continham PP e duas continham PP e BP em sua composição (anexo I). Levando em conta a legislação atualizada, os fabricantes precisam se adequar à RDC N° 528 para a produção de novos lotes, porém os lotes já fabricados podem permanecer no mercado até o final de seus prazos de validade (BRASIL, 2021).

4.5 Comparação com outros métodos

A **tabela 11** apresenta a comparação de desempenho do método proposto, micro extração líquido-líquido baseada em solvente eutético profundo associada à espectroscopia de fluorescência de emissão-excitação acoplada ao PARAFAC (DES-LLME-EEFS-PARAFAC), com métodos relatados na literatura para a análise de parabenos em cosméticos.

Tabela 11- Comparação do desempenho de diferentes métodos analíticos destinados a determinar parabenos em amostras de cosméticos.

Analito	Matriz	Método de extração/ solvente	Faixa de calibração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Faixa de recuperação (%)	Método (Referência)
Parabenos totais	creme preventivo de assaduras	LLME/ DES	0.1–1.3	≥ 0.997	0.023	83–125	DES-LLME-EEFS-PARAFAC (este trabalho)
MP, EP, PP, BP	creme dental	LLME/ DES	0.05–10	≥ 0.999	0.01–0.02	79–109	HPLC-VWD (Cao <i>et al.</i> , 2022)
MP, EP, PP, BP	óleos cosméticos	LLME/ DES	0.1–100 ^a	≥ 0.999	0.049–0.064 ^a	84–102	HPLC-UV (Sivrikaya, 2019)
MP, EP, PP, BP etc.	máscara facial	LLE/ metanol	0.5–8 ^a	≥ 0.995	4.96–13.7 ^b	81–118	HPLC-DAD/ATLD
				≥ 0.991	1.48–24.3 ^b	85–115	MCR-ALS (Yin <i>et al.</i> , 2018)
MP, EP, PP, BP	cremes (preventivo de assaduras etc.)	MSPD-SUPRAS-ME supramolecular	0.10–10	≥ 0.999	0.03–0.04	86–102	LC-UV (Yildiz; Çabuk, 2018)
MP, PP, filtros UV	protetor solar	UAE/ acetonitrila	2.2–750.1	0.998	0.066–0.243	98–112	HPLC-DAD MCR-ALS (Vosough <i>et al.</i> , 2017)

HPLC-VWD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de comprimento de onda variável; LC-UV: cromatografia líquida com detector UV; HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos; ATLD: decomposição trilinear alternada; MCR-ALS: resolução de curvas multivariadas com mínimos quadrados alternados; UAE: extração assistida por ultrassom.

^a $\mu\text{g mL}^{-1}$

^b ng mL^{-1}

Todos os métodos apresentados são baseados em cromatografia e, em alguns casos, estão associados a algoritmos bilineares de segunda ordem (Vosough *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2018).

O método proposto se destaca por seu desempenho quando comparado a outros métodos mais laboriosos, que exigem mais etapas no preparo de amostras e uma quantidade maior de solventes tóxicos, além de instrumentação mais complexa. Os resultados demonstram que o método proposto obteve recuperações semelhantes e valores de LOD comparáveis ou ainda menores do que os obtidos por alguns dos métodos relatados na literatura (Cao *et al.*, 2022; Vosough *et al.*, 2017; Yildiz; Çabuk, 2018) .

CONCLUSÃO

Esta tese apresenta uma estratégia DES-LLME-EEFMS-PARAFAC para a determinação do teor de parabenos totais em amostras de creme preventivo de assaduras infantil, na presença de interferentes com perfis sobrepostos com o auxílio de um método de calibração multivariada de segunda ordem, baseado no algoritmo PARAFAC.

O DES produzido a partir de cloreto de colina e etilenoglicol foi sintetizado e caracterizado por FTIR. A extração realizada empregando o solvente sintetizado e a técnica de LLME mostrou ser eficiente, promovendo recuperações satisfatórias com a vantagem de utilizar DES como solvente extrator ambientalmente amigável em um procedimento de extração otimizado por RSM. Ainda, devido à “vantagem de segunda ordem”, não houve necessidade de pré-tratamento para a remoção de interferentes, em concordância com os princípios da química analítica verde.

O método proposto demonstrou ser eficiente na quantificação de parabenos totais a partir de PP, um dos parabenos mais comumente utilizados. A sobreposição espectral com concomitantes desconhecidos foi resolvida pelo PARAFAC. Os valores obtidos de RMSEP e REP foram de 105,2 ng g⁻¹ e 15%, respectivamente, e a faixa de recuperação foi de 83 a 125%. Os resultados foram satisfatórios e comparáveis a outros métodos reportados na literatura, destacando a capacidade do método proposto em determinar com precisão o percentual %m m⁻¹ de parabenos totais em amostras de creme para assaduras e garantir sua conformidade com a legislação.

Entre as amostras comerciais analisadas, todas obedeceram à legislação com teores abaixo de 0,4 % m m⁻¹ e 0,8 % m m⁻¹ de forma individual e para a mistura de parabenos, respectivamente (BRASIL, 2012). Porém, os fabricantes dos produtos regularizados de acordo com a RDC n° 29 precisarão se adequar à RDC n° 528 no ano vigente, e até reformular seus produtos, pois continham PP e BP em suas formulações (BRASIL, 2021).

REFERÊNCIAS

- ABAD-GIL, L. et al. Determination of paraben-, isothiazolinone- and alcohol-type preservatives in personal care products by HPLC with dual (diode-array and fluorescence) detection. **Microchemical Journal**, v. 160, p. 105613, 2021.
- ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, p. 70–71, 2003.
- AKER, A. M. et al. Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women. **Environmental Research**, v. 151, p. 30–37, 2016.
- ALOMAR, M. K. et al. Glycerol-based deep eutectic solvents: Physical properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 98–103, 2016.
- ALTUNAY, A. O.; ELIK, A. A novel sonication assisted dispersive liquid-liquid microextraction method for methylparaben in cosmetic samples using deep eutectic solvent. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 29, p. 100781, 2022.
- ALTUNAY, A. O.; ELIK, A. Investigation of the applicability of fatty acid-based deep eutectic solvent based air assisted liquid liquid microextraction for the rapid determination and extraction of butylparaben in cosmetic products. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 30, p. 100884, 2022.
- ALVAREZ-RIVERA, G. et al. Determination of isothiazolinone preservatives in cosmetics and household products by matrix solid-phase dispersion followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 41–50, 2012.
- AMER, M. et al. Neonatal skin care: what should we do? A four-week follow-up randomized controlled trial at Zagazig University Hospitals. **International Journal of Dermatology**, v. 56, p. 1198–1203, 2017.
- APPELLOF, C. J.; DAVIDSON, E. R. Strategies for analyzing data from video fluorometric monitoring of liquid chromatographic effluents. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 2053–2056, 1981.
- AZZOUZ, A. et al. Determination of free and conjugated forms of endocrine-disrupting chemicals in human biological fluids by GC-MS. **Bioanalysis** v. 8, p. 1145–1158, 2016.

BARANOWSKA, I.; WOJCIECHOWSKA, I. The determination of preservatives in cosmetics and environmental waters by HPLC. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 22, n. 6, p. 1609–1625, 2013.

BARR, L. et al. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 219–232, 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4º ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BŁEDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WASOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. **Environment International**, v. 67, p. 27–42, 2014.

BRASIL. ANVISA – RDC nº 29, de 01 de junho de 2012 – Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3285739/RDC_29_2012_COMP.pdf/2c1f99a1-f815-4063-ba15-94908bb70145>. Acesso em: 09/05/2023.

BRASIL. ANVISA – RDC nº 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 nº 35/20. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-528-de-4-de-agosto-de-2021-337561592>>. Acesso em 10/06/2024.

BRASIL. ANVISA – RDC nº 752, de 19 de setembro de 2022 – Dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5738443/%281%29RDC_752_2022_COMP.pdf/2a23804c-f1af-4bb7-b892-164fdc256e3e>. Acesso em 10/06/2024.

BRO, R. Chemometrics and intelligent laboratory systems Tutorial PARAFAC. Tutorial and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 38, n. 2, p. 149-171, 1997.

BRO, R. PARAFAC. Tutorial and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 38, p. 149–171, 1997.

BROWN, S.; TAULER, R.; WALCZAK, B. **Comprehensive Chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2009. v. 1

CABALEIRO, N. et al. An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 57, p. 34–46, 2014.

CAGLAR, A. et al. A novel Central Composite Design based response surface methodology optimization study for the synthesis of Pd/CNT direct formic acid fuel cell anode catalyst. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 24, p. 11002–11011, 2018.

CAO, J. et al. Effective extraction of parabens from toothpaste by vortex-assisted liquid-phase microextraction based on low viscosity deep eutectic solvent. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107590, 2022.

CARABAJAL, M. et al. Applications of liquid-phase microextraction procedures to complex samples assisted by response surface methodology for optimization. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104436, 2020.

CELEIRO, M. et al. Pressurized liquid extraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of fragrance allergens, musks, phthalates and preservatives in baby wipes. **Journal of Chromatography A**, v. 1384, p. 9–21, 2015.

CHARLES, A.; DARBRE, P. Combinations of parabens at concentrations measured in human breast tissue can increase proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 390–398, 2013.

CHEN, Y. et al. Surface Tension of 50 Deep Eutectic Solvents: Effect of Hydrogen-Bonding Donors, Hydrogen-Bonding Acceptors, Other Solvents, and Temperature. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 28, p. 12741–12750, 2019.

Commission Regulation (EU) N° 1004/2014 of 18 September 2014. Amending Annex V to Regulation (EC) N° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. **Official Journal of the European Union** L 282/5, 2014.

COSTA, W. A. et al. Fractional recovery of oleaginous bioactive produced by *Rhodotorula mucilaginosa* CCT3892 using deep eutectic solvents. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100561, 2020.

COSTA, W. A. et al. Physical–chemical and ecotoxic evaluation of different deep eutectic solvents for green analytical applications. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 70701–70712, 2023.

DALMAZ, A.; SIVRIKAYA ÖZAK, S. S. DES-based vortex-assisted liquid-liquid microextraction procedure developed for the determination of paraben preservatives in mouthwashes. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107445, 2022.

DANTAS, M. S. R. et al. Simultaneous determination of methyl, ethyl, propyl, and butyl parabens in sweetener samples without any previous pretreatment using square wave voltammetry and multiway calibration. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130472, 2021.

DARBRE, P. D.; HARVEY, P. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: A review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 9, p. 925–938, 2014.

DIL, E. A. et al. Simultaneous selective enrichment of methylparaben, propylparaben, and butylparaben from cosmetics samples based on syringe-to-syringe magnetic fluid phase microextraction. **Talanta**, v. 221, p. 121547, 2021.

DUALDE, P. et al. Biomonitoring of parabens in human milk and estimated daily intake for breastfed infants. **Chemosphere**, v. 240, p. 124829, 2020.

FDA. Parabens in Cosmetics. Disponível em: <<https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/parabens-cosmetics>>. Acesso em: 09/06/2024.

FERREIRA, M. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. 1º ed. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para a análise de compostos orgânicos**. 1º ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

FISHER, M. et al. Paraben concentrations in maternal urine and breast milk and its association with personal care product use. **Environmental Science & Technology**. v. 51, p. 4009–4017, 2017.

GABRIELE, F. et al. Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 291, p. 111301, 2019.

GAJARDO-PARRA, N. F. et al. Physicochemical properties of choline chloride-based deep eutectic solvents and excess properties of their pseudo-binary mixtures with 1-butanol. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 133, p. 272–284, 2019.

GE, D. et al. Preparation of a new polymeric deep eutectic solvent and its application in vortex-assisted liquid-liquid microextraction of parabens in foods, cosmetics and pharmaceutical products. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 10, p. 2120–2128, 2020.

GEMPERLINE, P. **Practical Guide to Chemometrics**. 1st ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

GIULIVO, M. et al. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. **Environmental Research**, v. 151, p. 251–264, 2016.

GONÇALVES, R. A.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Otimização e validação de método baseado em QuEChERS para determinação de conservantes em cosméticos por HPLC-DAD. **Química Nova**, v. 43, n. 2, p. 175–180, 2020.

GÜLLE, S. et al. Application of a fabric phase sorptive extraction-high performance liquid chromatography-photodiode array detection method for the trace determination of methyl paraben, propyl paraben and butyl paraben in cosmetic and environmental samples. **Analytical Methods**, v. 11, n. 48, p. 6136–6145, 2019.

HU, L. et al. Maternal paraben exposure and intra-pair thyroid-stimulating hormone difference in twin neonates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 250, p. 114502, 2023.

KASHANI, F. Z.; GHOREISHI, S. M.; KHOABI, A. Experimental and statistical analysis on a nanostructured sensor for determination of p-hydroxybenzoic acid in cosmetics. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, p. 45–55, 2019.

KAUR, R. et al. Trace determination of parabens in cosmetics and personal care products using fabric-phase sorptive extraction and high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 13, p. 2626–2635, 2020.

KAUR, R. et al. Trace determination of parabens in cosmetics and personal care products using fabric-phase sorptive extraction and high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 13, p. 2626–2635, 2020.

KAYA, S. I.; CETINKAYA, A.; OZKAN, S. A. Green analytical chemistry approaches on environmental analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 33, p. e00157, 2022.

KHESINA, Z. B. et al. Microextraction by packed sorbent optimized by statistical design of experiment as an approach to increase the sensitivity and selectivity of HPLC-UV determination of parabens in cosmetics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195, p. 113843, 2021.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. Boston: Springer, 2006.

Li, Q. et al. Revealing the role of hydrogen bonding interactions and supramolecular complexes in lignin dissolution by deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 344, p. 117779, 2021.

LONG, W. J. et al. Interference-free analysis of multi-class preservatives in cosmetic products using alternating trilinear decomposition modeling of liquid chromatography diode array detection data. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105847, 2021.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2nd ed., 2014. Disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em: 15/05/2024.

MATWIEJCZUK, N.; GALICKA, A.; BRZÓSKA, M. M. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 176–210, 2020.

MESKO, M. F. et al. Toxic and potentially toxic elements determination in cosmetics used for make-up : A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1098, p. 1–26, 2020.

MIGLIORATI, V.; SESSA, F.; D'ANGELO, P. Deep eutectic solvents: A structural point of view on the role of the cation. **Chemical Physics Letters**, v. 737S, p. 100001, 2019.

NEZAMI, A. R. et al. Strategies to improve the challenges of classic dispersive liquid-liquid microextraction for determination of the parabens in personal care products-One step closer to green analytical chemistry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1183, p. 122973, 2021.

NOWAK, K. et al. Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 474, p. 238–251, 2018.

OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A. et al. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, n. 1, p. 1–15, 2015.

Official Journal of the European Communities. Official Journal of the European Communities, 1996.

OLIVIERI, A. C. Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 5358–5378, 2014.

OLIVIERI, A. C.; WU, H. L.; YU, R. Q. MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 96, n. 2, p. 246–251, 2009.

OLIVIERI, A.; ESCANDAR, G. **Practical Three-Way Calibration**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2014.

PEÑA, A. M.; GOICOECHEA, H. C.; ESCANDAR, G. M.; OLIVIERI, A. C. **Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2015.

PERIS-DÍAZ, M. D.; KREŽEL, A. A guide to good practice in chemometric methods for vibrational spectroscopy, electrochemistry, and hyphenated mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 135, p. 16157, 2021.

PIMENTEL, M. F.; NETO, M. DE B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. v. 19, p. 1268–277, 1996.

RADOŠEVIĆ, K. et al. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 14188–14196, 2018.

RAJABI, M. et al. Rapid derivatization and extraction of paraben preservatives by fast syringe-assisted liquid-liquid microextraction and their determination in cosmetic and aqueous sample solutions by gas chromatography. **Analytical Methods**, v. 9, n. 41, p. 5963–5969, 2017.

RATHER, J. A.; ABRI, A. A.; KANNAN, P. Electrochemical sensing of parabens in solubilized ionic liquid system at polyaniline decorated gold nanoparticles constructed interface. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105379, 2020.

Regulation (EC) N° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast). **Official Journal of the European Union**. L342/59, 2009.

RENTE, D.; PAIVA, A.; DUARTE, A. R. The role of hydrogen bond donor on the extraction of phenolic compounds from natural matrices using deep eutectic systems. **Molecules** v. 26, p. 2336, 2021.

RITO, P. N. et al. Avaliação dos aspectos do controle da qualidade de produtos cosméticos comercializados no Brasil analisados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 557–565, 2012.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. Analysis of Cosmetic Products: 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2017.

SAMARASINGHE, S. V. A. C. et al. Parabens generate reactive oxygen species in human spermatozoa. **Andrology**, v. 6, n. 4, p. 532–541, 2018.

SANTANA, A. P. R. et al. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111452, 2019.

SANTOS, E. S. et al. **Deep Eutetic Solvents Properties**, Applications and Toxicity. 1st ed. New York: Nova Science Publishers, 2022.

SANTOS, L. B. et al. Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: contribution to green chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 146, p. 116478, 2022.

SHAABAN, H. et al. Development and validation of an eco-friendly SPE-HPLC-MS method for simultaneous determination of selected parabens and bisphenol A in personal care products: Evaluation of the greenness profile of the developed method. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 41, n. 10, p. 621–628, 2018.

SHEN, X. et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for determination of parabens in human breast tumor and peripheral adipose tissue. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1096, p. 48–55, 2018.

SHISHOV, A. et al. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. **Microchemical Journal**, v. 135, p.33–38, 2017.

SIQUEIRA, A. S.; ALMEIDA, L. F.; FRAGOSO, W. D. Determination of anthracene, phenanthrene, and fluorene in tap water and sediment samples by fluorescence spectroscopy on nylon membranes and second-order calibration. **Talanta**, v. 253, p. 124002, 2023.

SIVRIKAYA, S. A novel vortex-assisted liquid phase microextraction method for parabens in cosmetic oil products using deep eutectic solvent. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, n. 15, p. 1575–1585, 2019.

SKOOG, DOUGLAS; HOLLER, F.; NIEMAN, T. Princípios de análise instrumental. São Paulo Bookman, , 2002.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11060–11082, 2014.

BROWN, S. D.; ROMÀ, B. W. **Comprehensive Chemometrics**: chemical and biochemical data analysis. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2009.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics**. 1st ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2008.

VOSOUGH, M. et al. Chemometrics-assisted fast-elution HPLC-DAD for the quantification of selected uv filters and parabens in suncare formulations. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 2, p. 377–386, 2017.

WU, H. L.; WANG, T.; YU, R. Q. Recent advances in chemical multi-way calibration with second-order or higher-order advantages: Multilinear models, algorithms, related issues and applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 130, p. 115954, 2020.

YILDIZ, E.; ÇABUK, H. Miniaturized matrix solid-phase dispersion coupled with supramolecular solvent-based microextraction for the determination of paraben preservatives in cream samples. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 13, p. 2750–2758, 2018.

YILMAZ, P. K.; TOKAT, M. A. Simultaneous determination of six parabens in cosmetic by a new high performance liquid chromatography method with fluorescence detection. **Methods and objects of chemical analysis**, v. 15, n. 1, p. 27–32, 2020.

YIN, X. L. et al. Dealing with overlapped and unaligned chromatographic peaks by second-order multivariate calibration for complex sample analysis: Fast and green quantification of eight selected preservatives in facial masks. **Journal of Chromatography A**, v. 1573, p. 18–27, 2018.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. et al. Determination of parabens in cosmetic products using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Methods**, v. 8, n. 19, p. 3903–3909, 2016.

ZHON, Z; LI, G. Current trends in sample preparation for cosmetic analysis. **Journal of Separation Science**, v. 4, n. 1, p. 152–169, 2017.

ANEXOS

ANEXO I

Amostras comerciais analisadas e suas respectivas composições de acordo com os rótulos.

Amostras	Composição
Isenta	água, lanolina, petrolato líquido, petrolato, pantenol, óleo de amêndoas, cera alba, álcool cetílico, álcool estearílico, ozokerite, oleato de glicerila, álcool de lanolina.
S1	polietileno, petrolato líquido, óxido de zinco, propilenoglicol, metilparabeno, perfume, amil cinamal, álcool cinamílico, citral, citronelol, dextrolimoneno, geraniol, hidroxicitronelal e linalol.
S2	água, petrolato líquido, óxido de zinco, petrolato amarelo, oleato de sorbitana, glicerol, lanolina de polietilenoglicol-75, parafina, cera branca de abelha, óleo de amêndoas, perfume, alantoína, metilparabeno, óleo de soja hidrogenado, óleo de rícino, fenoxietanol, propilparabeno, edetato dissódico, triclosana, linalol, butil-hidroxitolueno, citronelol, cumarina, alfa-isometil ionona, proteína de trigo hidrolisada, hidroxipropillaurdimônio, hexil cinamal, butilparabeno, geraniol, butilfenil metilpropional, etilparabeno, cinamato de benzila, álcool cinamílico, limoneno, benzoato de benzila, álcool benzílico, salicilato de benzila, citral, eugenol, sorbato de potássio, álcool de anis, cinamaldeído, amil cinamal.
S3	cera branca de abelha, brometo de cetrimônio, glicerol, lanolina, álcool de lanolina, butil-hidroxitolueno, metilparabeno, petrolato líquido, propilparabeno, oleato de sorbitana, talco, óxido de zinco, óleo de amêndoas, óleo de semente de girassol, óleo da semente de girassol híbrido, extrato da flor de calêndula, óleo de soja, tocoferol, dimeticonol, decametilciclopentasiloxano, carbômer 340, sesquicaprilato de xilitol, monoestearato de glicerila, cera de candelila, hidróxido de sódio, fragrância, amil cinamal, álcool benzílico, salicilato de benzila, álcool cinamílico, cumarina, hidroxicitronelal, linalol, água.
S4	palmitato de retinol, colecalciferol, óxido de zinco, amido, lanolina, petrolato branco, oleato de sorbitana, essência iff sce, água de osmose reversa, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol e petrolato líquido.
S5	água, petrolato líquido, óxido de zinco, petrolato amarelo, oleato de sorbitana, glicerol, lanolina de polietilenoglicol-75, parafina, cera branca de abelha, óleo de amêndoas, perfume, alantoína, metilparabeno, óleo de soja hidrogenado, óleo de rícino, fenoxietanol, propilparabeno, edetato dissódico, triclosana, linalol, butil-hidroxitolueno, citronelol, cumarina, alfa-isometil ionona, proteína de trigo hidrolisada, hidroxipropillaurdimônio, hexil cinamal, butilparabeno, geraniol, butilfenil metilpropional, etilparabeno, cinamato de benzila, álcool cinamílico, limoneno, benzoato de benzila, álcool benzílico, salicilato de benzila, citral, eugenol, sorbato de potássio, álcool de anis, cinamaldeído, amil cinamal.
S6	polietileno, petrolato líquido, óxido de zinco, propilenoglicol, metilparabeno, perfume, amil cinamal, álcool cinamílico, citral, citronelol, dextrolimoneno, geraniol, hidroxicitronelal e linalol.

ANEXO II

Artigo Publicado em Periódico Internacional (Oriundo da Tese):

Microchemical Journal 193 (2023) 109128



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

Liquid-liquid microextraction method using a deep eutectic solvent for the determination of total paraben content by fluorescence spectroscopy and second-order calibration

Daniella Iris Oliveira Silva, Alcides Silva Siqueira, Willyan Araújo da Costa, Liliana F. B. L. Pontes, Wallace Duarte Fragoso, Márcio José Coelho Pontes*

Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa-Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Parabens

DES

Fluorescence spectroscopy

Diaper rash cream

PARAFAC

ABSTRACT

Concerns regarding the potential harm associated with endocrine dysfunction are increasing, particularly in children, due to the immaturity of their metabolic system and skin barrier. In this work, parabens, which are esters widely used as preservatives in cosmetics, were quantified in commercial samples of diaper rash cream. For this purpose, a green and efficient liquid-liquid microextraction (LLME) method was accomplished using a deep eutectic solvent (DES). To enhance recovery rates, the extraction parameters were optimized using a central composite design (CCD) on blank matrix samples spiked. The quantification was based on excitation-emission fluorescence spectroscopy, combined with parallel factor analysis (PARAFAC) decomposition, which proved to be an advantageous tool to solve the overlap of uncalibrated constituents in the complex matrix. The PARAFAC modeling strategy provided satisfactory results within a linear range response of 100–1300 ng g⁻¹, with LOD equal to 23 ng g⁻¹. A validation set, with various proportions of methyl, ethyl, propyl, and butyl paraben standards, was used to validate the calibration model, resulting in root mean square error (RMSE) and relative error of prediction (REP) values of 32 ng g⁻¹ and 4.5%, respectively. Moreover, acceptable root mean square error of prediction (RMSEP) and REP values (105 ng g⁻¹ and 15%, respectively) were obtained, when a set of blank matrix samples spiked was applied. The proposed method was successfully applied to quantify total paraben content in commercial samples of diaper rash cream, yielding recoveries ranging from 83% to 125%. The method proved to be sensitive, accurate, and green, as it significantly reduced the consumption of organic solvents. Furthermore, it could serve as an alternative for the determination of preservatives in complex cosmetic samples.

1. Introduction

Nowadays, the usage of cosmetics for personal care is increasing among the population, leading to a concomitant increase in exposure to substances considered potentially endocrine disrupting [1]. The endocrine-disrupting chemicals (EDCs) are substances that cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, by disrupting endocrine functions [2].

One well-known group of related substances widely used in cosmetics as preservatives is the parabens class, due to their broad antimicrobial spectrum, chemical and thermal stability, low cost, and lack of impact on product consistency [3,4]. These preservatives are synthetic

esters derived from the esterification of p-hydroxybenzoic acid with an appropriate alcohol in the presence of a catalyst. Among them, the most commonly used are methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), and butylparaben (BP) [3,4].

Parabens mimic estrogen in the body and the mimetic effect increases proportionally to the size of the alkyl chain, as well as with the presence of branching and aromatic rings in their chemical structure [1,5]. Although they have traditionally been considered low toxicity compounds, concerns about the potential impacts of parabens on human health have been growing [6]. Several studies have linked parabens to adverse effects such as breast cancer, oxidative stress induction in human spermatozoa, and disruption of thyroid function [1,5,7–12].

* Corresponding author at: Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Química – Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/Quimiometria (LAQA), CEP 58051-970 – João Pessoa, PB, Brazil.

E-mail address: marciocoelho@quimica.ufpb.br (M. José Coelho Pontes).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109128>

Received 14 June 2023; Received in revised form 18 July 2023; Accepted 23 July 2023

Available online 25 July 2023

0026-265X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.