AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) NO PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE N-NITROSAMINAS EM ÁGUA TERMAL COSMÉTICA

Palavras-Chave: N-NITROSAMINAS, ÁGUA TERMAL COSMÉTICA, CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL

Autores(as):

AMANDA CARBONERA DE MORAES - IQ

Profª. Drª. SUSANNE RATH (orientadora) - IQ

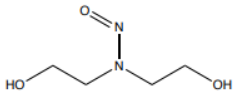
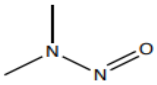
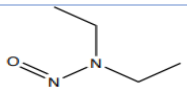
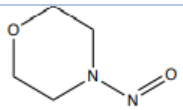
MSc MARIA FERNANDA ARAUJO VIEIRA MATOS (coorientadora) - IQ

INTRODUÇÃO:

As N-nitrosaminas são compostos reconhecidos por suas propriedades cancerígenas, mutagênicas e teratogênicas, formadas a partir da reação entre aminas primárias ou secundárias e um agente nitrosante (*e.g.*, nitrito). A presença desses compostos tem sido constatada em diferentes produtos, incluindo medicamentos, cosméticos, bebidas, alimentos, água, entre outros [1], [2]. A água termal cosmética embora seja um produto a base de água, pode conter em sua composição diferentes ingredientes adicionais. Alguns desses componentes podem representar potenciais fontes de contaminação por N-nitrosaminas, especialmente quando há a presença de aminas e agentes nitrosantes na formulação. Devido à grande diversidade de possíveis matérias primas nesses produtos e do risco associado, torna-se essencial o monitoramento da presença dessas substâncias nas formulações de água cosmética termal [3].

O objetivo do trabalho foi desenvolver um método para determinação de N-nitrosaminas em água termal cosmética, utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) no preparo das amostras e a cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrometria de massas (LC-LC-MS/MS) para realizar a quantificação dos compostos. Na Tabela 1, as N-nitrosaminas que foram objetos de estudo estão apresentadas. A DLLME é um procedimento de preparo de amostras que consiste em injetar rapidamente uma mistura de solventes extrator e dispersante em uma amostra aquosa contendo os analitos, formando gotículas emulsionadas dispersas na amostra e resultando na criação de uma grande área de superfície entre os solventes. Isso favorece a transferência dos analitos para a fase orgânica extratora. Após uma centrifugação, a fase extratora é separada e concentrada para posterior análise instrumental [4], [5].

Tabela 1: Estrutura química e propriedades físico-química das N-nitrosaminas avaliadas neste trabalho.

Nome - Sinônimo (Abreviação)	Fórmula Molecular	Estrutura Química	Massa Molar (g mol^{-1})	Pressão de vapor, mm de Hg (T)	Log P
N-nitrosodiettanolamina (NDELA)	$C_4H_{10}N_2O_3$		134,13	0,0005 (20 °C)	-1,28
N-nitrosodimetilamina (NDMA)	$C_2H_6N_2O$		74,08	2,7 (20 °C)	-0,57
N-nitrosodietilamina (NDEA)	$C_4H_{10}N_2O$		102,14	0,86 (20 °C)	0,48
N-nitrosomorfolina (NMOR)	$C_4H_8N_2O_2$		116,12	0,036 (20 °C)	-0,44

METODOLOGIA:

O preparo de amostra constituiu na transferência de 4,3 mL de amostra para um tubo Falcon de 15 mL, e adição de 200 µL da solução mistura dos padrões deuterados (NDELA-d8, NDMA-d6, NDEA-d10 e NMOR-d4) de 500 ng/mL (concentração nominal de 100 ng/mL NDELA-d8 e 100 da NDMA-d6, NDEA-d10 e NMOR-d4). Em seguida, a mistura de solventes (extrator e dispersante) foi injetada rapidamente na amostra, a qual foi agitada no vórtex por 30 s e centrifugada a 4186 *g* durante 5 min. No presente trabalho, o diclorometano foi empregado como solvente extrator. Como solvente dispersante foi avaliado o uso de acetona, metanol e acetonitrila. Para o diclorometano, foram testados volumes entre 100 µL e 500 µL. Já para os solventes dispersantes, os volumes avaliados variaram de 500 µL a 2000 µL. Foram realizadas duas preparações distintas: uma utilizando água purificada em sistema *Milli-Q*, empregada para a avaliação dos solventes extrator e dispersante, e outra após seleção dos solventes e otimização do método, utilizando amostras de água termal cosmética.

Após a centrifugação, a fase orgânica inferior foi coletada com uma seringa Hamilton de 250 µL e transferida para um tubo Falcon de 15 mL contendo 50 µL de metanol. Devido à incompatibilidade dos solventes com o sistema cromatográfico, esses solventes foram evaporados até quase secura (resíduo de aproximadamente 50 µL) no concentrador rotativo à pressão reduzida nas seguintes condições: temperatura 35 °C, pressão de 450 mBar e rotação de 750 rpm, durante aproximadamente 30 min. Por fim, o extrato foi reconstituído em 1 mL de água, filtrado em filtro de seringa 0,22 µm para um vial e analisado por LC-LC-MS/MS. A curva analítica foi construída em água, utilizando diferentes faixas de concentração para cada grupo de compostos: de 5 a 25 ng/mL para a mistura de N-nitrosaminas (exceto NDELA), de 25 a 45 ng/mL para NDELA, 15 ng/mL para a mistura dos padrões deuterados (exceto NDELA-d8) e 120 ng/mL para NDELA-d8.

Para o desenvolvimento do método foi empregada a LC-LC-MS/MS. A separação cromatográfica foi realizada em duas dimensões (^{2}D) utilizando o modo *heart-cut*. Na primeira dimensão (^{1}D) foi realizado

o *clean-up* da matriz e selecionada a fração contendo os analitos de interesse. Na segunda dimensão (^{2}D) essa fração foi então submetida à separação dos analitos. Os analitos foram ionizados usando uma fonte APCI operando no modo positivo. A quantificação no espectrômetro de massas foi realizada no modo de reações selecionadas (SRM), usando para cada analito uma transição *m/z* para quantificação e outra para confirmação de identidade.

As curvas analíticas de padronização interna apresentaram um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9931 a 0,9993 para os analitos alvos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para otimização do preparo das amostras foram considerados as áreas e os formatos de picos cromatográficos e a eficiência de extração dos analitos. No procedimento DLLME, ao utilizar 100 µL de diclorometano não houve separação de fases, impossibilitando a coleta da fase orgânica. O uso de metanol (Figura 1A) como solvente dispersante resultou em menores áreas dos picos cromatográficos e deformação dos picos, além disso, impossibilitou a extração da NDELA. Embora a acetonitrila (Figura 1B) e a acetona (Figura 1C) tenham produzido áreas de picos semelhantes, houve uma maior deformação nos formatos dos picos cromatográficos com o uso da acetonitrila. Além disso, a evaporação da acetonitrila foi consideravelmente mais lenta (2 horas), em comparação à acetona (30 min).

O uso de 500 µL de diclorometano como solvente extrator e 2000 µL de acetona como dispersante apresentou os melhores resultados em termos de formatos e áreas dos picos cromatográficos, assim como na recuperação dos analitos, sendo a condição adotada para utilizar no preparo das amostras. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 2.

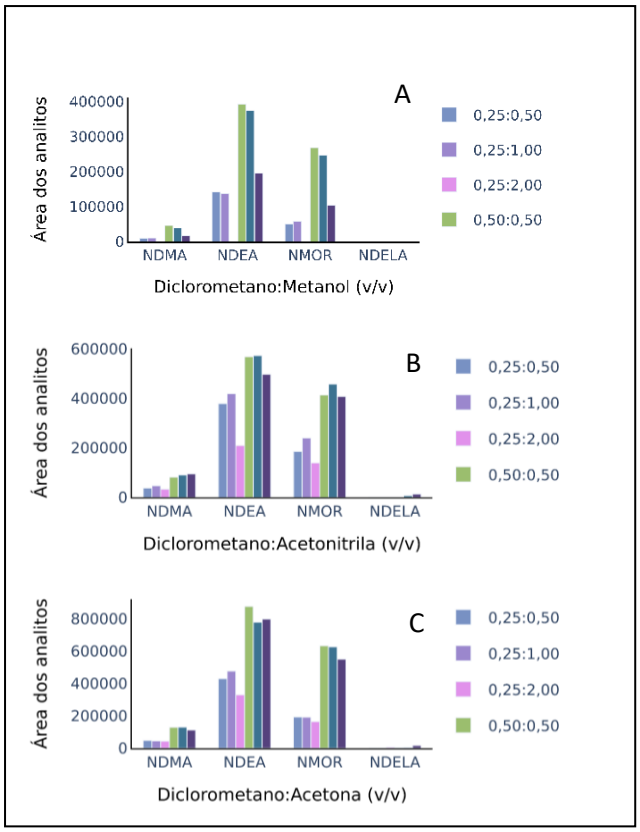


Figura 1: Áreas dos analitos em função do solvente dispersante utilizado. (A) metanol, (B) acetonitrila e (C) acetona.

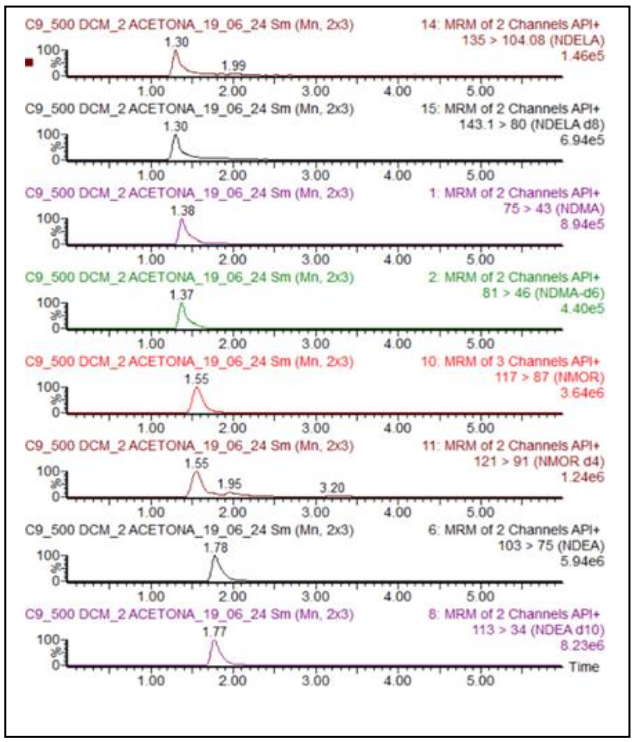


Figura 2: Cromatogramas extraídos da NDELA, NDELA-d8, NDMA, NDMA-d6, NMOR, NMOR-d4, NDEA e NDEA-d10, todas na concentração de 100 ng/mL. Solvente extrator: 500 µL de diclorometano e solvente dispersante: 2000 µL de acetona no preparo de amostras.

Após definir os volumes dos solventes dispersor (2000 µL de acetona) e extrator (500 µL de diclorometano), foi desenvolvido e validado o método de quantificação e avaliado o limite de quantificação dos analitos (LOQ), os quais foram: NDELA (25 ng/mL), NDMA, NMOR e NDEA (5 ng/mL).

O método desenvolvido foi empregado na análise de 12 amostras de águas termais cosméticas (9 diferentes fabricantes). As amostras foram adquiridas no comércio de Campinas no ano de 2024.

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença das N-nitrosaminas em estudo acima do LOQ do método. Sendo assim, para avaliar a exatidão do método proposto, as amostras foram fortificadas no nível do LOQ, NDELA (25 ng/mL), NDMA, NMOR e NDEA (5 ng/mL), utilizando 120 ng/mL de NDELA-d8 e 15 ng/mL de NDMA-d6, NMOR-d4, e NDEA10. A exatidão, avaliada mediante o teste de recuperação (%), para cada analito nas 12 amostras estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de recuperação médios (n=2) obtidos das águas termais cosméticas ± desvio médio.

Exatidão (%)				
Amostra	NDELA	NDMA	NDEA	NMOR
A	<LOQ	<LOQ	<LOQ	112 ± 4
B	136 ± 22	104 ± 1	104 ± 1	119 ± 64
C	<LOQ	104 ± 10	104 ± 10	96 ± 23
D	187 ± 18	89 ± 9	89 ± 9	120 ± 17
E	165 ± 9	98 ± 4	98 ± 4	102 ± 1
F	118 ± 3	99 ± 0	99 ± 0	106 ± 5
G	178 ± 8	95 ± 2	95 ± 2	136 ± 4
H	128 ± 11	105 ± 8	105 ± 8	105 ± 4
I	117 ± 5	116 ± 6	116 ± 6	110 ± 2
J	117 ± 9	101 ± 6	101 ± 6	106 ± 5
K	117 ± 6	63 ± 3	63 ± 3	116 ± 9
L	118 ± 11	91 ± 4	91 ± 4	<LOQ

LOQ: NDELA (25 ng/mL), NDMA, NMOR e NDEA (5 ng/mL)

Os resultados indicam que tanto a matriz da amostra quanto a polaridade das N-nitrosaminas influenciaram significativamente o desempenho do método. A NDELA, o analito mais polar da série, não apresentou níveis de recuperação aceitáveis nas amostras A, B, D, E e G, possivelmente devido à interferência de componentes polares da matriz. A NDMA e a NDEA de caráter mais apolar exibiram comportamentos semelhantes, com exatidão aceitável na maioria das amostras, exceto nas amostras A e K. Já a NMOR, não apresentou exatidão satisfatória nas amostras G e L.

CONCLUSÕES:

O uso da DLLME na extração de N-nitrosaminas de amostras aquosas ainda tem sido pouco explorado em comparação a outros procedimentos consolidados, como a extração em fase sólida (SPE). No entanto, por ser menos laboriosa e demandar menor volume de solventes, a DLLME, quando associada à cromatografia bidimensional, demonstrou resultados promissores na análise de amostras de água termal cosmética. As recuperações em amostras reais foram, em sua maioria, satisfatórias, embora os dados evidenciem a elevada complexidade das matrizes cosméticas. Essa complexidade se reflete na variabilidade dos resultados obtidos, tanto entre diferentes produtos quanto entre os analitos avaliados, indicando a influência direta da composição da matriz no desempenho da extração.

BIBLIOGRAFIA

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

[2] SCHETTINO, L.; BENEDÉ, J.L.; CHISVERT, A. Determination of nine prohibited N-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction prior to gas chromatography-mass spectrometry. **RSC advances**, v. 13, n. 5, p. 2963-2971, 2023.

[3] MATOS, M.F.A.V. *et al.* Monitoring N-Nitrosamines in Cosmetic Thermal Waters: Analytical Method Development, Validation, and Market Analysis in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2025.

[4] CAMPANHARO, S.C. **Desenvolvimento de método analítico envolvendo QuEChERS modificado e DLLME para a determinação de resíduos de eritromicina em peixe por LC MS/MS**. Mestrado em Medicamentos e Cosméticos—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 14 jun. 2021.

[5] REZAEE, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, maio 2006.