DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE TRICLOSAN E TRICLOCARBAN

Denise Santinon (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Patrícia Los Weinert (Orientador), e-mail: patilos@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química-Bacharelado em Química Tecnológica

Química Analítica, Instrumentação analítica

Palavras-chave: Triclosan, Triclocarban, CLAE, planejamento de experimentos.

Resumo

Triclosan e triclocarban são utilizados como antibactericidas em produtos de higiene pessoal e cosméticos. Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método para a análise destes analitos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A otimização foi realizada utilizando a ferramenta de planejamento de experimentos. As condições encontradas como as melhores para a separação e quantificação dos analitos triclosan e triclocarban foram: FM de MeOH:H_2O (80:20), coluna de 25 cm, fluxo de 0,8 mL min^{-1} e temperatura da coluna de 40 ºC. O método foi validado avaliando-se os parâmetros: linearidade, exatidão, precisão, repetibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e porcentagem de recuperação conforme previsto pela ANVISA. O método foi aplicado para análise de amostras de produtos que continham Triclosan e triclocarban obtendo-se bons resultados.

Introdução

Produtos de higiene pessoal tais como sabonetes, pasta de dentes, enxaguatórios bucais, normalmente, contém entre 0,1 a 1% (v/v) de triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, em sua formulação (MOYO, 2015). No Brasil, de acordo com a resolução RDC nº 29 de 2012 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (ANVISA, 2012) a máxima concentração permitida de triclosan a ser adicionada na composição de produtos de higiene pessoal é de 0,3%. Outro antibactericida normalmente usado é o triclocarban (1-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea) eficaz contra bactérias gram-positivas, possui efeitos semelhantes ao triclosan como bioacumulação, devido estar presente em ambientes aquáticos, que é inserido na cadeia alimentar, e efeitos hormonais (LUCIO,2015). Segundo a ANVISA este composto pode ser utilizado em produtos de higiene pessoal que são enxaguados e sua concentração máxima permitida é 1,5% (ANVISA, 2012).
Dentro deste contexto há necessidade do monitoramento das quantidades de TCS (triclosan) e TCB (triclocarban) em formulações uma vez que o uso de forma indiscriminada e não controlada em diversos produtos e o descarte sem o devido tratamento pode causar sérios danos ao meio ambiente e a saúde da população pelo desenvolvimento de micro-organismos resistentes. Há necessidade de metodologias analíticas que possibilitem a quantificação apropriada de TCS e TCB, simples de realizar, que consiga distinguir os dois analitos e que sejam rápidas, gerem menos resíduos e utilizem reagentes ambientalmente mais seguros.

Materiais e Métodos

Materiais e Equipamentos utilizados no desenvolvimento do método de CLAE

Todos os reagentes e solventes utilizados no trabalho foram de grau HPLC. O Equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu equipado com unidades de bombeamento de solventes LC-20AT, auto-injetor SIL-20A HT, forno de colunas CTO-20A, detector de rede de fotodiodos SPD-M20A e controlador do sistema CBM-20A e software LCsolution. Para a separação foram utilizadas colunas Shimadzu C-18 Shim-pack VP-ODS de 2 dimensões (150 mm x 4.6 e de 250 mm x 4.6).

Preparo das soluções padrão de TCS e TCB para o método CLAE

Para a preparação da solução estoque de 1,0 mg mL^{-1}, foi pesado 100,0 mg de TCS ou de TCB e dilui-se com metanol e transferiu-se para um balão de 100,0 mL. Então filtrou-se a solução com um filtro de 25 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm e transferiu-se para um frasco âmbar o qual foi mantido sob refrigeração. Soluções de trabalho foram adequadamente preparadas diariamente a partir da diluição de aliquotas da solução estoque com a própria fase móvel da análise.

Análise das amostras

As amostras de produtos de higiene pessoal (pasta de dente, desodorante em creme (para pés e axilas) e creme corporal) foram adquiridas no comércio local e analisadas pelo método proposto.

Para a análise das amostras de produtos de higiene pessoal, soluções de concentração aproximadamente 12 µg mL^{-1}. A solução da amostra foi então diluída com a própria fase móvel de modo a obter uma solução de concentração de 5 µg mL^{-1}, filtrada em filtro de diâmetro de poro de 0,45 µm, transferidas para os vials e analisadas de acordo com as condições que foram otimizadas e a partir da curva analítica.

Resultados e Discussão

A metodologia proposta envolve a separação cromatográfica simultânea de TCS e TCB utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV. Neste sentido para o desenvolvimento do método analítico proposto, algumas condições cromatográficas foram testadas para verificar quais eram as mais promissoras, para então otimiza-las utilizando ferramentas quimiométricas. Nestes experimentos foram avaliados a dimensão da coluna cromatográfica, a proporção dos solventes metanol (MEOH), acetonitrila (ACN) e H_2O ultra pura na composição da fase móvel (FM), o volume de injeção e o fluxo da fase móvel. Para todos os experimentos (10 no total) a temperatura da coluna foi mantida fixa em 40°C, e as soluções de TCS e TCB injetadas foram adequadamente diluídas na composição da fase móvel do teste para uma concentração final de 20 µg mL^{-1}. A partir destes resultados preliminares e com objetivo de encontrar uma condição experimental que apresentasse separação adequada com o menor tempo de retenção possível, um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para estudar a influência da Temperatura, composição da fase móvel, fluxo e dimensão da coluna. Os resultados obtidos no planejamento foram tratados no programa Statistica®.

Foram monitorados como resposta vários parâmetros considerados importantes no desenvolvimento de métodos cromatográficos: a área para ambos os analitos (TCS e TCB), altura do pico para ambos os compostos, a resolução dos picos e separação dos picos. Para cada uma das respostas monitoradas foram obtidos os modelos matemáticos e os mesmos foram avaliados individualmente por meio da ANOVA com nível de confiança de 95%. Os efeitos estimados para as variáveis analisadas

demonstraram que a melhor condição experimental não é facilmente encontrada considerando cada uma das respostas isoladamente, dificultando a interpretação dos resultados. Para que exista um equilíbrio entre as condições experimentais para os fatores analisados, utilizou-se uma função global para otimizá-las, de modo que foi possível obter indicações a respeito da melhor região experimental. Neste sentido aplicou-se a função desejabilidade de Derringer e Suich para avaliar todas as respostas analisadas simultaneamente, maximizando a um único valor, chamado de desejabilidade global. Os resultados permitiram definir e fixar a fase móvel MeOH:H_2O 80:20 e o uso da coluna de 250 mm. As variáveis temperatura e fluxo foram então otimizadas utilizando um planejamento composto central.

Ao analisar os dados obtidos no planejamento composto central e considerando as mesmas respostas já avaliadas no primeiro estudo constatou-se que as respostas Resolução e Separação apresentaram em todos os experimentos valores superiores aos aceitáveis para fins quantitativos e puderam ser desconsideradas na análise final para obtenção da função desejabilidade global que foi de 0,98.

Com os resultados deste planejamento a superfície de resposta foi obtida, a partir da qual determinou-se que as melhores condições experimentais seriam utilizar o fluxo de 0,8 mL min^{-1} e a temperatura da coluna de 40 ºC. Após ter o método otimizado, um experimento de verificação foi realizado e o cromatograma obtido está apresentado na Figura 1.

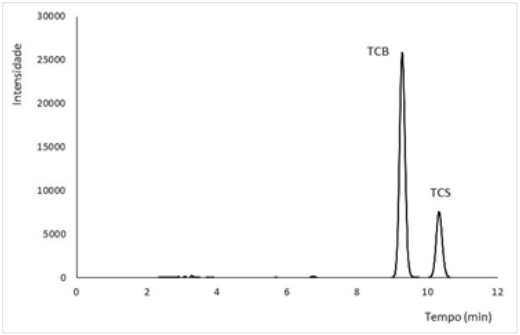


Figura 1- Cromatograma obtido para a separação de TCB e TCS utilizando a condição otimizada.

Com a condição experimental otimizada foram construídas curvas analíticas para os dois compostos e determinou-se que uma relação linear foi obtida para ambos os compostos em concentrações de 0,05 mg L^{-1} – 10,0 mg L^{-1}, com coeficiente de correlação r= 0,999. Para validação da metodologia proposta foram avaliadas algumas figuras de mérito e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Principais figuras de mérito avaliadas para o método cromatográfico proposto para a determinação de triclosan e triclocarban

Parâmetro	**Triclosan**	**Triclocarban**
Linearidade	0,5 a 10 mg mL^{-1}	0,2 a 10 mg mL^{-1}
Equação da reta	y = 21207x - 609,51	y = 36173x - 2642,2
Coeficiente de correlação (r)	1	0,9939
Limite de Detecção	0,06 mg mL^{-1}	0,01 mg mL^{-1}
Limite de Quantificação	0,20 mg mL^{-1}	0,1 mg mL^{-1}
Precisão intermediária (5,0 mg mL^{-1})	1,90% (4 dias; 2 analistas, n=6)	1,78% (4 dias; 2 analistas, n=6)
Precisão intradia (5,0 mg mL^{-1})	2,12 % (n=6)	2,34 % (n=6)
Exatidão	99,3 – 104,0 %	98,0 – 103,6 %

A especificidade e exatidão podem ser avaliados por meio de teste adição de padrão e recuperação. Para avaliar as taxas de recuperação, a partir de quantidades conhecidas e adicionadas as amostras pré-analisadas contendo o equivalente a 1,5 mg L^{-1}. As médias porcentuais de recuperação de TCS encontram-se entre 99,3 – 104,0 % e de 98,0 103,6% para o TCB, evidenciando novamente a boa exatidão do método proposto.
O método proposto foi aplicado na determinação da porcentagem de TCS em oito amostras e o TCB em uma amostra. No Brasil a porcentagem máxima permitida de TCS em produtos de higiene pessoal é de 0,3%, e de acordo com os resultados obtidos na aplicação do método proposto as porcentagens encontradas de triclosan estão dentro da margem estabelecida. Para o TCB é recomendado pela ANVISA que se for adicionado a produtos que serão enxaguados como é o caso dos sabonetes em barra a porcentagem máxima permitida é de 1,5% e no caso de ser adicionado a produtos cosméticos sem enxague essa quantidade cai para 0,2%. A amostra analisada foi sabonete em barra que segundo o rótulo continha TCB em sua composição e o valor encontrado foi de 1,39%, valor este abaixo do máximo permitido, portanto atende as recomendações da ANVISA.

Conclusões

Estudou-se a separação de triclosan e triclocarban simultaneamente através da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV, para isto avaliou-se os parâmetros: dimensão da coluna cromatográfica, a proporção dos solventes metanol (MEOH), acetonitrila (ACN) e H_2O ultra pura na composição da fase móvel (FM), o volume de injeção e o fluxo da fase móvel. Fixou-se a FM de MeOH:H_2O (80:20), a coluna de 25 cm, o fluxo de 0,8 mL min^{-1} e a temperatura da coluna de 40 ºC. assim foi alcançada uma boa separação dos picos, e estudou-se a relação linear das curvas obtidas. Os valores encontrados nas amostras estão dentro dos valores permitidos pela ANVISA, assim pode-se comprovar que este método é linear, exato, preciso, reprodutível, determina o limite de detecção, o limite de quantificação e a porcentagem de recuperação.

Agradecimentos

A Fundação Araucária e UEPG ao investimento financeiro, ao LABMU pela disponibilidade do equipamento.

Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; RDC no 29, de 01/06/2012: Lista de substâncias de Ação Conservante permitidas para produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, Ministério da Saúde: Brasil, 2012.
LÚCIO, Maria Mônica Lacerda Martins. Determinação voltamétrica de triclocarban e carbendazim em produtos de higiene pessoal e água potável. 2015. 97 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.
Moyo, M.; Florence, L. R.; Okonkwo, J. O.; Sensor Actuat. B-Chem. 2015, 209, 898.
Song, Z.; Wang, N.; zhu, L.; huang, A.; Zhao, X.; Tang, H.; Chem. Eng. J. 2012, 198, 379.