

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Ana Lúcia Ribeiro de Barros

ANÁLISE DE FORMALDEÍDO EM PRODUTOS CAPILARES: OTIMIZAÇÃO E
FAIXA LINEAR DO MÉTODO ANALÍTICO EMPREGADO NO CONTROLE DA
QUALIDADE DOS PRODUTOS SUJEITOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA.

Rio de Janeiro

2015

Ana Lúcia Ribeiro de Barros

ANÁLISE DE FORMALDEÍDO EM PRODUTOS CAPILARES: OTIMIZAÇÃO E
FAIXA LINEAR DO MÉTODO ANALÍTICO EMPREGADO NO CONTROLE DA
QUALIDADE DOS PRODUTOS SUJEITOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA.

Trabalho de conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Helena Pereira da Silva Zamith
Sônia Ribeiro Doria

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Barros, Ana Lúcia Ribeiro

Análise de formaldeído em produtos capilares: otimização e faixa linear do método analítico empregado no controle da qualidade dos produtos sujeitos à vigilância sanitária. / Ana Lúcia Ribeiro de Barros. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015

75 f., il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith, Sônia Ribeiro Dias

1. Formaldeído. 2. CLAE. 3. Otimização. 4. Produtos capilares. I.Título.

Ana Lúcia Ribeiro de Barros

ANÁLISE DE FORMALDEÍDO EM PRODUTOS CAPILARES: OTIMIZAÇÃO E
FAIXA LINEAR DO MÉTODO ANALÍTICO EMPREGADO NO CONTROLE DA
QUALIDADE DOS PRODUTOS SUJEITOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA.

Trabalho de conclusão de Curso de
Especialização apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em
Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como
requisito parcial para obtenção do título de
Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 05 de Outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marco Antônio Mota da Silva (Doutor)
Universidade Estadual da Zona Oeste

Adriana Sant'ana da Silva (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Sônia Ribeiro Doria (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

À Deus que não se deixa ganhar em generosidade.

À minha mãe, Luciana Maria Ribeiro de Barros, por ser incansável nas demonstrações de amor e carinho.

Às minhas irmãs, Patrícia Ribeiro de Barros e Renata Ribeiro de Barros, pelo apoio e motivações em todos os momentos.

Às orientadoras Helena Pereira da Silva Zamith e Sônia Ribeiro Doria pela ajuda, pela atenção e por aceitarem esse desafio.

À responsável do Laboratório de Cosméticos e Saneantes, Adriana Sant'Ana, que autorizou e incentivou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Leonardo Lopes, Maria Pasionaria Blanco e Luciana Almeida que juntos formamos uma grande equipe.

Aos amigos do Setor de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aos funcionários da Biblioteca, Alexandre, Janaína e Vinícius, pela ajuda e disponibilidade.

Aos amigos pelas orações, palavras de incentivo e momentos de convivência que fizeram toda a diferença.

RESUMO

A utilização de formaldeído (FA) como alisante em produtos cosméticos capilares é proibido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sendo somente permitido o seu uso como conservante na concentração máxima de 0,2%. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético (ABIHPEC), o Brasil ocupa o segundo lugar em consumo de produtos capilares. O FA foi classificado, em 2006, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) no Grupo 1, como carcinógeno em humanos, a partir de suficientes evidências de indução de câncer de nasofaringe em humanos e como causador também de leucemia a partir de 2012. Objetivando o futuro controle da qualidade destes produtos foram determinados os parâmetros para a otimização do método de análise para identificação e quantificação de FA em produtos cosméticos capilares através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na CLAE empregou-se coluna de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C₁₈) e como fase móvel a solução de metanol em água 70% (v/v). As condições cromatográficas foram: coluna com 4 mm de diâmetro interno, 250 mm de comprimento e 5 µm de tamanho de partícula, à temperatura ambiente (faixa de 21° à 25° C), fluxo da fase móvel 1 mL/min. e comprimento de onda de 345 nm. O método para análise de FA em produtos capilares através da reação de derivatização com solução 0,1% de 2,4-dinitrofenilhidrazina em ácido clorídrico 0,5 N, empregando o tampão citrato foi otimizado. Foram determinados o pH ideal da reação (4,5) bem como o tempo da reação (2 min.). A faixa de trabalho foi definida de $(7,38 \times 10^{-4})$ % m/v a $(5,17 \times 10^{-3})$ % m/v e considerada linear. O produto formado, 2,4-dinitrofenilhidrazona, manteve-se estável até 90 min. quando protegido e quando exposto à luz em 100% e 67%, respectivamente, dos ensaios realizados. Na análise de um produto capilar (máscara) foi detectado FA no qual não se declarava a sua presença. O método mostrou, portanto, ser eficiente na faixa de trabalho estudada na amostra testada.

Palavras-chave: Formaldeído. CLAE. Otimização. Produtos Capilares.

ABSTRACT

The use of formaldehyde (FA) as a straightening product for hair care is forbidden by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA); its use is only allowed as a preservative in the maximum concentration of 0.2%. According to the Brazilian Industry Association of Personal Hygiene, Perfumery and Cosmetics (ABIHPEC), Brazil ranks second in the consumption of hair care products in the world. In 2006, FA was categorized in Group 1, by the *International Agency for Research on Cancer* (IARC), as a carcinogen to humans, based on sufficient evidence of nasopharyngeal cancer induction in humans, but also as the cause of leukemia as from 2012. Aiming at the future quality control of those products, we determined the parameters for optimizing the method of analysis for identifying and quantifying FA in hair care products through the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC). In the HPLC, we used reverse phase silica column coated with octadecylsilane (C18) and methanol solution in water 70% (v/v) as a mobile phase. The chromatographic conditions were: a column with 4 mm internal diameter, 250 mm length and 5 μm particle size, at room temperature (between 21° and 25°C degrees), flow rate of the mobile phase of 1 ml/min and wavelength of 345 nm. We optimized the FA analysis method for hair care products through the reaction of derivatization with 0.1% solution of 2,4-dinitrophenylhydrazine in 0.5 N hydrochloric acid, using citrate buffer. We determined the optimal pH (4.5) of the reaction as well as the reaction time (2 min). The working range was defined from (7.38×10^{-4}) % w/v to (5.17×10^{-3}) % w/v and was considered linear. The final product, 2,4-dinitrophenylhydrazone, remained stable up to 90 min when protected from light and when exposed to it in 100% and 67% of the tests, respectively. In the analysis of a hair product (mask) in which FA was not declared in the formula and label, we detected its presence. Therefore, the method proved effective in the working range studied for the test sample.

Keywords: Formaldehyde. HPLC. Optimization. Hair care products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mercado mundial de cosméticos.....	19
Figura 2 - Faturamento da indústria de cosméticos no Brasil (em US\$ bilhões).	20
Figura 3 - Mecanismo de formação da 2,4-dinitrofenilhidrazona a partir de compostos carbonilados.	31
Figura 4 - Cromatograma da solução do branco (THF 90% v/v + 2,4-DNFHI 0,1% m/v + tampão citrato) obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min.	48
Figura 5 - Cromatograma da 2,4-DNFHI e 2,4-DNFHO através da reação de derivatização da solução de FA 0,002% m/v com 2,4-DNFHI 0,1% m/v obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min. e do 2,4-DNFHO em 6,450 min.....	48
Figura 6 - Efeito da adição do tampão citrato pH 4,5 na estabilidade do 2,4-DNFHO, em função do tempo de reação, usando solução de formaldeído 0,002% em THF:água (9:1).	52
Figura 7 - Efeito da adição do tampão citrato pH 4,5 na estabilidade do 2,4-DNFHO, em função do tempo de reação, usando solução de formaldeído 0,002% em THF:água (9:1).	53
Figura 8 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	55
Figura 9 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	56
Figura 10 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	57
Figura 11 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	58

Figura 12 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	59
Figura 13 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	60
Figura 14 - Representação gráfica da Curva analítica do formaldeído	63
Figura 15 - Curva analítica do formaldeído	66
Figura 16 - Cromatograma da solução do branco (THF 90% v/v + 2,4-DNFHI 0,1% m/v + tampão citrato) obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min.	67
Figura 17 - Cromatograma da 2,4-DNFHI e 2,4-DNFHO através da reação de derivatização da solução de FA 0,002% m/v com 2,4-DNFHI 0,1% m/v obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min. e do 2,4-DNFHO em 6,458 min.....	67
Figura 18 - Cromatograma da 2,4-DNFHI e 2,4-DNFHO através da reação de derivatização da solução da amostra de um produto capilar com 2,4-DNFHI 0,1% m/v obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min. e do 2,4-DNFHO em 6,458 min.	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Informações referentes ao FA em produtos cosméticos constantes no Anexo II da RDC nº15, de 26 de março de 2013.	23
Quadro 2 - Dados Físico Químicos do Formaldeído	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo da solução estoque	45
Tabela 2 - Preparo das soluções trabalho.....	45
Tabela 3 - Determinação do pH final da reação de derivatização do FA 0,002% em THF 90% v/v com 2,4-DNFH 0,1% m/v, em tampão citrato pH 4,5 empregando 3 concentrações de ácido clorídrico.....	47
Tabela 4 - Teste de Grubbs calculado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 1 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	49
Tabela 5 - Teste de Grubbs calculado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	50
Tabela 6 - Teste de Grubbs calculado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 3 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	50
Tabela 7 - Teste de Grubbs calculado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 4 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	51
Tabela 8 - Teste de Grubbs recalculado nas áreas do cromatograma sem o valor discrepante, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 4 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	51
Tabela 9 - Teste de Grubbs calculado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 5 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	52

Tabela 10 - Média das áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% nos tempos 1, 2, 3, 4 e 5 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	52
Tabela 11 - Teste de Cochran nos tempos de reação de 1, 2, 3, 4 e 5 min.	53
Tabela 12 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI ¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	54
Tabela 13 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	55
Tabela 14 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	56
Tabela 15 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	58
Tabela 16 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	59
Tabela 17 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.	60
Tabela 18 - Teste de Grubbs para avaliação de valores discrepantes (<i>outliers</i>) para cada nível de concentração da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.	61
Tabela 19 - Teste de Cochran para avaliação da homogeneidade da variância da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.	62
Tabela 20 - Curva analítica do formaldeído obtida por CLAE através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.	62
Tabela 21 - Análise da regressão linear.	63

Tabela 22 - Teste de Grubbs para avaliação de valores discrepantes (<i>outliers</i>) para cada nível de concentração da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.	64
Tabela 23 - Teste de Cochran para avaliação da homogeneidade da variância da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.	65
Tabela 24 - Curva analítica do formaldeído obtida por CLAE através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.	65
Tabela 25 - Análise da regressão linear.....	66

LISTA DE SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> Agência para Registro de Doenças e Substâncias Tóxicas dos EUA
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i> Banco de Dados de Substâncias Químicas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de variação
D	Densidade
2,4-DNFHI	2,4-Dinitrofenilhidrazina
2,4-DNFHO	2,4-Dinitrofenilhidrazona
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> Agência de Proteção Ambiental dos EUA
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FA	Formaldeído
HSDB	<i>Hazardous Substances Data Bank</i> Banco de Dados de Substâncias Perigosas
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> União Internacional de Química Pura e Aplicada
LCCDM	Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional

N	Normalidade
NR	Norma Regulamentadora
OSHA	<i>Occupational Safety & Health Administration</i> Agência de Administração de Segurança e Saúde Ocupacional
PA	Pró análise
PM	Peso molecular
m/v	Massa por volume
Qsp	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA
SUS	Sistema Único de Saúde
v/v	Volume por volume
WHO	<i>World Health Organization</i> Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 PRODUTOS COSMÉTICOS	18
1.2 MERCADO COSMÉTICO	19
1.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA	20
1.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA REFERENTE AO USO DO FORMALDEÍDO EM PRODUTOS COSMÉTICOS	22
1.5 CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DO FORMALDEÍDO	23
1.6 TOXICOLOGIA DO FORMALDEÍDO	25
1.6.1 <i>Efeitos tóxicos</i>	25
1.6.2 <i>Genotoxicidade</i>	27
1.6.3 <i>Carcinogenicidade</i>	29
1.6.3.1 Câncer de nasofaringe	29
1.6.3.2 Leucemia	30
1.7 DETERMINAÇÃO QUÍMICA DO FORMALDEÍDO	30
1.8 MÉTODO POR CLAE PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM PRODUTOS CAPILARES	32
1.9 JUSTIFICATIVA	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 MATERIAL	36
3.1.1 <i>Substâncias e Soluções</i>	36
3.1.2 <i>Equipamentos e outros itens</i>	38
3.2 ENSAIOS PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	39
3.2.1 <i>Determinação do pH final da reação de derivatização do FA com 2,4-DNFHI em tampão de citrato</i>	39
3.2.2 <i>Procedimento da reação de derivatização</i>	40
3.2.3 <i>Estudo do tempo de reação de derivatização</i>	41

3.2.4 <i>Estudo da estabilidade do produto de derivatização</i>	44
3.2.4.1 Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, protegido da luz..	44
3.2.4.2 Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, exposto à luz	45
3.2.5 <i>Determinação da linearidade da curva analítica</i>	45
3.3 IDENTIFICAÇÃO DE FORMALDEIDO EM AMOSTRA DE PRODUTO CAPILAR	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 DETERMINAÇÃO DO PH FINAL DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO FA COM 2,4-DNFHI EM TAMPÃO DE CITRATO	47
4.2 PROCEDIMENTO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO	48
4.3 ESTUDO DO TEMPO DE REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO	49
4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PRODUTO DE DERIVATIZAÇÃO	54
4.4.1 <i>Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, protegido da luz</i>	54
4.4.2 <i>Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, exposto à luz</i>	57
4.5 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA.....	61
4.6 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DE FORMALDEIDO EM AMOSTRA DE PRODUTO CAPILAR	67
5 CONCLUSÃO	69
PERSPECTIVAS	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS COSMÉTICOS

A legislação brasileira define produtos cosméticos como “preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas da mucosa da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protege-los ou mantê-los em bom estado” (BRASIL, 2015).

Os produtos cosméticos são classificados em função do risco em produtos de grau 1 e grau 2, sendo os critérios para esta classificação definidos em “função da probabilidade de ocorrência de efeitos não desejados, devido ao uso inadequado do produto, sua formulação, finalidade de uso, áreas do corpo a que se destinam e cuidados a serem observados quando de sua utilização” (BRASIL, 2015).

Os produtos de grau 1 caracterizam-se por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária, não necessitando de informações detalhadas quanto ao seu modo e restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto. Dentre os produtos de grau 1, podemos citar: sabonetes, perfumes, hidratantes corporais, desodorantes corporais, xampu e condicionador (exceto os de uso infantil e com ação antiqueda, anticaspa), produtos para fixar, modelar, e/ou embelezar os cabelos (máscara e restaurador capilares), dentre outros (BRASIL, 2015).

Os produtos de grau 2 são aqueles cuja formulação possui uma indicação específica e características que exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso. Os produtos de grau 2, correspondem aos: sabonetes infantil e de uso íntimo, colônia infantil, protetor solar, produtos para alisar e/ou tingir os cabelos e outros (BRASIL, 2015).

Os produtos cosméticos para serem comercializados necessitam ser regularizados juntos a ANVISA. A sua regularização é realizada na forma eletrônica, no portal da ANVISA (BRASIL, 2015).

1.2 MERCADO COSMÉTICO

Em 2013, o Brasil manteve o título de terceiro maior mercado consumidor de produtos cosméticos do mundo, estando atrás somente dos Estados Unidos da América (EUA) e China, participando com 9,5% no consumo mundial e com 54% no consumo da América Latina. Neste mesmo ano, a venda de produtos cosméticos no Brasil somou US\$ 43 bilhões (ABIHPEC, 2014b), como a Figura 1.

Figura 1 - Mercado mundial de cosméticos

Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos	US\$ Bilhões (Preço ao consumidor)		(%) Em percentual	
	2.012	2.013	Participação	Varição 2013 x 2012
Mundo	446,7	454,1		1,7
EUA	72,0	73,3	16,1	1,8
China	39,9	44,2	9,7	10,8
Brasil	41,8	43,0	9,5	2,7
Japão	47,4	39,1	8,6	-17,7
Alemanha	18,1	19,1	4,2	5,2
Reino Unido	16,8	16,9	3,7	1,0
França	16,1	16,8	3,7	4,2
Rússia	14,2	14,2	3,1	0,1
Itália	11,9	12,2	2,7	2,3
México	10,0	10,8	2,4	8,1

Fonte: (ABIHPEC, 2014a)

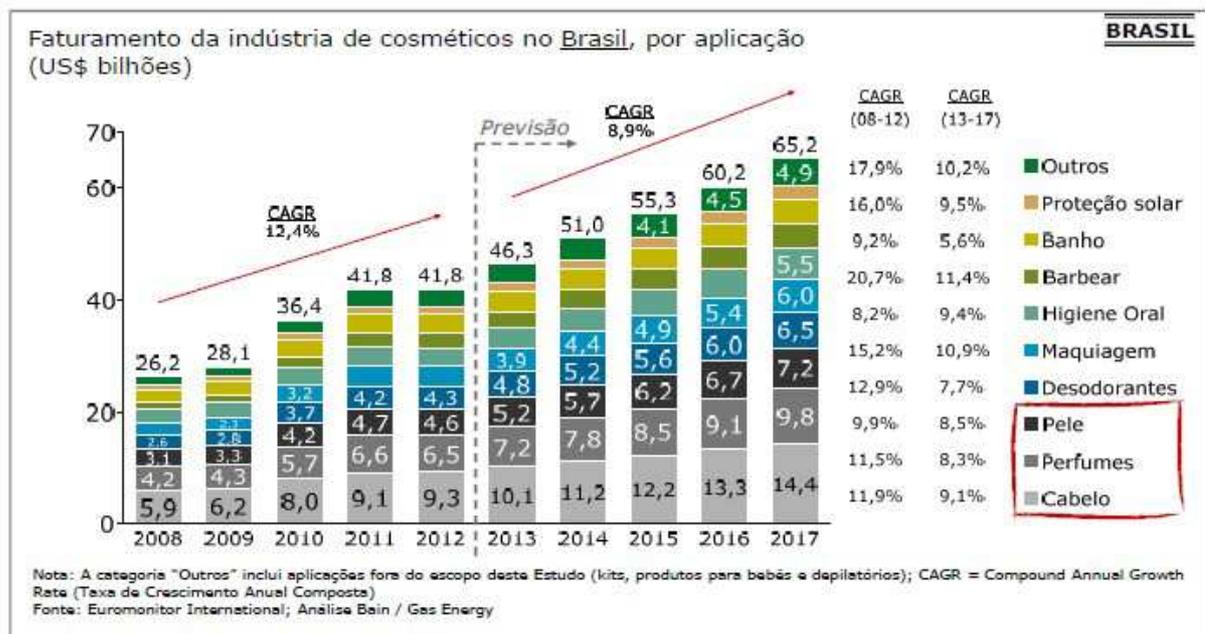
O setor de produtos cosméticos no Brasil é um dos que mais cresce historicamente, sendo o segundo setor de maior investimento em inovação ficando atrás apenas do setor farmacêutico. Anualmente, ocorrem lançamentos de cerca de 35 mil novos produtos para atender as necessidades do mercado. As oportunidades de crescimento desse setor são promissoras e estão relacionadas às mudanças no perfil demográfico, social e econômico da sociedade brasileira (ABIHPEC, 2014b).

Uma particularidade do mercado brasileiro é o reduzido consumo de produtos considerados *premium* (produtos mais sofisticados, por exemplo: Skinceuticals, L'occitane, Roger&Gallet) em detrimento de produtos considerados de massa. O mercado brasileiro é predominantemente dominado por produtos de massa e, portanto, tende a ter uma demanda menos sofisticada quando comparado a outros países com tamanhos de mercados semelhantes. No mundo, os produtos *premium*

representam aproximadamente 22% do mercado total, enquanto no Brasil, eles representam aproximadamente 3% (BAIN & COMPANY, 2014).

Uma característica do mercado brasileiro é a existência de uma grande diversidade genética e a preocupação do consumidor local com a customização de alguns tipos de produtos (exemplos: xampu para cabelos crespos ou lisos, maquiagem para pele clara e escura), que exige o desenvolvimento de produtos que atendam aos diferentes tipos genéticos e características climáticas do país, sobretudo nas aplicações para cabelo e pele (BAIN & COMPANY, 2014). Conforme a Figura 2, observa-se que os produtos de maior faturamento da indústria de cosméticos no Brasil correspondem aos de uso capilar no período de 2008 a 2012, bem como, na previsão dos anos de 2013 a 2017.

Figura 2 - Faturamento da indústria de cosméticos no Brasil (em US\$ bilhões).



Fonte: (BAIN & COMPANY, 2014)

1.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

No Brasil dos séculos XVIII e XIX, vivia-se a vigilância sanitária com a noção de "polícia sanitária", que tinha como função regulamentar o exercício da profissão, exercer o saneamento da cidade, fiscalizar as embarcações, os cemitérios e o

comércio de alimentos, com o objetivo de “vigiar” a cidade para evitar a propagação das doenças (EDUARDO, 1998).

No século XX, na década de 50, o país iniciava o processo de industrialização surgindo leis mais específicas para o estabelecimento das normas gerais de defesa e proteção da saúde. Neste contexto, em 1953, foi criado o Ministério da Saúde, Lei nº 1920, e no ano seguinte (1954) criou-se o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM), para realizar análises e estabelecer padrões. Posteriormente (1955), o LCCDM incorpora a área de alimentos transformando-se no Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) (ROZENFELD, 2000; INCQS, 2010c).

Com o aumento da produção de bens sujeitos à vigilância sanitária e a consequente necessidade de melhoria do controle da qualidade dos produtos (alimentos, cosméticos, kits de diagnóstico, artigos e insumos para saúde, saneantes domissanitários, medicamentos, artigos e insumos para diálise, saúde ambiental, sangue e hemoderivados, medicamentos biológicos), em 1981, o LCCDMA foi transferido para a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e recebe uma nova estrutura e um novo nome, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) (ROZENFELD, 2000; INCQS, 2010d).

Atualmente, o INCQS é uma unidade da Fiocruz que atua em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da vigilância sanitária. Sua missão é contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária (INCQS, 2010a).

Dentre as atividades exercidas pelo INCQS destacam-se: a execução de ações analítico-laboratoriais previstas na legislação sanitária ou por demanda de órgãos oficiais e o desenvolvimento, a adequação ou implantação de metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de saúde (INCQS, 2010b).

O INCQS atua em cooperação com a ANVISA e com as Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde (INCQS, 2010a).

A ANVISA que é uma autarquia sob regime especial, vinculada ao Ministério da Saúde foi criada a partir da Lei nº 9.782 em 1999. A agência tem por finalidade promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e de fronteiras (BRASIL, 1999). Atua em ação coordenada com os estados, os municípios e o Distrito Federal, de acordo com os princípios do Sistema Único de Saúde (SUS), para a melhoria da qualidade de vida da população brasileira (ANVISA, 2014a).

1.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA REFERENTE AO USO DO FORMALDEÍDO EM PRODUTOS COSMÉTICOS

A Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA - RDC nº 36, de 17 de junho de 2009 dispõe sobre a proibição, a exposição, a venda e a entrega ao consumo de solução a 37% de formaldeído em drogaria, farmácia, supermercado, armazém e empório, loja de conveniência e *drugstore*. Esta Resolução combate e coíbe o uso indiscriminado de FA associado ou adicionado a produtos capilares com o objetivo de alisar os cabelos (BRASIL, 2009). Conforme o artigo 2º, a adição de FA a produto cosmético acabado em salões de beleza ou de qualquer outro estabelecimento, acarreta riscos à saúde da população e configura infração sanitária nos termos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977 (BRASIL, 1977). Os efeitos nocivos decorrentes da utilização de FA em produtos capilares para alisamento dos cabelos ameaçam, principalmente, a saúde de quem manipula e/ou adiciona a substância aos produtos, do aplicador da mistura e, também, ameaça a saúde do indivíduo no qual o produto é aplicado.

A Resolução - RDC nº 15, de 26 de março de 2013 aprova o Regulamento Técnico “LISTA DE SUBSTÂNCIAS DE USO COSMÉTICO: ACETATO DE CHUMBO, PIROGALOL, FORMALDEÍDO E PARAFORMALDEÍDO” e dá outras providências. No Anexo II desta Resolução consta a lista de substâncias de uso cosmético e nos itens 2 e 3 as informações em relação ao FA. O FA em cosméticos só é permitido com a função de conservante, na concentração máxima de 0,1% em

produtos de higiene oral e de 0,2% nos demais produtos. Outra aplicação do FA é como endurecedor de unhas, na concentração máxima de 5% (BRASIL, 2013).

O Quadro 1 mostra as informações referentes ao FA quanto ao campo de aplicação e/ou utilização, concentração máxima autorizada no produto final, outras limitações e requerimentos, bem como, as condições de uso e advertências que devem constar no rótulo.

Quadro 1 - Informações referentes ao FA em produtos cosméticos constantes no Anexo II da RDC nº15, de 26 de março de 2013.

Nº	Substância	Campo de aplicação e/ou utilização	Concentração máxima autorizada no produto final	Outras limitações e requerimentos	Condições de uso e advertências que devem constar no rótulo
2	Formaldeído e paraformaldeído	Conservante	0,1% (em produtos de higiene oral) 0,2% (outros produtos não destinados à higiene oral) (expresso como formaldeído livre)	Proibido em sistemas pulverizáveis (como aerossóis e sprays)	Contém formaldeído (somente para concentrações superiores a 0,05% no produto final)
3	Formaldeído	Produto para endurecer as unhas	5% calculados como formaldeído		Contém formaldeído (somente para concentrações superiores a 0,05% no produto final)

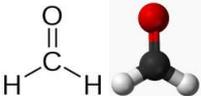
Fonte: (BRASIL, 2013)

1.5 CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DO FORMALDEÍDO

O FA é o composto mais simples da família dos aldeídos e existe na forma de gás à temperatura ambiente (ATSDR, 1999; HSDB, 2009). Ele é solúvel em água, éter, acetona e benzeno. A sua principal forma em soluções aquosas diluídas é o

hidrato de metileno glicol (monômero) e as suas formas primárias em soluções concentradas são os polímeros de polioximetileno glicol. Comercialmente, o FA é frequentemente encontrado como solução aquosa 30% a 50% (em peso), solução conhecida como formalina (IARC, 2006). A formalina contém estabilizantes adicionados, geralmente até 15% de metanol ou concentrações mais baixas de vários derivados de amina. Na ausência de estabilizadores, o FA em solução oxida-se lentamente em ácido fórmico e polimeriza formando o paraformaldeído, um polímero com 8 a 100 unidades de FA (HSDB, 2009). As propriedades físicas e químicas do FA estão listadas no Quadro 2 abaixo.

Quadro 2 - Dados Físico Químicos do Formaldeído

NOMENCLATURA	
Nº de registro no CAS (<i>Chemical Abstract Service</i>): 50-00-0	
Nome de registro do CAS: Formaldeído	
IUPAC: Metanal	
Sinônimos: Gás formaldeído; aldeído fórmico; metaldeído; metil aldeído; óxido de metileno; oxometano; oximetileno	
ESTRUTURA E FÓRMULA MOLECULAR	
CH ₂ O	
	
Massa molecular relativa: 30,03	
PROPRIEDADES FÍSICAS DA SUBSTÂNCIA PURA	
Descrição: gás incolor com odor pungente	
Ponto de fusão: - 19,1 °C	
Ponto de ebulição: - 92 °C	
Densidade: 0,815 à - 20 °C	
Pressão de vapor: 3,890 mm Hg à 25 °C	

Fonte: (LIDE, 2003; IARC, 2006)

O FA tem numerosos usos industriais e comerciais. Seu uso predominante é na produção de resinas industriais, principalmente de uréia-formaldeído, fenol-formaldeído, poliacetal e resinas de melamina-formaldeído (FORMALDEHYDE, 2012). Essas resinas são usadas para a fabricação de inúmeros produtos

comerciais, incluindo adesivos e ligantes para produtos compostos de madeira, papel e celulose, plásticos e fibras sintéticas e em acabamento têxtil.

No Brasil, a ANVISA através da publicação da Resolução - RDC nº 35, de 3 de junho de 2008, proibiu o uso do FA em produtos de limpeza (detergentes, desinfetantes, alvejantes e demais saneantes), devido a sua reconhecida carcinogenicidade e classificação toxicológica pela IARC (BRASIL, 2008).

Neste mesmo ano, outra publicação da ANVISA, a Resolução - RDC nº 91, de 28 de novembro de 2008, proíbe o uso, de forma isolada, de produtos que contenham FA para desinfecção e esterilização de artigos, superfícies e equipamentos, em ambientes domiciliares ou coletivos e em serviços submetidos ao controle e fiscalização sanitária por acarretar riscos associados aos seus efeitos tóxicos e carcinogênicos (BRASIL, 2008).

1.6 TOXICOLOGIA DO FORMALDEÍDO

1.6.1 Efeitos tóxicos

Os vapores de FA causam irritação nasal e de faringe em humanos e animais de laboratório sob uma variedade de circunstâncias. Há uma grande variação interindividual com relação à resposta aos efeitos irritantes do formaldeído em humanos. Os principais efeitos tóxicos causados pela exposição aguda por via inalatória são irritação ocular, nasal e da garganta e outros efeitos, tais como, tosse, chiado no peito, dor no peito e bronquite, após exposição a altos níveis de FA (WHO, 1989; EPA, 2008). A exposição crônica humana por via inalatória tem sido associada com sintomas respiratórios e de irritação ocular, nasal e da garganta; e o contato repetido por via dérmica com soluções de FA causa irritação cutânea e dermatite de contato alérgica (WHO, 1989; CALABRESE; KENYON, 1991; EPA, 2008; HSDB, 2009).

Em indivíduos saudáveis expostos por via inalatória sob condições controladas ao FA nas concentrações de 2-3 ppm (2,5-3,7 mg/m³) durante períodos que variaram entre 40 min. e 3 h, sintomas de irritação ocular e nasal foram observados (IARC, 2012).

Estudo conduzido por Schachter (1987) com um grupo de 15 trabalhadores atuando em laboratório de uma unidade hospitalar exposto por via inalatória ao FA em concentrações de 0 e 2 ppm (0-2,5 mg/m³) durante 40 min., numa câmara ambiental, com temperatura e umidade controladas, concluiu que a exposição por via inalatória ao FA 2 ppm (2,5 mg/m³) durante 40 min., em repouso ou após 10 min. de exercício não causou decréscimo agudo da função pulmonar. A percepção do odor ocorreu em 80% dos trabalhadores, a ocorrência de ausência de irritação nasal e garganta em 100% e de irritação ocular (grau suave e de curta duração) em 47% dos indivíduos expostos (SCHACHTER et al., 1987).

No estudo de Kulle (1987), 19 voluntários saudáveis foram expostos ao formaldeído (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 ppm) (0,6; 1,2; 2,5; 3,7 mg/m³) durante 3 h. Cada indivíduo atuou como seu próprio controle recebendo 5 exposições (uma controle, sem formaldeído e 4 exposições com as diferentes concentrações de FA) sendo o intervalo entre as exposições de uma semana. Estas concentrações foram selecionadas como níveis representativos do cenário ocupacional (KULLE et al., 1987). Este estudo mostrou que a irritação ocular foi o sintoma dominante que aumentou linearmente na faixa de doses de exposição de 0,5-3,0 ppm (0,6-3,7 mg/m³), não ocorrendo em 0,5 ppm (0,6 mg/m³), ocorrendo, porém, com intensidade moderada em 21% e 35% dos voluntários expostos, respectivamente, a 1 ppm (1,2 mg/m³) e a 2 ppm (2,5 mg/m³) de FA. O odor de FA foi percebido por 40% dos voluntários expostos a 0,5 ppm (0,6 mg/m³) e por 5% na ausência de FA. A irritação nasal e/ou da garganta foi a resposta menos sensível ao FA, com limiar de resposta estimado de 1 ppm (1,2 mg/m³) (IARC, 2006).

A agência regulatória OSHA (*Occupational Safety & Health Administration*) ligada ao Departamento de Trabalho dos Estados Unidos da América (EUA), com o objetivo de proteger os trabalhadores expostos ao FA estabeleceu normas. O limite máximo permitido para o FA nos locais de trabalho é de 0,75 ppm (0,9 mg/m³) em 8h. Um segundo limite é de 2 ppm (2,5 mg/m³) para exposições de curta duração de 15 minutos.

No Brasil, a Norma Regulamentadora (NR) n° 15 - Atividades e Serviços Insalubres, no Anexo n° 11 - Agentes Químicos cuja Insalubridade é Caracterizada Por Limite de Tolerância e Inspeção no Local de Trabalho - determina que o valor máximo de exposição ocupacional ao FA é de 1,6 ppm (2,3 mg/m³) até 48

h/semana. Adicionalmente, na referida norma, é assinalado que para o FA, este limite de tolerância não pode ser ultrapassado em momento algum da jornada de trabalho (BRASIL, 1978).

1.6.2 Genotoxicidade

Na avaliação da genotoxicidade de uma substância química são realizados testes empregando-se sistemas *in vitro*, principalmente com cultura de células e *in vivo*, com animais para a detecção do potencial desta substância causar mutações genéticas e cromossômicas (ANVISA, 2010).

Os testes de genotoxicidade devem ser capazes de avaliar os potenciais danos ao DNA e a fixação do respectivo dano. Tais agravos ao DNA podem ser observados na forma de mutações gênicas, mutações cromossômicas estruturais, alterações cromossômicas numéricas e recombinação, que são considerados essenciais na produção de efeitos hereditários e nas etapas de desenvolvimento de malignidades. Substâncias que apresentam resultados “positivos” nos testes supracitados são potencialmente agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos para seres humanos (ANVISA, 2010).

Enquanto uma relação entre a exposição a agentes químicos e a carcinogênese tem sido estabelecida em humanos, tem sido difícil a avaliação da transmissão hereditária das alterações provocadas por tais agentes, conseqüentemente, os testes de genotoxicidade têm sido utilizados, principalmente, para a previsão de potencial carcinogênico (ANVISA, 2010).

A genotoxicidade do FA tem sido observada em muitos sistemas *in vitro* com diferentes *endpoints* (IARC, 2012). A evidência de mutações induzidas por FA em vários sistemas experimentais é consistente englobando tanto os efeitos clastogênicos quanto a mutação direta do DNA. O FA mostrou potencial mutagênico em vários sistemas bacterianos, com e sem ativação metabólica (fração S9) e induziu deleções, mutações pontuais, inserções e transformação de células em ensaios *in vitro* com células de mamífero (IARC, 2006).

É inquestionável que o FA induza diretamente uma variedade de efeitos genotóxicos e mutagênicos em células proliferantes de mamífero *in vitro* (MERK; SPEIT, 1998; SPEIT; MERK, 2002; SCHMID; SPEIT, 2007; SPEIT et al., 2009;

SPEIT et al., 2008) e que também cause alterações no DNA (ligações cruzadas DNA-proteína) na mucosa oral de ratos e no trato respiratório superior de macacos expostos ao FA por inalação (CASANOVA et al., 1991; CASANOVA et al., 1994). Entretanto, muitas evidências sugerem que o FA não seja transportado a sítios distantes e, que conseqüentemente, não deveria ser capaz de induzir efeitos genotóxicos sistêmicos em animais e humanos (HECK; CASANOVA, 2004; GOLDEN; PYATT; SHIELDS, 2006; PYATT; NATELSON; GOLDEN, 2008).

Speit e colaboradores (2009), após revisão dos seus próprios trabalhos e da literatura, concluíram que não há evidência de efeitos genotóxicos sistêmicos em animais de laboratório por inalação de FA. O estudo realizado pelo próprio autor mostrou também que o FA não induziu efeito genotóxico sistêmico (indução de micronúcleo, troca de cromátides irmãs e de quebra de fita de DNA através do ensaio Cometa), em sangue periférico obtido de ratos machos Fischer-344 expostos ao FA por via inalatória durante 4 semanas (6h/dia, 5 dias/semana) às concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 6,0; 10,0; 15,0 ppm (0; 0,6; 1,2; 2,5; 7,4; 12,3; 18,4 mg/m³).

Em humanos expostos ao FA tem sido repetidamente relatada a formação de micronúcleos em células nasais e da mucosa oral. Diferentemente, em linfócitos de humanos expostos ao FA, a indução de micronúcleos, troca de cromátides irmãs e de aberrações cromossômicas tem sido menos consistente (IARC, 2012).

Costa e colaboradores (2015) publicaram um estudo que avaliou alterações citogenéticas pelo teste de aberrações cromossômicas (AC) e dano ao DNA pelo ensaio Cometa em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores expostos ao FA em laboratório de anatomia patológica (COSTA et al., 2015). Amostras do ar desses ambientes de trabalho foram coletadas para determinar o nível de FA que cada trabalhador estava exposto. Esse estudo foi realizado com 84 trabalhadores expostos ao FA em laboratórios de anatomia patológica de nove hospitais localizados em Portugal. Esses voluntários trabalhavam por pelo menos 1 ano nessa atividade. Havia também 87 trabalhadores que foram o controle, esses voluntários trabalhavam nesses mesmos hospitais nas áreas administrativas e não possuíam histórico de exposição ocupacional ao FA. O ar foi amostrado durante o período de trabalho, tanto a amostragem do ar quanto a análise do FA foi desenvolvida de acordo com o método do NIOSH. No total, 172 voluntários (84 expostos e 87

controles) foram envolvidos no estudo. Ambos os grupos foram similares na distribuição do sexo, idade e hábitos de fumar. A média do nível de exposição do FA foi $0,38 \pm 0,03$ ppm ($0,46 \pm 0,04$ mg/m³). O limite atual permitido na legislação portuguesa para exposição ocupacional ao FA é 0,30 ppm (0,4 mg/m³), semelhantemente ao estabelecido pela *Germany* e pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*. Todos os parâmetros citogenéticos avaliados – AC total; aberrações do tipo cromossômico; aberrações do tipo cromatídico; *gaps* e aneuploidia – foram significativamente elevadas em profissionais do laboratório de anatomia patológica expostos ao FA quando comparadas com o controle. Os indivíduos expostos ao FA mostraram um aumento de 91% em frequência total de aberrações cromossômicas quando comparados ao controle (COSTA et al., 2015).

1.6.3 Carcinogenicidade

A monografia publicada, em 1995, pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classificava o FA no Grupo 2A como provável carcinógeno humano baseado em suficientes evidências em animais de experimentação e limitadas evidências em humanos (IARC, 1995). A partir de 2006, a IARC alterou a classificação do FA para o Grupo 1, ou seja, como carcinógeno em humanos (IARC, 2006). Esta classificação foi baseada, inicialmente, em suficientes evidências de indução de câncer de nasofaringe em humanos e, posteriormente em 2012, concluiu-se que além de causar câncer de nasofaringe também induz leucemia em humanos (IARC, 2012).

1.6.3.1 Câncer de nasofaringe

A mortalidade por câncer de nasofaringe apresentou um aumento estatisticamente significativo em estudo de coorte dos EUA em trabalhadores expostos ao FA na indústria, e em dois outros estudos de coorte dos EUA com embalsamadores e trabalhadores de indústrias que usavam ou fabricavam FA na Dinamarca. Cinco de sete estudos caso-controle analisados, também acharam o risco elevado de câncer na exposição ao FA (IARC, 2006). O IARC, então, concluiu que existe evidência suficiente em humanos que o FA causa câncer de nasofaringe

e que a genotoxicidade tem papel importante na carcinogenicidade do FA em tecidos nasais (INCA, 2015; IARC, 2012).

A neoplasia maligna de nasofaringe é um evento raro, porém apresenta um dos piores prognósticos dentre os tumores malignos de cabeça e pescoço, pela proximidade da base de crânio e de outras estruturas vitais, pela natureza invasiva do tumor e por causar sintomas tardios e a dificuldade no exame de nasofaringe (INCA, 2015).

Em experimentação animal, seis estudos nos quais o FA foi administrado a ratos por inalação mostraram evidências de carcinogenicidade, principalmente, indução de carcinomas de células escamosas da cavidade nasal. Um estudo similar em hamsters e camundongos não mostrou evidência de carcinogenicidade (IARC, 2006).

1.6.3.2 Leucemia

Riscos elevados de leucemia foram observados consistentemente em estudos de mortalidade envolvendo profissionais expostos ao FA (embalsamadores, trabalhadores de funerária, patologistas e anatomistas) (IARC, 2012). Em dois de três grandes estudos de coorte em trabalhadores de indústria observou-se associações positivas para leucemia que foram mais fortes para leucemia mielóide. A partir das evidências epidemiológicas, o IARC concluiu que a exposição ocupacional ao FA causa leucemia (IARC, 2012).

1.7 DETERMINAÇÃO QUÍMICA DO FORMALDEÍDO

A reação específica das substâncias carbonílicas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFHI) formando o correspondente 2,4-dinitrofenilhidrazona (2,4-DNFHO) é empregada como um método qualitativo de identificação e de determinação quantitativa em análise orgânica (UCHIYAMA; INABA; KUNUGITA, 2011).

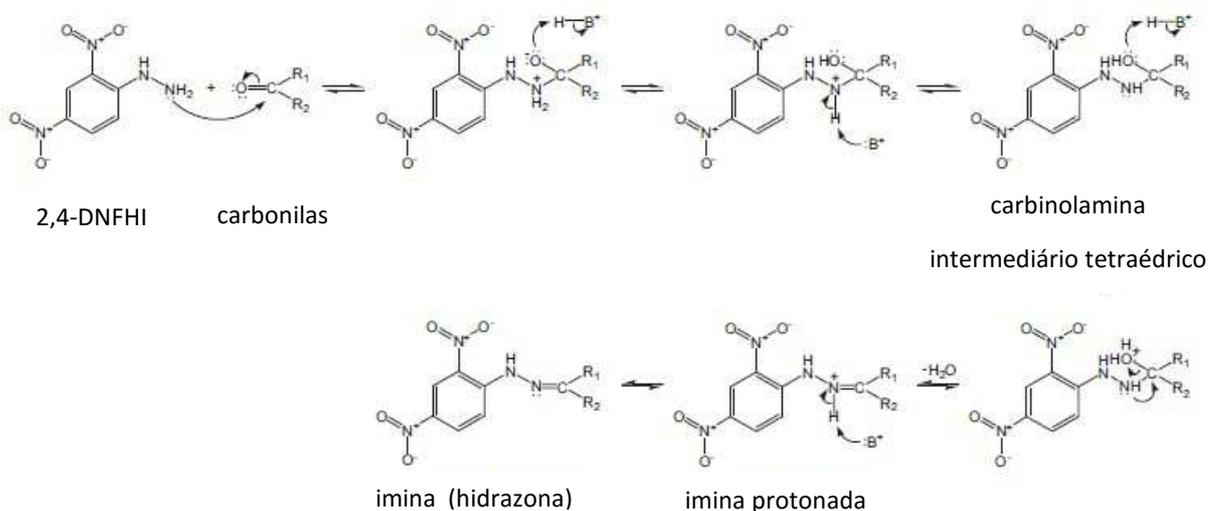
A determinação quantitativa do FA quando realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta-visível é complexa. O FA não absorve no ultravioleta (UV) necessitando de uma reação de derivatização para a sua quantificação. Adicionalmente, devido ao seu baixo peso molecular e alta

polaridade, dificilmente é retido nas colunas cromatográficas de fase reversa (LIN, 2009).

Na reação de derivatização do FA, o reagente frequentemente utilizado é o 2,4-DNFHI. O grupo carbonílico do FA reage com o grupo amino do 2,4-DNFHI em condições ácidas e à temperatura ambiente para formar o correspondente derivado 2,4-DNFHO (LIN, 2009).

Na primeira etapa do mecanismo de formação da hidrazona (Figura 3), a amina reage com o composto carbonílico. O ganho de um próton pelo íon alcóxido e perda de um próton pelo íon amônio forma um intermediário tetraédrico neutro. O intermediário tetraédrico neutro, chamado de carbinolamina está em equilíbrio com duas formas protonadas. A protonação pode ocorrer em qualquer átomo de oxigênio. A eliminação da água a partir do intermediário oxigênio protonado forma uma hidrazona protonada que perde um próton para produzir a hidrazona. A formação de hidrazona é reversível. Em soluções aquosas ácidas, os derivados hidrazona são hidrolisados de volta para o composto carbonílico com DNFHI, e, em seguida, a reação atinge o equilíbrio (UCHIYAMA; INABA; KUNUGITA, 2011).

Figura 3 - Mecanismo de formação da 2,4-dinitrofenilhidrazona a partir de compostos carbonilados.



Fonte: UCHIYAMA; INABA; KUNUGITA, 2011.

Em 1989, Benassi, Semenzato e Bettero publicaram um método para a determinação de FA em cosméticos baseado na reação de derivatização do FA com 2,4-DNFHI, dissolvido em ácido clorídrico. O procedimento é baseado na diluição da amostra com THF:água, seguido da reação de derivatização com 2,4-DNFHI e,

posteriormente, separação e quantificação por CLAE com detector de ultravioleta (345 nm). O derivado de FA é estabilizado no meio reacional por adição de tampão fosfato e hidróxido de sódio. Este método tem as seguintes vantagens: (i) as etapas de extração são evitadas por meio de diluição da amostra com THF:água; (ii) o FA derivado formado é compatível com a fase móvel e é estável a pH ácido; (iii) o FA livre pode ser determinado em menos de 15 min. em qualquer matriz complexa (BENASSI; SEMENZATO; BETTERO, 1989).

1.8 MÉTODO POR CLAE PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM PRODUTOS CAPILARES

Os produtos capilares possuem matrizes muito complexas, pois apresentam nas suas formulações vários princípios ativos em elevadas concentrações, além de outras substâncias, tornando cada um destes produtos um caso bastante diferenciado.

A cromatografia líquida, dentre as diversas metodologias analíticas descritas na literatura, evidencia-se como uma das mais versáteis e precisas para análise de misturas altamente complexas. Os métodos de análise utilizando CLAE por serem em sua essência, métodos de separação apresentam a vantagem de separar os componentes da mistura em análise antes da identificação e quantificação o que reduz os problemas de interferência em amostras como as em questão.

Considerando que o método a ser utilizado destina-se ao controle da qualidade de rotina dos produtos capilares, em uso no Brasil, a versatilidade, a abrangência e a facilidade de operação são características essenciais que favorecem o uso na rotina laboratorial, no controle da qualidade destes produtos.

Para tanto foi desenvolvida uma metodologia analítica por CLAE, para a identificação e quantificação do FA presente nas formulações desses produtos (SILVA; DORIA, 2011).

O método consiste na diluição da amostra com tetrahydrofurano - água (9:1), seguido da derivatização com 2,4-DNFI. O derivado formado em meio ácido é estabilizado por adição de tampão citrato, sendo detectado diretamente em menos de 10 min a 345nm. O método apresenta características que podem ser adequadas

para a avaliação direta do FA como conservante e utilizado em outras formulações de cosméticos, além dos produtos capilares.

1.9 JUSTIFICATIVA

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético (ABIHPEC), o Brasil ocupa o segundo lugar em consumo de produtos capilares (ABIHPEC, 2014a).

Segundo a ANVISA, o uso do FA como alisante capilar não é permitido, pois esse desvio de uso pode causar sérios danos ao usuário e ao profissional. Devido ao contato direto do FA com a pele ou vapor podem ocorrer: irritação, coceira, queimadura, inchaço, descamação e vermelhidão do couro cabeludo, queda do cabelo, ardência e lacrimejamento dos olhos, falta de ar, tosse, dor de cabeça, ardência e coceira no nariz. Após várias exposições pode causar também boca amarga, enjôos, vômitos, desmaios, feridas na boca, narina e olhos (ANVISA, 2014b). Na monografia publicada pela IARC há evidências suficientes que o FA causa irritação nos olhos, nariz e garganta, dermatite de contato e câncer de nasofaringe e leucemia podendo levar à morte (IARC, 2012).

A ANVISA em 2009 publicou a Resolução-RDC nº 36 (BRASIL, 2009) com a finalidade de restringir o acesso da população ao FA, coibindo o desvio de uso do FA como alisante capilar, protegendo a saúde dos profissionais cabeleireiros e consumidores. A prática da adição de FA, por qualquer estabelecimento, a um produto acabado constitui infração sanitária e está sujeito às sanções administrativas, cíveis e penais. A adulteração de qualquer produto configura crime hediondo (ANVISA, 2014b). A legislação sanitária brasileira, segundo a Resolução-RDC nº 15 (BRASIL, 2013), permite somente o uso do FA em produtos cosméticos como conservante e endurecedor de unhas nas concentrações máximas respectivas de 0,1, 0,2 e 5%.

Publicações científicas relatam concentrações de FA obtidas a partir da análise de produtos capilares acima do valor de 0,2%. Segundo Barbara e Miyamaru (2008) foi encontrado em 8 produtos capilares valores de FA na faixa de 2,01% a 10,98%; Silva; Prete; Galão (2013) em 5 amostras observaram a faixa de 5,37% a 10,65%; Maneli; Smith; Khumalo (2014) testaram 7 marcas brasileiras

comercializadas na África do Sul. Dentre essas, 5 estavam rotuladas como isentas de FA, 1 com 0,2% de FA e 1 sem declaração de teor. Das amostras rotuladas como isentas de FA, 1 continha 0,17% enquanto as demais continham FA na faixa de 0,96 a 1,11%; na rotulada com 0,2% a concentração foi de 1,15% e de 1,40% na amostra sem indicação de teor de FA.

Assim, é importante o monitoramento da concentração de FA nos produtos capilares para que estes sejam seguros nas condições de uso. Para tal finalidade faz-se necessário a otimização do método de análise do FA por CLAE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar um método de análise de FA em produtos capilares sujeitos às ações de vigilância sanitária através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o pH final da reação de derivatização do FA com 2,4-DNFHI em tampão de citrato;
- Determinar o tempo da reação de derivatização de FA com 2,4-DNFHI;
- Avaliar a estabilidade do derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona (2,4-DNFHO) em tampão de citrato, formado a partir da reação de derivatização de FA com 2,4-DNFHI, na ausência de luz;
- Avaliar a estabilidade do derivado 2,4-DNFHO em tampão de citrato, formado a partir da reação de derivatização de FA com 2,4-DNFHI, na presença de luz;
- Determinar a linearidade da curva analítica;
- Realizar a identificação de FA em amostra de produto capilar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Substâncias e Soluções

- Ácido clorídrico 37% PA; Peso Molecular (PM) 36,46; densidade (d) 1,19 kg/L; Merck (código 1.00317.1000)

Solução de ácido clorídrico 2,5 N

Solução de ácido clorídrico 37%.....21 mL

Água deionizadaqsp 100 mL

- 2,4-DNFHI 97% PA; PM 198,14; Sigma Aldrich (código D199303)

Solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N

2,4-DNFHI.....100 mg

Solução de ácido clorídrico 2,5 N.....20 mL

Água deionizadaqsp 100 mL

Dissolução inicial de 2,4-DNFHI em 20 mL da solução de ácido clorídrico 2,5 N no ultrassom por 10 min. Após a dissolução completou-se o volume para 100 mL com água deionizada.

- Solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 1,0 N

2,4-DNFHI.....100 mg

Solução de ácido clorídrico 2,5 N.....40 mL

Água deionizadaqsp 100 mL

Dissolução inicial de 2,4-DNFHI em 40 mL da solução de ácido clorídrico 2,5 N no ultrassom por 10 min. Após a dissolução completou-se o volume para 100 mL com água deionizada.

- Solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 2,0 N

2,4-DNFHI.....100 mg

Solução de ácido clorídrico 2,5 N.....80 mL
 Água deionizadaqsp 100 mL

Dissolução inicial de 2,4-DNFHI em 80 mL da solução de ácido clorídrico 2,5 N no ultrassom por 10 min. Após a dissolução, completou-se o volume para 100 mL com água deionizada.

- Soluções de FA 0,2 % m/v (estoque) e 0,002% m/v (trabalho) em tetrahidrofurano (THF)

THF grau CLAE; PM 72,11; d: 0,89 kg/L; Sigma-Aldrich (código 34865)

Preparo do diluente: solução de THF 90% (v/v)

THF.....900 mL
 Água deionizadaqsp 1000 mL

FA 37% PA com 10% metanol; PM 30,03; d:1,09 kg/L; Merck (código 1.04003.1000)

Preparo da solução estoque de FA 0,2% (m/v) (solução A)

Solução de FA 37%.....0,54 g
 Solução de THF 90% (v/v)qsp 100 mL

Preparo da solução trabalho de FA 0,002% (m/v) (solução B)

Solução A.....1 mL
 Solução de THF 90% (v/v)qsp 100 mL

- Metanol grau CLAE; PM 32.04; J.T.Baker (código 9093-03)

Solução de metanol 70% (v/v) (fase móvel)

Metanol.....700 mL
 Água deionizada.....qsp 1000 mL

- Solução tampão de citrato pH 4,5

Ácido cítrico (anidro) para síntese; PM 192,12; Merck (código 8.18707.1000)

Solução A - Ácido cítrico 20% (m/v)

Ácido cítrico.....20 g

Água deionizada.....qsp 100 mL

Dissolução inicial do ácido cítrico em 20 mL de água deionizada no ultrassom por 10 min. Após a dissolução, completou-se o volume para 100 mL com água deionizada.

- Hidróxido de sódio lentilhas PA; PM 40; Merck (código 1.06498.1000)

Solução de hidróxido de sódio 6 M

Hidróxido de sódio.....24 g

Água deionizada.....qsp 100mL

A solução foi preparada em banho de gelo.

Para a preparação do tampão de citrato pH 4,5, transferiu-se toda a solução de ácido cítrico 20% (m/v) para um béquer; agitou-se com agitador magnético e acrescentou-se, aos poucos, solução de hidróxido de sódio 6 M até alcançar o pH 4,5 empregando-se pHmetro.

3.1.2 Equipamentos e outros itens

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AG204;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo SCL-10Avp com bomba modelo LC-10ADvp, injetor automático modelo SIL-10AF e detector UV-VIS modelo SPD-10AVvp; coluna cromatográfica Lichrospher de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C18) de 5 µm de tamanho de partícula e dimensões de 4 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento, fabricante Merck (código1.50833.0001), mantida à temperatura ambiente (faixa de 21° à 25° C). Na CLAE, a fase móvel utilizada foi a solução metanol em água 70% (v/v) com velocidade de fluxo de 1 mL/min, pressão de 150 kgf.
- Unidade filtrante, membrana em PVDF; marca Millex HV; Millipore 0,45 µm de poro; 25 mm de diâmetro;
- Micropipetas de volume variável Eppendorf (faixa: 100-1000 µL; 500-500 µL);
- pHmetro Micronal, modelo B474 e eletrodo combinado de vidro;

- Placa de agitação magnética FANEM, modelo 257;
- Sistema de purificação de água Milli-Q, Millipore modelo Direct-Q5.
- Ultrassom Branson, modelo 3210;
- Vidraria em geral (balões volumétricos de 25 e 100 mL, béqueres de 20, 50, 100 mL, provetas graduadas de 50, 100, 500 e 1000 mL.
- Programas computacionais GraphPad Prism[®] versão 6 e Microsoft Excel[®] versão 2010.
- Todos os equipamentos e vidrarias utilizados estavam calibrados.

3.2 ENSAIOS PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

3.2.1 Determinação do pH final da reação de derivatização do FA com 2,4-DNFHI em tampão de citrato

No estudo do pH final da reação de derivatização da solução de FA 0,002 % (m/v) em THF 90% (v/v) com 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico foram empregadas soluções de 2,4-DNFHI 0,1% com três diferentes concentrações de ácido clorídrico (0,5; 1 e 2N).

- Reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N.

Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N. Após 2 min. de agitação com agitador magnético, adicionou-se 1 mL da solução tampão de citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. seguido da medida de pH empregando pHmetro.

- Reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 1 N.

Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 1 N. Após 2 min. de agitação com agitador magnético, adicionou-se 1 mL da solução tampão de citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. seguido da medida de pH empregando pHmetro.

- Reação de derivatização com 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 2 N. Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 2 N. Após 2 min. de agitação com agitador magnético, adicionou-se 1 mL da solução tampão de citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. seguido da medida de pH empregando pHmetro.

3.2.2 Procedimento da reação de derivatização

O reagente 2,4-DNFHI é um agente de derivatização para compostos carbonílicos. A reação de derivatização do FA com 2,4-DNFHI formando 2,4-DNFHO ocorre rapidamente em meio ácido e à temperatura ambiente. Os íons H_3O^+ são fornecidos ao meio através da solução ácida de 2,4-DNFHI (BENASSI; SEMENZATO; BETTERO, 1989).

Ao mesmo tempo, que, o derivado de FA, 2,4-DNFHO é formado em meio ácido, o mesmo também é instável. Segundo Wu, Chang e Chou (2003), o pH final da reação de derivatização, ideal para a estabilidade do 2,4-DNFHO está entre 4,5-6,0. Portanto, uma vez formado o derivado 2,4-DNFHO, adiciona-se tampão citrato (pH 4,5) para estabilizá-lo.

No procedimento de derivatização em tampão citrato (pH 4,5), adicionou-se em um béquer, 1 mL da solução de FA 0,002 % (m/v) em THF 90 % (v/v) (trabalho) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1 % (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N (pH 4,5). Após a agitação durante 2 min., filtrou-se a solução com seringa de vidro (5 mL) acoplada à membrana filtrante de 0,45 μ m.

Uma solução branco também foi preparada através do procedimento de derivatização em tampão citrato (pH 4,5), adicionando-se em um béquer, 1 mL da solução de THF 90 % (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1 % (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N (pH 4,5). Após a agitação durante 2 min., filtrou-se a solução com seringa de vidro (5 mL) acoplada à membrana filtrante de 0,45 μ m.

Após injeção no equipamento CLAE, o tempo de corrida foi programado para 10 min.

3.2.3 Estudo do tempo de reação de derivatização

A reação de derivatização do grupo carbonila com 2,4-DNFHI é uma reação que ocorre rapidamente em meio ácido e à temperatura ambiente. O derivado de FA, o 2,4-DNFHO é separado e identificado por CLAE e detectado por UV-VIS no comprimento de onda de 345 nm. Segundo Benassi, Semenzato e Bettero (1989) e Wu, Chang e Chou (2003), o produto formado, 2,4-DNFHO reage durante um tempo máximo de 3 min.

Benassi, Semenzato e Bettero (1989) sugerem que a reação de derivatização ocorra no tempo de 1 min. com agitação e depois com mais 2 min. em repouso. No estudo de Wu, Chang e Chou (2003), a reação de derivatização ocorre em 3 min. com agitação e não houve tempo de repouso.

Neste trabalho, estudamos os tempos de reação de derivatização de FA com 2,4-DNFHI de 1, 2, 3, 4 e 5 min. com agitação e sem tempo de repouso. Foram preparadas três soluções de trabalho de FA 0,002% (m/v) em 90% de THF (v/v) em 3 balões volumétricos a partir de diluições da solução estoque de FA 0,2% (m/v) em 90% de THF (v/v) como descrito em 3.1.1.

- TEMPO DE REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO – 1 MINUTO

Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução trabalho de FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N. Após 1 min. de agitação com agitador magnético adicionou-se 1 mL da solução tampão de citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. Filtrou-se a solução com seringa de vidro acoplada à membrana filtrante de 0,45 µm. Após a filtração, uma alíquota de 20 µL foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu com injetor automático, detector UV-VIS acoplado a uma coluna Lichrospher de fase reversa (Merck) mantida à temperatura ambiente (21-25 °C). Para a separação e identificação do derivado de FA, 2,4-DNFHO, foi utilizada como fase móvel, a solução de metanol 70% em água (v/v), com velocidade de fluxo e pressão como descritas em 3.1.2. O tempo de corrida no CLAE foi de 10 min. e a detecção do 2,4-DNFHO foi realizada no comprimento de onda (λ) de 345 nm. A reação de derivatização durante 1 min. e a determinação do 2,4-DNFHO foram

realizadas para cada uma das três soluções de FA 0,002% (m/v), obtidas a partir de diluições da solução estoque de FA 0,2% (m/v) em 90% de THF (v/v).

- TEMPO DE REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO – 2 MINUTOS

Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução de trabalho de FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N. Deixou-se em agitação. Após 2 min., adicionou-se 1 mL da solução tampão citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. Filtrou-se a solução com seringa de vidro acoplada à membrana filtrante de 0,45 µm. Após a filtração, uma alíquota de 20 µL foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, nas mesmas condições experimentais como descritas no estudo do tempo reação de 1 min. acima. A reação de derivatização durante 2 min. e a determinação do 2,4-DNFHO foram realizadas para cada uma das três soluções de FA 0,002% (m/v), obtidas a partir de diluições da solução estoque de FA 0,2% (m/v) em 90% de THF (v/v).

- TEMPO DE REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO – 3 MINUTOS

Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução de trabalho de FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N. Deixou-se em agitação. Após 3 min., adicionou-se 1 mL da solução tampão de citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. Filtrou-se a solução com seringa de vidro acoplada à membrana filtrante de 0,45 µm. Após a filtração, uma alíquota de 20 µL foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, nas mesmas condições experimentais como descritas no estudo do tempo reação de 1 min. acima. A reação de derivatização durante 3 min. e a determinação do 2,4-DNFHO foram realizadas para cada uma das três soluções de FA 0,002% (m/v), obtidas a partir de diluições da solução estoque de FA 0,2% (m/v) em 90% de THF (v/v).

- TEMPO DE REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO – 4 MINUTOS

Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução de trabalho de FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N. Deixou-se em agitação. Após 4 min., adicionou-se 1 mL da solução tampão citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. Filtrou-se a solução com seringa de vidro acoplada à membrana filtrante de 0,45 μ m. Após a filtração, uma alíquota de 20 μ L foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, nas mesmas condições experimentais como descritas no estudo do tempo reação de 1 min. acima. A reação de derivatização durante 4 min. e a determinação do 2,4-DNFHO foram realizadas para cada uma das três soluções de FA 0,002% (m/v), obtidas a partir de diluições da solução estoque de FA 0,2% (m/v) em 90% de THF (v/v).

- TEMPO DE REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO – 5 MINUTOS

Em um béquer, adicionou-se 1 mL da solução de trabalho de FA 0,002% (m/v) em THF 90% (v/v) e 1 mL da solução de 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) em ácido clorídrico 0,5 N. Deixou-se em agitação. Após 5 min., adicionou-se 1 mL da solução tampão citrato (pH 4,5) permanecendo em agitação por mais 1 min. Filtrou-se a solução com seringa de vidro acoplada à membrana filtrante de 0,45 μ m. Após a filtração, uma alíquota de 20 μ L foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, nas mesmas condições experimentais como descritas no estudo do tempo reação de 1 min. acima. A reação de derivatização durante 5 min. e a determinação do 2,4-DNFHO foram realizadas para cada uma das três soluções de FA 0,002% (m/v), obtidas a partir de diluições da solução estoque de FA 0,2% (m/v) em 90% de THF (v/v).

Na análise estatística dos resultados obtidos para cada reação de derivatização realizada nos diferentes tempos empregou-se inicialmente o teste de Grubbs para verificação de possíveis valores discrepantes, seguido do teste de Cochran para avaliação da homogeneidade das variâncias, ao nível de significância ($\alpha = 0,05$) através do programa computacional Microsoft Excel[®] versão 2010.

3.2.4 Estudo da estabilidade do produto de derivatização

3.2.4.1 Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, protegido da luz

Segundo Benassi, Semenzato e Bettero (1989) e Wu, Chang e Chou (2003) a estabilidade avaliada no período de 60 min. do derivado de FA, 2,4-DNFHO, obtida pela adição do tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) e neutralização com solução de hidróxido de sódio 1 M varia em função do tempo. A formação do 2,4-DNFHO alcança o valor máximo no tempo de 3 min. e depois sua concentração decresce em função do tempo devido a sua instabilidade em meio ácido (BENASSI; SEMENZATO; BETTERO, 1989; WU; CHANG; CHOU, 2003).

Neste trabalho, o estudo da estabilidade do 2,4-DNFHO foi realizado utilizando a solução tampão citrato (pH 4,5). Após a reação da solução de trabalho de FA 0,002% com a solução de 2,4-DNFH 0,1% (m/v), com agitação durante 2 min., foi adicionado o tampão citrato (pH 4,5) e manteve agitação por mais 1 min. Filtrou-se a solução com seringa de vidro acoplada à membrana filtrante de 0,45 μm . Após a filtração, uma alíquota de 20 μL foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, nas mesmas condições experimentais como descritas no estudo do tempo de reação de 1 min. acima. A solução final foi injetada no equipamento a cada 30 min. num total de 10 injeções. Durante todo o tempo de injeção, o frasco contendo a solução foi mantido dentro do compartimento do injetor, com o objetivo de protegê-lo da luz.

Este procedimento foi realizado durante três dias consecutivos com as mesmas soluções e a cada dia fazia-se a reação de derivatização.

Os resultados do estudo da estabilidade do 2,4-DNFHO foram analisados estatisticamente pelo teste de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados, com o objetivo de avaliar se o coeficiente angular ou a inclinação da reta é significativamente zero. No resultado da regressão avaliou-se o valor de p através do programa computacional Microsoft Excel[®] versão 2010.

3.2.4.2 Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, exposto à luz

Nesse estudo, o procedimento foi o mesmo do item acima, mas durante todo o tempo de injeção, o frasco contendo a solução final foi mantido fora do compartimento do injetor para que ele estivesse exposto à luz.

Este procedimento foi realizado durante três dias consecutivos com as mesmas soluções e a cada dia se efetuava a reação de derivatização.

3.2.5 Determinação da linearidade da curva analítica

A curva analítica foi feita a partir da preparação da solução estoque de FA 0,2% (m/v). Esta foi preparada pesando 0,54 g do reagente FA 37% em balão volumétrico e completando o volume a 100 mL com THF 90% (m/v) (Tabela 1).

Tabela 1 - Preparo da solução estoque

Massa do padrão (g)	Volume do Balão Volumétrico (mL)	Conc. Final de formaldeído (%)
0,5442	100	0,1847

A partir da solução estoque de FA 0,2% (m/v) em THF 90% (v/v), transferiu-se alíquotas de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL para seus respectivos balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com solução de THF 90% (v/v), como mostrado na Tabela 2, abaixo:

Tabela 2 - Preparo das soluções trabalho

Alíquotas (mL) da sol. de FA 0,2% em THF 90% (v/v)	Volume final (mL)	Conc. Final de formaldeído (%)
0,1	25	$7,38 \times 10^{-4}$
0,2	25	$1,47 \times 10^{-3}$
0,3	25	$2,21 \times 10^{-3}$
0,4	25	$2,95 \times 10^{-3}$
0,5	25	$3,69 \times 10^{-3}$
0,6	25	$4,43 \times 10^{-3}$
0,7	25	$5,17 \times 10^{-3}$
0,8	25	$5,91 \times 10^{-3}$

A reação de derivatização do FA com 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) foi realizada de acordo com o descrito no item 3.2.3 (tempo de reação de derivatização 2 min.).

Os resultados obtidos para cada concentração foram testados estatisticamente pelo teste de Grubbs para a verificação de possíveis valores discrepantes, seguido do teste de Cochran para avaliação da homogeneidade das variâncias, este cálculo foi feito pela divisão da maior variância pelo somatório das variâncias, ao nível de significância ($\alpha = 0,05$) através do programa computacional Microsoft Excel[®] versão 2010.

Com as concentrações e as médias das áreas correspondentes construiu-se o gráfico e foi feita a análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Avaliou-se o coeficiente de correlação e o valor p que indica o quanto a inclinação da reta é significativamente diferente de zero. O cálculo do desvio de linearidade foi testado pelo *runs test* empregando o programa computacional GraphPad Prism versão 6.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM AMOSTRA DE PRODUTO CAPILAR

Uma amostra de produto capilar, máscara, na forma de creme branco com ação emoliente, hidratante e *antifrizz* foi analisada quanto a identificação de formaldeído empregando-se a presente metodologia otimizada.

No preparo da amostra pesou-se 1,0 g do produto em balão volumétrico de 100 mL. O produto foi solubilizado em THF 90% (v/v) com auxílio de ultrassom por 10 min. Uma vez solubilizado completou-se o volume a 100 mL com o mesmo diluente (solução A1). Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL da solução anterior foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e diluída com THF 90% (v/v) (solução A2).

A solução de FA foi preparada de acordo com o descrito no item 3.1.1 para a solução B de FA 0,002% (m/v). Para a amostra de produto capilar e para o FA realizou-se a reação de derivatização como definido no item 3.2.3 – Tempo de reação de derivatização – 2 min., porém, no caso da amostra empregou-se 1 mL da solução A2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO pH FINAL DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO FA COM 2,4-DNFHI EM TAMPÃO DE CITRATO

Na Tabela 3 abaixo, os valores de pH determinados ao final da reação de derivatização do FA com 2,4-DNFHI empregando-se três diferentes concentrações de ácido clorídrico.

Tabela 3 - Determinação do pH final da reação de derivatização do FA 0,002% em THF 90% (v/v) com 2,4-DNFH 0,1% (m/v), em tampão citrato pH 4,5 empregando 3 concentrações de ácido clorídrico.

Concentração de ácido clorídrico (N)	pH final da reação
0,5	4,50
1,0	3,46
2,0	0,74

Observou-se uma coloração amarelada para todas as soluções ao final da reação nas 3 concentrações de ácido clorídrico empregadas. O valor de pH igual a 4,50 encontrado pela adição de ácido clorídrico 0,5 N, foi considerado o mais adequado baseado no trabalho publicado por Wu, Chang e Chou (2003), que relata maior estabilidade do 2,4-DNFHO na faixa de pH 4,5-6,0, com ausência de degradação do derivado durante 40 min após sua formação. Porém, neste trabalho, os autores ajustaram o pH da reação de derivatização de FA 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% em ácido clorídrico 2,0 N entre 4,5-6,0 adicionando hidróxido de sódio 1 M e tampão fosfato 0,1 M e verificaram que para valores de pH acima da faixa testada, além da mudança da coloração da solução final de amarelo para vermelho, houve a formação de partículas que poderiam danificar o injetor e o sistema do equipamento de CLAE.

4.2 PROCEDIMENTO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

Uma vez determinado o mais apropriado valor de pH final da reação de derivatização, conforme o item anterior, realizou-se todas as reações de derivatização de FA em THF 90% com 2,4-DNFHI 0,1% em ácido clorídrico 0,5 N.

Após a reação, a solução final filtrada foi injetada no CLAE e no tempo de corrida de 10 min. visualizou-se em 5,5 min. um sinal cromatográfico que representa o excesso de 2,4-DNFHI que é colocado para garantir a reação de todo FA presente, observado nas Figuras 4 e 5, respectivamente obtido a partir das soluções do branco e do FA. Em seguida, em 6,45 min. visualizou-se o sinal cromatográfico do 2,4-DNFHO (Figura 5).

Figura 4 - Cromatograma da solução do branco (THF 90% v/v + 2,4-DNFHI 0,1% m/v + tampão citrato) obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min.

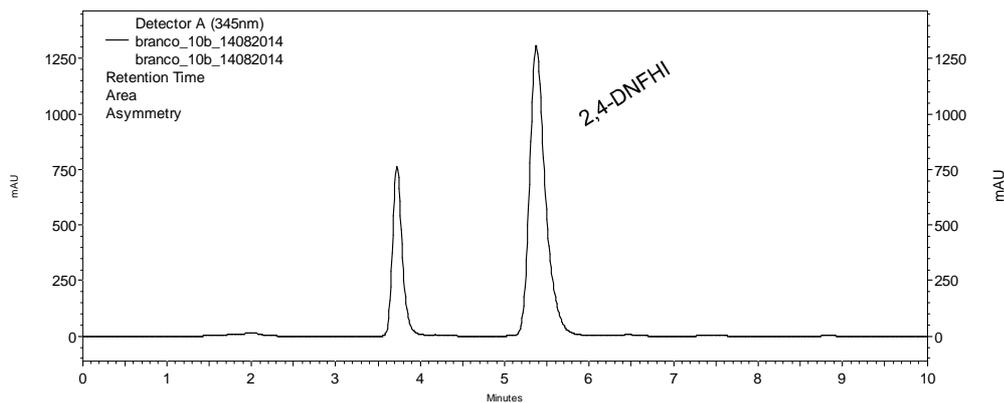
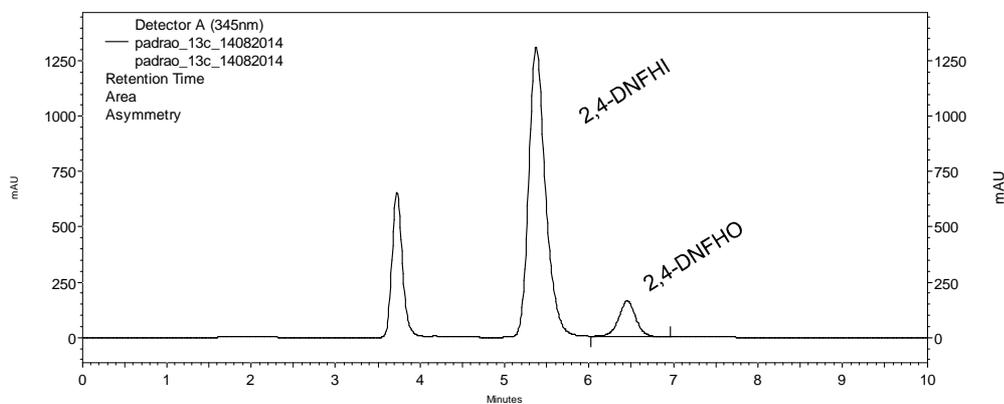


Figura 5 - Cromatograma da 2,4-DNFHI e 2,4-DNFHO através da reação de derivatização da solução de FA 0,002% m/v com 2,4-DNFHI 0,1% m/v obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min. e do 2,4-DNFHO em 6,450 min.



4.3 ESTUDO DO TEMPO DE REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

A partir dos resultados obtidos para cada reação de derivatização realizou-se nos diferentes tempos, o teste de Grubbs para verificação de possíveis valores discrepantes, ao nível de significância ($\alpha = 0,05$) através do programa computacional Microsoft Excel[®] versão 2010.

No tempo de reação de 1 min., nenhum valor discrepante foi detectado, de acordo com o teste de Grubbs, pois os valores de $G_{\text{calculado}}$ (1,46; 1,37 e 1,28) para as reações 1, 2 e 3 foram inferiores ao valor de $G_{\text{crítico}} = 1,48$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Teste de Grubbs realizado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 1 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Leituras	Reação 1	Reação 2	Reação 3
1	3508039	3576515	3765887
2	3763306	3772815	3912569
3	3730255	3752121	3875423
4	3692790	3689812	3833125
MEDIA	3673598	3697816	3846751
DESVIO PADRÃO	114070	88227	62926
$G_{\text{calculado}}$	1,46	1,37	1,28
$G_{\text{crítico}} (n=4; \alpha=0,05)$	1,48		

No tempo de reação de 2 min., nenhum valor discrepante foi detectado, de acordo com o teste de Grubbs, pois os valores de $G_{\text{calculado}}$ (1,40; 1,26 e 1,29) para as reações 1, 2 e 3 foram inferiores ao valor de $G_{\text{crítico}} = 1,48$ (Tabela 5).

Tabela 5 - Teste de Grubbs realizado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Leituras	Reação 1	Reação 2	Reação 3
1	3727289	4032172	3821146
2	3841466	4129128	3894136
3	3811716	4102192	3859378
4	3800915	4074405	3822633
MEDIA	3795347	4084474	3849323
DESVIO PADRÃO	48504	41412	34716
G_{calculado}	1,40	1,26	1,29
G_{crítico} (n=4;α=0,05)	1,48		

No tempo de reação de 3 min., nenhum valor discrepante foi detectado, de acordo com o teste de Grubbs, pois os valores de $G_{\text{calculado}}$ (1,20; 1,24 e 1,26) para as reações 1, 2 e 3 foram inferiores ao valor de $G_{\text{crítico}} = 1,48$ (Tabela 6).

Tabela 6 - Teste de Grubbs realizado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 3 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Leituras	Reação 1	Reação 2	Reação 3
1	3612511	3624982	3729288
2	3653563	3630500	3738757
3	3633243	3612671	3721230
4	3631080	3600901	3716675
MEDIA	3632599	3617264	3726488
DESVIO PADRÃO	16790	13211	9701
G_{calculado}	1,20	1,24	1,26
G_{crítico} (n=4;α=0,05)	1,48		

No tempo de reação de 4 min., foi encontrado um valor discrepante ($G_{\text{calc}} = 1,48$) na reação 1 e este foi rejeitado, de acordo com o teste de Grubbs (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de Grubbs realizado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 4 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Leituras	Reação 1	Reação 2	Reação 3
1	3546800	3522688	3676420
2	3577815	3518027	3687559
3	3575210	3500141	3675967
4	3572365	3498061	3682721
MEDIA	3568048	3509729	3680667
DESVIO PADRÃO	14339	12448	5533
G_{calculado}	1,48	1,04	1,25
G_{crítico} (n=4;α=0,05)	1,48		

O valor discrepante na reação 1 foi rejeitado e o teste de Grubbs foi refeito para n=3. No novo cálculo, nenhum valor discrepante foi detectado, pois o valor de $G_{\text{calculado}}$ (1,01) para a reação 1 foi inferior ao valor de $G_{\text{crítico}} = 1,15$ (Tabela 8).

Tabela 8 - Teste de Grubbs refeito nas áreas do cromatograma sem o valor discrepante, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 4 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Leituras	Reação 1
1	
2	3577815
3	3575210
4	3572365
MEDIA	3575130
DESVIO PADRÃO	2726
G_{calculado}	1,01
G_{crítico} (n=3;α=0,05)	1,15

No tempo de reação de 5 min., nenhum valor discrepante foi detectado, de acordo com o teste de Grubbs, pois os valores de $G_{\text{calculado}}$ (1,46; 1,46 e 1,27) para as reações 1, 2 e 3 foram inferiores ao valor de $G_{\text{crítico}} = 1,48$ (Tabela 9).

Tabela 9 - Teste de Grubbs realizado nas áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% no tempo de 5 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

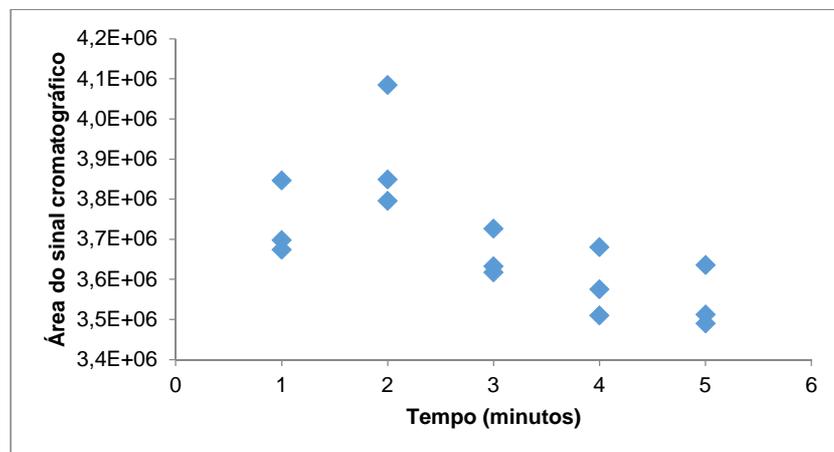
Leituras	Reação 1	Reação 2	Reação 3
1	3506855	3541951	3620527
2	3522242	3483878	3634450
3	3508636	3466982	3636337
4	3510841	3468564	3653012
MEDIA	3512144	3490344	3636082
DESVIO PADRÃO	6927	35238	13308
G_{calculado}	1,46	1,46	1,27
G_{crítico (n=4;α=0,05)}	1,48		

Após o teste de Grubbs foi calculado a média em cada reação de derivatização (Tabela 10) nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 min. e, em seguida, representada graficamente (Figura 6).

Tabela 10 - Médias das leituras das áreas do cromatograma (dados em Tabelas 4-9) correspondentes ao sinal do 2,4-DNFHO, produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI 0,1% nos tempos 1, 2, 3, 4 e 5 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

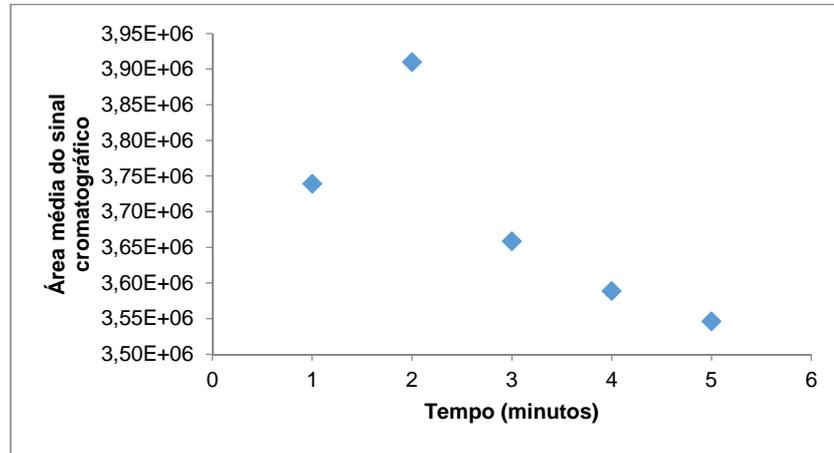
REAÇÃO	TEMPO DE REAÇÃO				
	1 min.	2 min.	3 min.	4 min.	5 min.
1	3673598	3795347	3632599	3575130	3512144
2	3697816	4084474	3617264	3509729	3490344
3	3846751	3849323	3726488	3680667	3636082
MEDIA	3739388	3909715	3658783	3588509	3546190

Figura 6 - Efeito da adição do tampão citrato pH 4,5 na estabilidade do 2,4-DNFHO, em função do tempo de reação, usando solução de formaldeído 0,002% em THF:água (9:1). Médias das leituras das áreas do sinal cromatográfico (dados constantes nas Tabelas 4-9).



Abaixo, a Figura 7 refere-se a média da área do sinal cromatográfico de cada tempo de reação. No tempo de reação de 2 min. foi alcançado o melhor resultado.

Figura 7 – Valor médio da área do sinal cromatográfico em cada tempo de reação (dados constantes na Tabela 10) ao adicionar tampão citrato pH 4,5 para estabilizar o 2,4-DNFHO, usando solução de formaldeído 0,002% em THF:água (9:1).



Com os valores das variâncias de cada tempo de reação de derivatização (1, 2, 3, 4 e 5 min.) foi feito o teste de Cochran (Tabela 11). A partir deste teste observou-se que os tempos de reação 1, 2 e 3 min. apresentavam homogeneidade entre as variâncias.

Tabela 11 - Valores das variâncias de cada reação e Teste de Cochran nos tempos de reação de 1, 2, 3, 4 e 5 min.

TEMPO (MINUTOS)	1	2	3	4	5
REAÇÃO 1	13011885419	2352600103	281913045	7430425	47982332
REAÇÃO 2	7783959881	1714930401	174534212	154954817	1241747682
REAÇÃO 3	3959582360	1205202474	94103297	30615196	177103791
Σ	24755427660	5272732979	550550555	193000438	1466833806
Ccalc	0,526	0,446	0,512	0,803	0,846
Ccrit	0,798				
	homogêneo	homogêneo	homogêneo	heterogêneo	heterogêneo

4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PRODUTO DE DERIVATIZAÇÃO

4.4.1 Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, protegido da luz

No estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, quando protegido da luz, os resultados foram avaliados estatisticamente através do teste de regressão pelo método dos mínimos quadrados no programa computacional Microsoft Excel[®].

No primeiro dia de estudo do ensaio da estabilidade o produto formado, 2,4-DNFHO, foi injetado durante um período total de 270 min., conforme a Tabela 12. No tempo de 90 min. (Figura 8) foi encontrado o valor do coeficiente angular da reta de melhor ajuste tendendo a zero e o valor para p igual a 0,1954, considerando o nível de significância 5%.

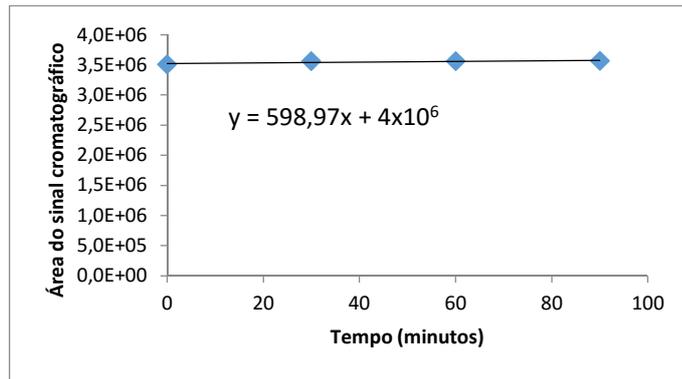
Tabela 12 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO², produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Tempo (minutos)	Área do sinal cromatográfico
0	3506046
30	3563407
60	3559296
90	3567313
120	3602970
150	3649298
180	3648122
210	3690612
240	3734155
270	3727956

¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

²2,4-Dinitrofenilhidrazona

Figura 8 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.



¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

No segundo dia de estudo do ensaio da estabilidade o produto formado, 2,4-DNFHO, foi injetado durante um período total de 270 min., conforme a Tabela 13. No tempo de 90 min. (Figura 9) foi encontrado o valor do coeficiente angular da reta de melhor ajuste tendendo a zero e o valor para p igual a 0,1531, considerando o nível de significância 5%.

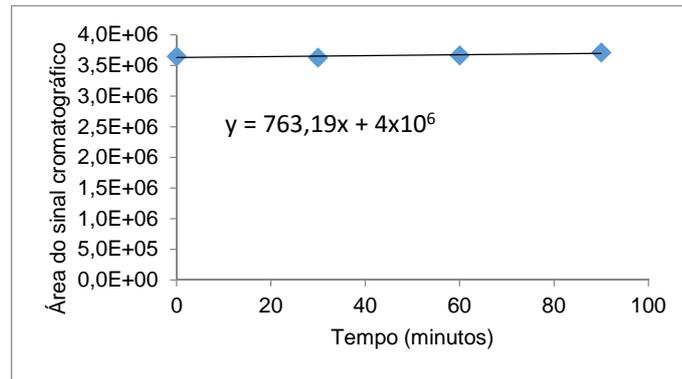
Tabela 13 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO², produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Tempo (minutos)	Área do sinal cromatográfico
0	3644744
30	3627950
60	3664736
90	3708801
120	3767834
150	3808449
180	3852714
210	3879765
240	3886742
270	3933561

¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

²2,4-Dinitrofenilhidrazona

Figura 9 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFH¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.



¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

No terceiro dia de estudo do ensaio da estabilidade o produto formado, 2,4-DNFHO, foi injetado durante um período total de 270 min., conforme a Tabela 14. No tempo de 90 min. (Figura 10) foi encontrado o valor do coeficiente angular da reta de melhor ajuste tendendo a zero e o valor para p igual a 0,4992, considerando o nível de significância 5%.

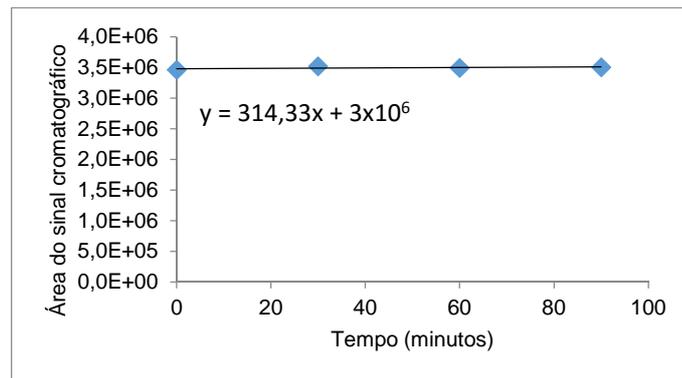
Tabela 14 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO², produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFH¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Tempo (minutos)	Área do sinal cromatográfico
0	3460734
30	3518365
60	3489529
90	3501779
120	3558279
150	3596326
180	3637053
210	3655030
240	3678981
270	3700159

¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

²2,4-Dinitrofenilhidrazona

Figura 10 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFH¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.



¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

Ao final dos 3 dias de estudo da estabilidade do produto formado, quando protegido da luz, observou-se que uma vez realizada a reação de derivatização, o produto formado, 2,4-DNFHO se mantém estável durante o período de 90 min. em 100% dos ensaios realizados.

4.4.2 Estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, exposto à luz

No estudo da estabilidade do produto formado, 2,4-DNFHO, quando exposto à luz, os resultados foram avaliados estatisticamente através do teste de regressão pelo método dos mínimos quadrados no programa computacional Microsoft Excel[®].

No primeiro dia de estudo do ensaio da estabilidade o produto formado, 2,4-DNFHO, foi injetado durante um período total de 270 min., conforme a Tabela 15. No tempo de 90 min. (Figura 11) foi encontrado o valor do coeficiente angular da reta de melhor ajuste tendendo a zero e o valor para p igual a 0,1629, considerando o nível de significância 5%.

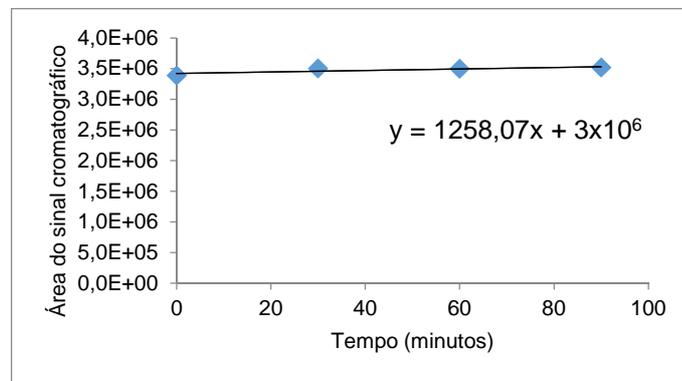
Tabela 15 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO², produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Tempo (minutos)	Área do sinal cromatográfico
0	3388719
30	3500120
60	3494200
90	3516499
120	3579179
150	3632055
180	3679413
210	3689267
240	3736745
270	3753745
MÉDIA	3596994

¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

²2,4-Dinitrofenilhidrazona

Figura 11 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.



¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

No segundo dia de estudo do ensaio da estabilidade o produto formado, 2,4-DNFHO, foi injetado durante um período total de 270 min., conforme a Tabela 16. No tempo de 90 min. (Figura 12) foi encontrado o valor do coeficiente angular da reta de melhor ajuste tendendo a zero e o valor para p igual a 0,1238, considerando o nível de significância 5%.

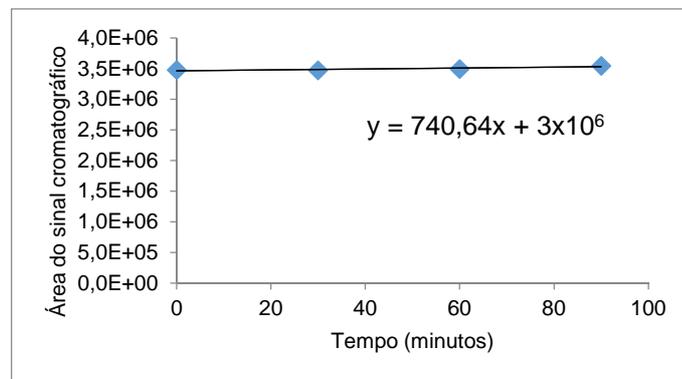
Tabela 16 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO², produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Tempo (minutos)	Área do sinal cromatográfico
0	3475448
30	3471622
60	3491958
90	3542733
120	3633429
150	3658696
180	3705747
210	3711775
240	3748463
270	3797330
MÉDIA	3623720

¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

²2,4-Dinitrofenilhidrazona

Figura 12 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.



¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

No terceiro dia de estudo do ensaio da estabilidade o produto formado, 2,4-DNFHO, foi injetado durante um período total de 270 min., conforme a Tabela 17. No tempo de 60 min. (Figura 13) foi encontrado o valor do coeficiente angular da reta de melhor ajuste tendendo a zero e o valor para p igual a 0,1349, considerando o nível de significância 5%.

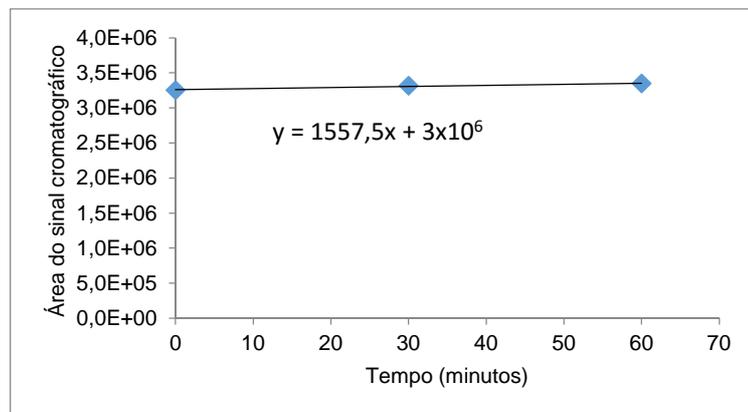
Tabela 17 - Áreas do cromatograma, correspondente ao sinal do 2,4-DNFHO², produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.

Tempo (minutos)	Área do sinal cromatográfico
0	3254424
30	3318564
60	3347875
90	3427847
120	3488209
150	3539769
180	3574219
210	3606089
240	3635746
270	3671654
MÉDIA	3486440

¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

²2,4-Dinitrofenilhidrazona

Figura 13 - Gráfico da estabilidade do produto da reação de derivatização do formaldeído 0,002% com 2,4-DNFHI¹ 0,1% no tempo de 2 min., no cromatógrafo SHIMADZU LC-10ADvp.



¹2,4-Dinitrofenilhidrazina

Ao final dos 3 dias de estudo da estabilidade do produto formado, quando exposto à luz, observa-se que uma vez realizada a reação de derivatização, o produto formado, 2,4-DNFHO se mantém estável durante o período de 90 min. em 67% dos ensaios realizados.

4.5 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA

Na análise estatística dos resultados obtidos para cada concentração da curva analítica através da reação de derivatização no tempo de 2 min. empregou-se inicialmente o teste de Grubbs para a verificação da ausência de valores discrepantes, seguido do teste de Cochran para avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos, ao nível de significância ($\alpha = 0,05$) através do programa computacional Microsoft Excel[®] versão 2010 e GraphPad Prism versão 6.

As soluções de trabalho usadas na construção da curva analítica do formaldeído foram injetadas e obteve-se as áreas do sinal cromatográfico, conforme descrito na Tabela 18.

Os valores extremos foram avaliados pelo teste de Grubbs e três valores discrepantes foram rejeitados, respectivamente, os pontos da curva analítica 2, 5 e 6.

Tabela 18 - Teste de Grubbs para avaliação de valores discrepantes (*outliers*) para cada nível de concentração da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE¹ através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI² 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.

Concentrações de formaldeído (% m/v)								
	7,38x10 ⁻⁴	1,47x10 ⁻³	2,21x10 ⁻³	2,95x10 ⁻³	3,69x10 ⁻³	4,43x10 ⁻³	5,17x10 ⁻³	5,91x10 ⁻³
Áreas do sinal cromatográfico								
	1117272	2228280	3371862	4539824	5656314	7086376	8078403	8054935
	1144377	2246937	3401331	4589561	5801115	7145839	8099458	8087642
	1136695	2247779	3382726	4567489	5781132	7154852	8083152	8100714
Média	1132781	2240999	3385306	4565625	5746187	7129022	8087004	8081097
Desvio padrão	13970	11023	14903	24921	78471	37207	11043	23581
Teste de Grubbs: valores calculados de G (Gcalculado < Gcrítico)								
Valores extremos (inferior)	1,11	1,15	0,90	1,04	1,15	1,15	0,78	1,11
Valores extremos (superior)	0,83	0,62	1,08	0,96	0,70	0,69	1,13	0,83
G_{crítico} n=3 $\alpha = 0,05$	1,15							

¹Cromatografia líquida de alta eficiência

²2,4-Dinitrofenilhidrazina

³Coefficiente de variação

A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Cochran e nenhum ponto foi rejeitado (Tabela 19). Com esses valores, a curva analítica do formaldeído foi construída (Tabela 20).

Tabela 19 - Teste de Cochran para avaliação da homogeneidade da variância da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE¹ através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI² 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.

Concentrações de formaldeído (% m/v)								
	$7,38 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-3}$	$2,21 \times 10^{-3}$	$2,95 \times 10^{-3}$	$3,69 \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^{-3}$	$5,17 \times 10^{-3}$	$5,91 \times 10^{-3}$
Áreas do sinal cromatográfico								
	1117272		3371862	4539824			8078403	8054935
	1144377	2246937	3401331	4589561	5801115	7145839	8099458	8087642
	1136695	2247779	3382726	4567489	5781132	7154852	8083152	8100714
Variância	195157846	354482	222099080	621049096	199660144	40617084	121958610	556056979
Σ^3	1956953323							
Teste de Cochran (Ccalculado < Ccrítico)								
C _{calculado}	0,317							
C _{crítico} K ⁴ =8; n ⁵ =3; $\alpha=0,05$	0,516							

¹Cromatografia líquida de alta eficiência

²2,4-Dinitrofenilhidrazina

³Somatório das variâncias

⁴número de níveis de concentração

⁵número de replicata em cada nível de concentração

Tabela 20 - Curva analítica do formaldeído obtida por CLAE¹ através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI² 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.

Conc. de formaldeído (% m/v)	Áreas do sinal cromatográfico de 2,4-DNFHO ³
$7,38 \times 10^{-4}$	1132781
$1,47 \times 10^{-3}$	2247358
$2,21 \times 10^{-3}$	3385306
$2,95 \times 10^{-3}$	4565625
$3,69 \times 10^{-3}$	5791124
$4,43 \times 10^{-3}$	7150346
$5,17 \times 10^{-3}$	8087004
$5,91 \times 10^{-3}$	8081097

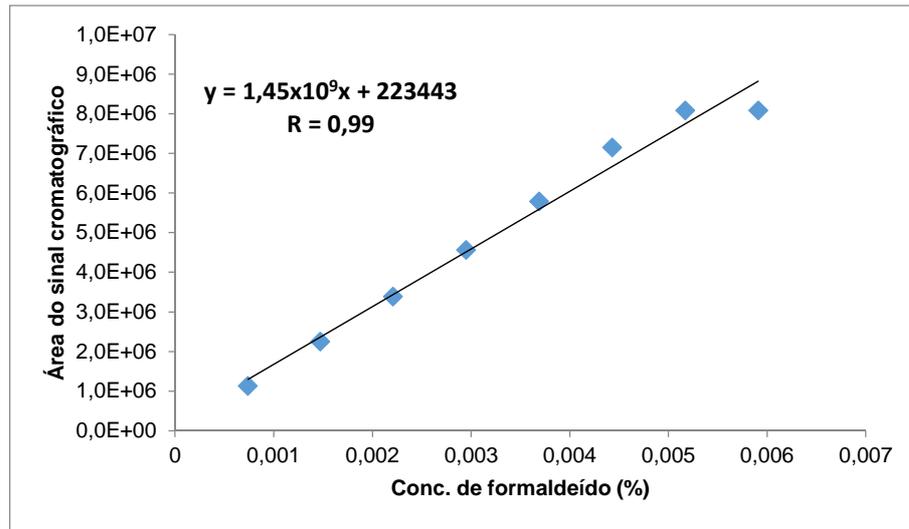
¹Cromatografia líquida de alta eficiência

²2,4-Dinitrofenilhidrazina

³2,4-Dinitrofenilhidrazona

A partir da Tabela 20 foi construída a reta de melhor ajuste e encontrado o coeficiente angular (inclinação) igual a 223443 e o coeficiente linear (interseção) igual a $1,45 \times 10^9$ valores necessários para construção da equação da reta (Figura 14). Também observa-se o coeficiente de determinação igual a 0,98 e a partir deste calculamos o coeficiente de correlação igual a 0,99.

Figura 14 - Representação gráfica da Curva analítica do formaldeído



O teste de significância da regressão e desvio da linearidade foi realizado através da análise de regressão linear (GraphPad Prism[®]) (Tabela 21). Neste programa de cálculo estatístico o valor encontrado para p observado para a regressão foi inferior a 0,0001 indicando que a regressão é altamente significativa. O valor da significância p observado para o desvio da linearidade foi superior a 0,05 indicando que a falta de ajuste não é significativa.

Tabela 21 - Análise da regressão

SLOPE	
P	< 0,0001
Desvio do zero	Significativo
LINEARIDADE	
P	0,1143
Desvio da linearidade	Não significativo

As soluções de trabalho usadas na construção da curva analítica do formaldeído foram injetadas e obteve-se as áreas do sinal cromatográfico, conforme descrito na Tabela 22.

Os valores extremos foram avaliados pelo teste de Grubbs e nenhum valor foi rejeitado.

Tabela 22 - Teste de Grubbs para avaliação de valores discrepantes (*outliers*) para cada nível de concentração da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE¹ através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI² 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.

Concentrações de formaldeído (% m/v)								
	7,38x10 ⁻⁴	1,47x10 ⁻³	2,21x10 ⁻³	2,95x10 ⁻³	3,69x10 ⁻³	4,43x10 ⁻³	5,17x10 ⁻³	5,91x10 ⁻³
Áreas do sinal cromatográfico								
	742775	1355015	2097361	2926773	3784534	4825871	5489013	5211644
	728282	1378120	2135103	2980174	3858621	4906398	5566581	5263007
	725906	1419244	2173628	3019237	3919686	4952465	5684469	5426958
Média	732321	1384126	2135364	2975395	3854280	4894911	5580021	5300536
Desvio padrão	9131	32533	38134	46417	67680	64074	98419	112456
Teste de Grubbs: valores calculados de G (Gcalculado < Gcrítico)								
Valores extremos (inferior)	0,70	0,89	1,00	1,05	1,03	1,08	0,92	0,79
Valores extremos (superior)	1,14	1,08	1,00	0,94	0,97	0,90	1,06	1,12
G_{crítico} n=3 α = 0,05	1,15							

¹Cromatografia líquida de alta eficiência

²2,4-Dinitrofenilhidrazina

³Coefficiente de variação

A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Cochran (Tabela 23) e nenhum ponto foi rejeitado. Com esses valores a curva analítica do formaldeído foi construída.

Tabela 23 - Teste de Cochran para avaliação da homogeneidade da variância da curva analítica do formaldeído obtida por CLAE¹ através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI² 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.

Concentrações de formaldeído (% m/v)								
	7,38x10 ⁻⁴	1,47x10 ⁻³	2,21x10 ⁻³	2,95x10 ⁻³	3,69x10 ⁻³	4,43x10 ⁻³	5,17x10 ⁻³	5,91x10 ⁻³
Áreas do sinal cromatográfico								
	742775	1355015	2097361	2926773	3784534	4825871	5489013	5211644
	728282	1378120	2135103	2980174	3858621	4906398	5566581	5263007
	725906	1419244	2173628	3019237	3919686	4952465	5684469	5426958
Variância	83375931	1058398140	1454214913	2154529344	4580646816	4105467842	9686237184	12646367794
Σ	35769237965,7							
Teste de Cochran (Ccalculado < Ccrítico)								
C _{calculado}	0,354							
C _{crítico} k ² =8; n ⁵ =3; α=0,05	0,516							

¹Cromatografia líquida de alta eficiência

²2,4-Dinitrofenilhidrazina

³Somatório das variâncias

⁴número de níveis de concentração

⁵número de replicata em cada nível de concentração

Tabela 24 - Curva analítica do formaldeído obtida por CLAE¹ através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI² 0,1% m/v em ácido clorídrico 0,5 N no tempo de 2 min.

Conc. de formaldeído (% m/v)	Áreas do sinal cromatográfico de 2,4-DNFHO ³
7,38x10 ⁻⁴	732321
1,47x10 ⁻³	1384126
2,21x10 ⁻³	2135364
2,95x10 ⁻³	2975395
3,69x10 ⁻³	3854280
4,43x10 ⁻³	4894911
5,17x10 ⁻³	5580021
5,91x10 ⁻³	5300536

¹Cromatografia líquida de alta eficiência

²2,4-Dinitrofenilhidrazina

³2,4-Dinitrofenilhidrazona

A partir da Tabela 24 foi construída a reta de melhor ajuste e obtido o valor do coeficiente angular (inclinação) igual a 35605 e o coeficiente linear (interseção) igual a 1,00x10⁹ valores necessários para construção da equação da reta (Figura 15).

Também foi obtido o coeficiente de determinação igual a 0,97 e a partir deste calculamos o coeficiente de correlação igual a 0,98

Figura 15 - Curva analítica do formaldeído

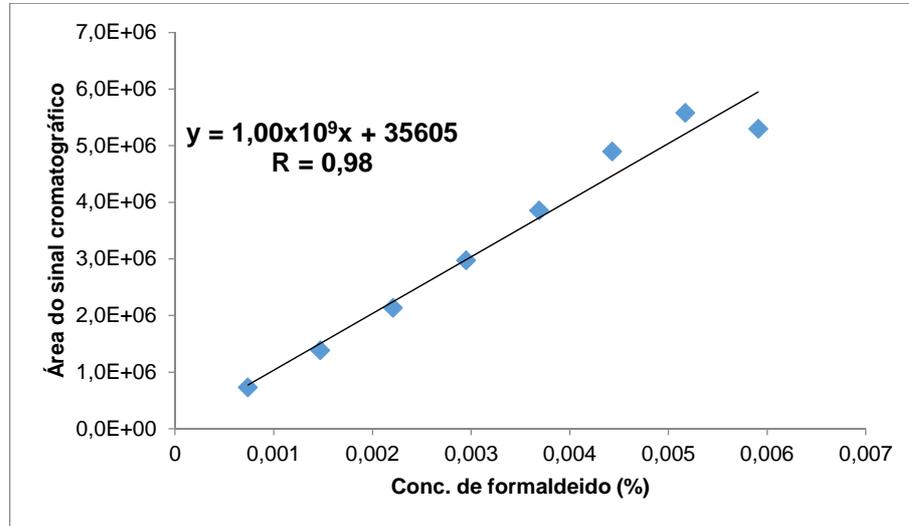


Tabela 25 - Análise da regressão linear

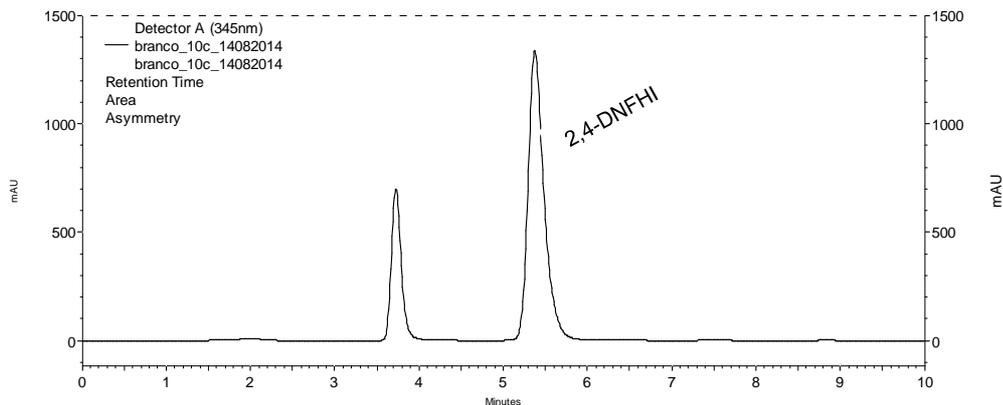
SLOPE	
p	< 0,0001
Desvio do zero	Significativo
LINEARIDADE	
p	0,1429
Desvio da linearidade	Não significativo

O teste de significância da regressão e desvio da linearidade foi realizado através do teste de regressão linear (GraphPad Prism[®]). O valor da significância p observado para a regressão foi inferior a 0,0001 indicando que a regressão é altamente significativa. O valor da significância p observado para o desvio da linearidade foi superior a 0,05 indicando que a falta de ajuste não é significativa (Tabela 25).

4.6 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DE FORMALDEIDO EM AMOSTRA DE PRODUTO CAPILAR

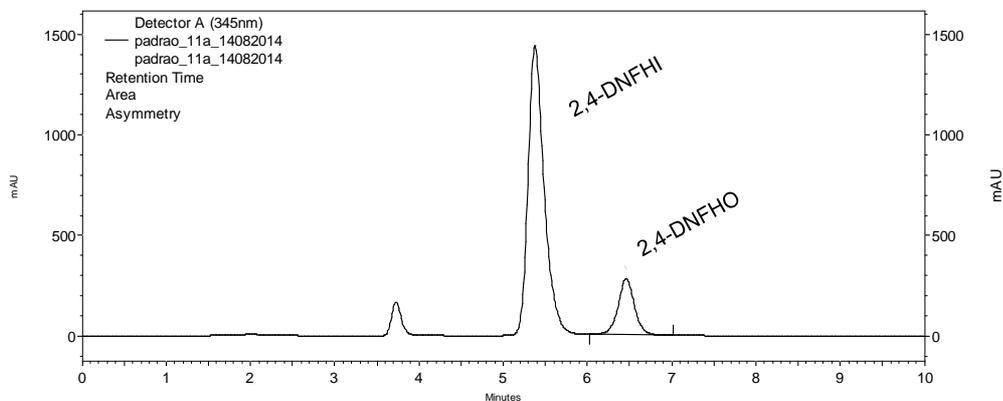
Na solução do branco injetada visualizou-se em 5,5 min. um sinal cromatográfico que representa o excesso de 2,4-DNFHI, colocado para garantir a reação de todo FA presente, conforme a Figura 16.

Figura 16 - Cromatograma da solução do branco (THF 90% v/v + 2,4-DNFHI 0,1% m/v + tampão citrato) obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min.



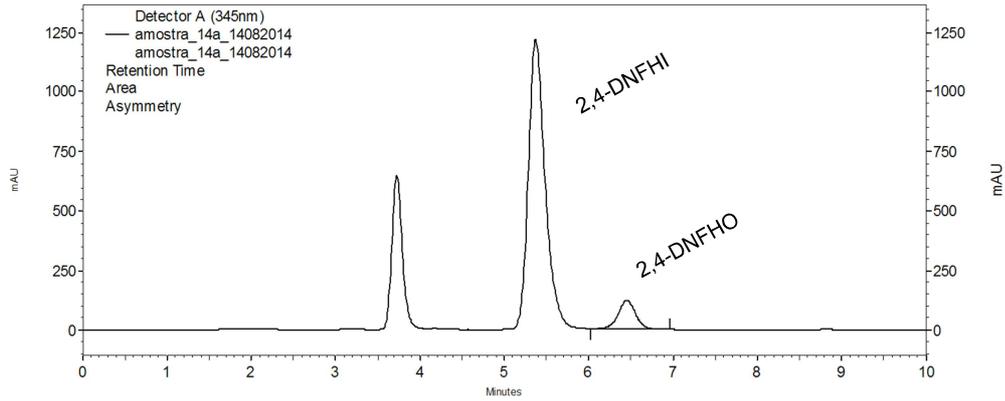
Na solução de FA 0,002% (m/v) com 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) injetada visualizou-se em 5,5 min. o sinal cromatográfico do excesso de 2,4-DNFHI e, em seguida, em 6,458 min. visualizou-se o sinal cromatográfico do 2,4-DNFHO (Figura 17).

Figura 17 - Cromatograma da 2,4-DNFHI e 2,4-DNFHO através da reação de derivatização da solução de FA 0,002% m/v com 2,4-DNFHI 0,1% m/v obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min. e do 2,4-DNFHO em 6,458 min.



Na solução da amostra de um produto capilar com 2,4-DNFHI 0,1% (m/v) visualizou-se em 5,5 min. o sinal cromatográfico do excesso de 2,4-DNFHI e, em seguida, em 6,458 min. visualizou-se o sinal cromatográfico do 2,4-DNFHO (Figura 18).

Figura 18 - Cromatograma da 2,4-DNFHI e 2,4-DNFHO através da reação de derivatização da solução da amostra de um produto capilar com 2,4-DNFHI 0,1% m/v obtido por CLAE. O sinal do 2,4-DNFHI foi detectado no tempo de retenção de 5,5 min. e do 2,4-DNFHO em 6,458 min.



5 CONCLUSÃO

O método de CLAE empregando coluna de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano e fase móvel a solução de metanol em água 70% (v/v) foi otimizado para a identificação e quantificação de FA em produtos capilares através da reação de derivatização com 2,4-DNFHI em tampão citrato.

- O pH ideal da reação foi determinado como 4,5
- O tempo de reação ideal do FA com 2,4-DNFHI foi estabelecido em 2 min.
- A faixa de trabalho definida de $7,38 \times 10^{-4}$ a $5,17 \times 10^{-3}$ % (m/v) foi considerada linear.
- O produto formado 2,4-DNFO apresentou alta estabilidade (90 min.) em 100% dos ensaios realizados quando protegido da luz.
- O método mostrou-se adequado e eficiente na separação e identificação do FA em matrizes complexas como as amostras de produto capilar.

PERSPECTIVAS

Uma vez otimizado o método a próxima etapa será a sua validação intra e interlaboratorial visando o estabelecimento de um programa de monitoramento em parceria com as Vigilâncias Sanitárias Municipal e Estadual e com a ANVISA, para avaliar a qualidade dos produtos capilares comercializados.

Outra iniciativa seria a organização de cursos de capacitação profissional para os analistas da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária para o controle da qualidade desses produtos.

Propor a inclusão do método de análise do FA por CLAE no “Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos” publicado pela ANVISA em 2008 em substituição ao atualmente preconizado (ANVISA, 2008).

REFERÊNCIAS

ABIHPEC. **Panorama do setor de HPPC**. São Paulo, 2014a. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/2014-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-DEZ-2014.pdf>>. Acesso em: 16 jan 2015.

_____. **Informativo PDS/HPPC**. São Paulo, 2014b. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/PublishingImages/HPPC/2014-NEWSLETTER%20PDS-HPPC-MAR%C3%87O_ABRIL.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2015.

ANVISA. **Agência: missão**. Brasília, 2014a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

_____. **Início: Cosméticos / Orientações ao consumidor / Formol e glutaraldeído como alisantes – Diga não ao uso indevido**. Brasília, 2014b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Cosmeticos/Assuntos+de+Interesse/Orientacoes+ao+Consumidor>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 2010.

ANVISA. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2008.

ATSDR. **Toxicological Profile for Formaldehyde**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp111.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

BARBARA, M. C. S; MIYAMARU, L. L. Resultados das análises de alisantes capilares. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 5, p.9-12, 2008.

BAIN & COMPANY. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira: relatório 4 - cosméticos e higiene pessoal**. Rio de Janeiro: BNDES, 2014. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/pdf/estudos-bndes.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

BENASSI, C. A.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. High-performance liquid chromatographic determination of free formaldehyde in cosmetics. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 464, p. 387-393, 1989.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 ago. 1977. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6437.htm>. Acesso em: 16 jan 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9782.htm>. Acesso em: 16 jan 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 35, de 3 de junho de 2008. Dispõe sobre conservantes permitidos para produtos saneantes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 jun. 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0035_03_06_2008.html>. Acesso em: 07 jul. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 91, de 28 de novembro de 2008. Proíbe o uso isolado de produtos que contenham paraformaldeído ou formaldeído para desinfecção e esterilização, regulamenta o uso de produtos que contenham tais substâncias em equipamentos de esterilização e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 nov. 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0091_28_11_2008.html>. Acesso em: 07 jul. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 36, de 17 de junho de 2009. Dispõe sobre a proibida a exposição, a venda e a entrega ao consumo de formol ou de formaldeído (solução a 37%) em drogaria, farmácia, supermercado, armazém e empório, loja de conveniência e drugstore. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 jun. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/legis/rdc36_2009.pdf>. Acesso em: 18 nov 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 15, de 26 de março de 2013. Aprova o Regulamento Técnico "LISTA DE SUBSTÂNCIAS DE USO COSMÉTICO: ACETATO DE CHUMBO, PIROGALOL, FORMALDEÍDO E PARAFORMALDEÍDO" e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 mar. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2fc5fe804fe2b241946dfcece77a031c/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+19+de+11+de+abril+de+2013GGCOS.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 19 fev 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 fev. 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/05d3c180476a770fb6d4b697f5c37773/Resolu%C3%A7%C3%A3o++RDC+n%C2%BA+7+de+10+de+fevereiro+de+2015.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 fev 2015.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma regulamentadora nº 15, de 8 de junho de 1978. Atividades e operações insalubres. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 jul. 1978. Disponível em: <[http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A47594D040147D14EAE840951/NR-15%20\(atualizada%202014\)](http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A47594D040147D14EAE840951/NR-15%20(atualizada%202014))>. Acesso em: 09 jan 2015.

CASANOVA, M. et al. Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of rhesus monkeys: pharmacokinetics, rat-to-monkey interspecies scaling, and extrapolation to man. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, p. 409-428, 1991.

CASANOVA, M. et al. DNA–protein crosslinks and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 23, p. 525-536, 1994.

COSTA, S. et al. Increased levels of chromosomal aberrations and DNA damage in a group of workers exposed to formaldehyde. **Mutagenesis**, v. 30, p. 463-473, 2015.

EDUARDO, M. B. P. **Vigilância Sanitária**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998. (Série Saúde & Cidadania).

E.J. Calabrese and E.M. Kenyon. *Air Toxics and Risk Assessment*. Lewis Publishers, Chelsea, MI. 1991.

EPA. 2008. Registration Eligibility Decision for Formaldehyde and Paraformaldehyde. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/REDS/formaldehyde-red.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

FORMALDEHYDE. In: *CHEMICAL Economics Handbook*. Menlo Park: HIS, 2012. Disponível em: <<https://www.ihs.com/products/formaldehyde-chemical-economics-handbook.html>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

GOLDEN, R.; PYATT, D.; SHIELDS, P.G. Formaldehyde as a potential human leukemogen: an assessment of biological plausibility. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, p.135-153, 2006.

HECK, H.; CASANOVA, M. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 92-106, 2004.

HSDB. **Formaldehyde**. Bethesda: National Library of Medicine, 2009. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

IARC. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. v. 62. Lyon: WHO, 1995. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol62/mono62.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v. 88. Lyon: WHO, 2006. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/mono88.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v. 100f. Lyon: WHO, 2012. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

INCA. **Formol ou Formaldeído.** Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795>. Acesso em: 23 jun. 2015.

INCQS. **Apresentação.** Rio de Janeiro, [2010a]. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57>. Acesso em: 18 jan. 2015.

_____. **Atividades.** Rio de Janeiro, [2010b]. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=68>. Acesso em: 18 jan. 2015.

_____. **História.** Rio de Janeiro, [2010c]. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=820%3Ahistoria&catid=145>. Acesso em 18 jan. 2015.

_____. **Organograma do INCQS.** Rio de Janeiro, [2010d]. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=206>. Acesso em: 18 jan. 2015.

Kulle, T. J. et al. Formaldehyde Dose-Response in healthy nonsmokers. **JAPCA**, v. 37, p. 919-924, 1987.

Lide, D.R., ed. (2003) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Ed., Boca Raton, FL, CRC Press, p. 3-288

LIN, Y.-L. et al. Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 36, p. 6377-6381, 2009.

MANELI, M. H.; SMITH, P.; KHUMALO, N. P. Elevated formaldehyde concentration in "Brazilian keratin type" hair-straightening products: a cross-sectional study. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 2, p. 276-280, 2014.

MERCK, O.; SPEIT, G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, p. 260-268, 1998.

PYATT, D.; NATELSON, E.; GOLDEN, R. Is inhalation exposure to formaldehyde a biologically plausible cause of lymphohematopoietic malignancies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 119-133, 2008.

ROZENFELD, S. (Org.). **Fundamentos da vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000.

Schachter, E. N. et al. A study of respiratory effects from exposure to 2.0 ppm formaldehyde in occupationally exposed workers. **Environmental Research**, v. 44, p. 188-205, 1987.

SCHMID, O.; SPEIT, G. Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies. **Mutagenesis**, v. 22, p. 69-74, 2007.

SILVA, A. S.; DORIA, S. R. Determinação direta do formaldeído em cosméticos por cromatografia líquida de alta resolução em sistemas heterofásicos. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 16, 2011, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: SBQ, 2011.

SILVA, G.L.; PRETE, M.C.; GALÃO, O.F. Determinação de formol em amostras de produtos de alisamento capilar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, p. 167-170, 2013.

SPEIT, G. et al. Inhalation of formaldehyde does not induce systemic genotoxic effects in rats. **Mutation Research**, v. 677, p. 76-85, 2009.

_____. Genotoxic effects of formaldehyde in the human lung cell line A549 and in primary human nasal epithelial cells. **Environmetal and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 300-307, 2008.

SPEIT, G.; MERK, O. Evaluation of mutagenic effects of formaldehyde in vitro: detection of crosslinks and mutations in mouse lymphoma cells. **Mutagenesis**, v. 17, p. 183-187, 2002.

UCHIYAMA, S.; INABA, Y.; KUNUGITA, N. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1282-1289, 2011.

World Health Organization. Environmental Health Criteria for Formaldehyde. Volume 89. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1989.

WU, P.W.; CHANG, C. C.; CHOU, S. S. Determination of formaldehyde in cosmetics by HPLC method and aceylacetone method. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, p. 8-15, 2003.