

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Campus Araraquara

Jefferson Honorio Franco

Determinação de corantes de cabelo e derivados em água e tintura comercial por cromatografia líquida de alta eficiência

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Franco, Jefferson Honorio

F825d Determinação de corantes de cabelo e derivaods em água
e tintura comercial por cromatografia líquida de alta
eficiência / Jefferson Honorio Franco. – Araraquara :
[s.n], 2012
123 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Maria Valnice Boldrin

1. Química analítica. 2. Tintura comercial. 3. Corantes
de cabelo. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência.

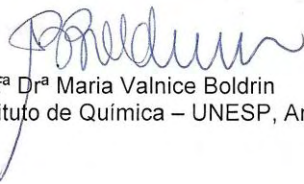
I. Título.

JEFFERSON HONÓRIO FRANCO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 17 de maio de 2012.

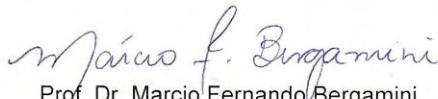
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Valnice Boldrin
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Marilda das Dores Assis
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Marcio Fernando Bergamini
Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Edson e Nilva e agradeço pelo carinho, amor, paciência e por me apoiarem em minhas decisões, além dos valores que me ensinaram e que levarei comigo. Dedico também aos meus irmãos Michel e Lucas por sempre estarem ao meu lado e também a minha avó Nair que sempre me incentivou e me deu conselhos.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin por sua orientação, confiança, pelos ensinamentos, pela dedicação, pelo convívio, pela cumplicidade e pela liberdade que sempre me foi dada durante a realização deste trabalho.

Aos professores Nelson Stradiotto, Hideko Yamanaka, Maria Del Pilar Taboada.

A todo o pessoal da eletroanalítica e do NDcom, principalmente ao Luciano, Michelle e Tuane pela amizade, apoio e por tornar os dias no laboratório mais divertidos e agradáveis.

Ao Thiago que me ajudou nos momentos mais difíceis e sempre me ensinou muito nesses dois anos de convívio e se tornou um grande amigo devido a sua sinceridade, amizade e apoio. Ao Guilherme pela ajuda nas análises e pela atenção dada ao trabalho.

A toda minha família, em especial a minha avó que sempre rezou muito para que tudo desse certo para mim.

A todos do Instituto de Química da Unesp de Araraquara que são responsáveis pela manutenção da Instituição e a todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A todos os professores do Instituto de Química que contribuíram para a minha formação profissional e a CAPES pela bolsa concedida.

A todos da secretária da Pós-Graduação, Biblioteca, enfim a toda comunidade IQ-UNESP por proporcionar condições para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos da república só Xerolaine: Pira, Muringa e Meira que me proporcionaram grandes momentos de alegria, além da amizade que vou levar pra sempre, aos meus amigos Marcelo, Glauco, Miguel e Gabriel Rocha Mol Rangel da república Lar do Mar pelas risadas e receitas deliciosas e também as meninas Mari “sorvete” e Fabi da rep. Kibon pela amizade e companheirismo todos esses anos. As irmãs Ana Sofia e Dra. Taty Veríssimo pela ajuda, risadas e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões, agradecer também a minha amiga do primeiro ano de faculdade Fernanda Sampaio e a Denise que sempre esteve ao meu lado e foi uma grande amiga nesses seis anos de faculdade. Aos meus amigos

de Jaboticabal Muralha, Camilinha e Angela “Ancuda” e aos meus irmãos de Santa Fé do Sul, Aline e Lokura.

Aos que embora não citados nominalmente, sempre estiveram por perto demonstrando seu carinho e compreensão. Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Jefferson Honorio Franco

Data de Nascimento: 01 de novembro de 1987

Naturalidade: Lençóis Paulista – SP

Nacionalidade: Brasileiro

Estado Civil: Solteiro

Filiação:

pai – Edson Franco

mae – Nilva Aparecida Honorio Franco

Profissão: Bacharelado Tecnológico em Química

Documento de Identidade: 40.263.973-X

Endereço para Correspondência:

Rua: Hugo Negrini, 132 – Bairro Quitandinha – Cep: 13710-000

Araraquara – SP

e-mail: jeffersonhfranco@gmail.com

FORMAÇÃO

BÁSICA

Ensino Fundamental e Médio: Cooperativa Educacional de Lençóis Paulista, Lençóis paulista- SP.

ACADÊMICA

GRADUAÇÃO

Bacharelado em Química junto ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

Iniciação Científica realizada junto ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara-SP, sob a orientação do Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti.

Projeto: “ELETROQUÍMICA DE LIGAS DE COBRE: SISTEMAS POLIFÁSICOS E MONOFÁSICOS POLICRISTALINOS, E MONOFÁSICOS MONOCRISTALINOS”

Concluído em julho de 2009.

Estágio supervisionado de 240 horas no Cempeqc- Centro de Monitoramento e Pesquisa da qualidade de combustíveis, petróleo e derivados.

PÓS GRADUAÇÃO

Mestrado em Química, junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara-SP, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin.

Projeto: “Identificação e quantificação de corantes de cabelo e derivados gerados durante processos oxidativos usando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos”.

DISCIPLINAS CURSADAS NA PÓS-GRADUAÇÃO

Disciplinas cursadas	Créditos	Carga Horária	Frequência	Conceito
Métodos Espectrométricos I	12	180	86,67	A
Quimiometria	12	180	93	A
Degradação de poluentes orgânicos em água: POA	12	180	100	A
Espectrometria de Massas de produtos naturais	6	90	93	B
Introdução a Eletroquímica Ambiental	6	90	93,33	A

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

01. FRANCO, J.H.; BENEDETTI, A.V.. Preparo de superfícies de ligas monocristalinas à base de cobre. **IN: XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, São José dos Campos-SP, 29 e 30 de outubro de 2008.

02. FRANCO, J.H.; BENEDETTI, A.V.. Eletroquímica de ligas de cobre: Sistemas polifásicos e monofásicos policristalinos e monofásicos monocristalinos. **IN XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, São José do Rio Preto-SP, 03 e 04 de novembro de 2009.

03. FRANCO, J.H.; LIZZIER, T.M. e ZANONI. M.V.B.. Avaliação de corantes em tinturas de cabelo por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. **IN: XVI Encontro Nacional de Química Analítica**, Campos do Jordão-SP, 23 e 26 de outubro de 2011.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

01. XX CIC- Congresso de Iniciação Científica, São José dos Campos, 2008.
02. XXI CIC- Congresso de Iniciação Científica, São José do Rio Preto, 2009.
03. II Comemoração do Dia do Químico, 18 de junho de 2007.
04. I Comemoração do Dia do Químico, 21 de junho de 2006.
05. XXXVI Semana da Química do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, Araraquara-SP, 2006.

PARTICIPAÇÃO EM CURSOS

01. “Química Forense”, duração 12 h.
02. “Química de Alimentos”, duração 12 h.
03. “Elaboração de resumos”, duração 4 h.
04. “Química Verde”, duração 16 h.
05. “Qual perfil apresenta o Químico das Águas?”, duração 6 h.
06. “Introdução à NBR ISO/IEC 17025 e o SGQ”, duração 6 h.

ESTÁGIOS, BOLSAS E AUXÍLIOS

Bolsa de Iniciação Científica (IC) concedida pela CNPq.
Bolsa de Mestrado (MS) concedida pela CAPES e CNPq.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.”

William Shakespeare

RESUMO

A tintura de cabelo é um processo adotado por milhões de pessoas, independente da raça, sexo, nacionalidade, religião ou idade. No entanto, os métodos analíticos disponíveis para avaliação destes produtos em formulação comercial, efluentes de salão de beleza, esgotos e águas superficiais são escassos. O presente trabalho investiga o desenvolvimento de um método analítico baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos para determinação dos corantes: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, usados em tinturas semipermanentes de cabelo. As melhores condições experimentais para separação dos corantes de cabelo de interesse foram: acetonitrila/água 35:65 (v/v) com adição de $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de líquido iônico tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIm-BF₄), à fase móvel, vazão: $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. Nestas condições experimentais observa-se melhor resolução e definição dos picos presentes nos cromatogramas nos respectivos tempos de retenção: AB 99 (tr =8,80 min), VA 43 (tr =14,78 min), MB 16 (tr =19,10 min), VB 76 (tr =25,08 min) e AB 57 (tr =34,17 min), confirmados pelos respectivos espectros hidrodinâmicos UV-Vis obtidos e comparados com o padrão de cada corante. O uso de líquido iônico como aditivo da fase móvel mostrou-se relevante para a detecção de corantes de cabelo melhorando significativamente a separação e encaudamento dos picos. Curvas analíticas foram construídas para cada corante de cabelo no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O índice de recuperação dos corantes em água fortificadas por cada corante indicou valores entre 84 – 117 %. Amostras da tintura de cabelo comercial (HF 65, Arianor) foram submetidas à análise usando o método proposto e a concentração obtida para os corantes na tintura indicaram ocorrência de: AB 99, VA 43, MB 16, VB 76 e AB 57 na concentração de $4,33 \times 10^{-5}$; $8,81 \times 10^{-6}$; $5,86 \times 10^{-6}$; $1,31 \times 10^{-4}$ e $1,99 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A metodologia analítica foi utilizada para monitoramento dos respectivos corantes em águas oriundas do processo de tintura de cabelos segundo especificações da formulação através de um processo de simulação, com água captada em cada lavagem e cloração. Os corantes foram submetidos a reações com oxidante químico tal como, peróxido de hidrogênio e os sub-produtos identificados por CLAE-DAD, espectrofotometria UV-Vis e espectroscopia de massas.

Palavras chave: corantes de cabelo, tintura comercial, CLAE, Azul Básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57.

ABSTRACT

The hair dye is a process used by millions of people regardless of race, sex, nationality, religion or age. However, the analytical methods available for evaluating these products in pharmaceutical formulation effluent salon, sewers and surface waters are scarce. This paper investigates the development of an analytical method based on high performance liquid chromatography with diode array detector for determination of dyes: Basic blue 99, Acid violet 43, Basic brown 16, Basic red 76 and Basic yellow 57 dyes used in semipermanent hair. Optimum conditions for separation of hair dyes of interest were acetonitrile / water 35:65 (v / v) with addition of $40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIm-BF₄), to the mobile phase flow rate: $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. Under these experimental conditions is observed better resolution and definition of these peaks in the chromatograms in the respective retention times: 99 AB (tr = 8.80 min) and VA 43 (tr = 14.78 min), 16 MB (tr = 19, 10 min), VB 76 (tr = 25.08 min) and 57 AB (tr = 34.17 min), confirmed by the respective UV-Vis spectra hydrodynamic obtained and compared with the pattern of each dye. The addition of ionic liquid additive as the mobile phase was found to be relevant for the detection of hair dyes significantly improved separation and peak tailing. Curves were constructed for each hair dye in the range of 1×10^{-7} to $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. The recovery rate of dyes in fortifield water indicated values between 84-117%. Samples of commercial hair dye (HF 65, Arianor) were analyzed using the proposed method and the concentration obtained for the dyes in the dye indicated the occurrence of AB 99, VA 43, MB 16, VB 76 and AB 57 in a concentration of $4,33 \times 10^{-5}$, $8,81 \times 10^{-6}$, $5,86 \times 10^{-6}$, $1,31 \times 10^{-4}$ and $1,99 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. The analytical method was also used to analyze the respective dyes in the wastewater collected from an effluent salon and treated water. The dyes were also subjected to chemical reactions with oxidants such as chlorination and hydrogen peroxide. The by-product generated after oxidation were monitored by HPLC-DAD, UV-Vis spectrophotometry and mass spectrometry.

Keywords: hair dye, dye commercial HPLC, Basic blue 99, Acid violet 43, Basic brown 16, Basic red 76 and Basic yellow 57.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Exemplo de reações envolvendo a formação do corante na estrutura interna do cabelo (tinturas permanentes)..... 29
- Figura 2. Estrutura química dos corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E)..... 42
- Figura 3. Espectros de absorvância na região do UV-Vis $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) em meio aquoso..... 48
- Figura 4. Curvas de calibração obtidas para os corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) em meio aquoso..... 50
- Figura 5. Espectros de UV-Vis de corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em meio aquoso e misturados na mesma proporção. $C = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 52
- Figura 6. Espectros de UV-Vis de: (A) mistura dos corantes (Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57). (B) mistura dos corantes (Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57), em meio aquoso. $C = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$ 53
- Figura 7. Cromatograma CLAE-DAD obtido para $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes Azul básico 99 (B, pico 1), Violeta ácido 43 (A, pico 2), Marrom básico 16 (C, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (D, pico 5) em meio aquoso obtidos em coluna C18, fase móvel 45:55 ACN/tampão fosfato. vazão = $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30$. : $\lambda = 383 \text{ nm}$; 482 nm ; 499 nm ; 523 nm , 618 nm correspondentes à: Azul básico 99 , Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76) e Amarelo básico 57, respectivamente 55

Figura 8. Cromatograma CLAE-DAD obtido para 8×10^{-5} mol L⁻¹ da mistura dos corantes Azul básico 99 (1), Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) em meio aquoso obtidos em coluna C18, fase móvel 45:55 ACN/ tampão fosfato. vazão = 1,0 ml min⁻¹. T = 30 °C. $\lambda = 413$ nm..... 56

Figura 9. Cromatograma CLAE/DAD obtido para 8×10^{-5} mol L⁻¹ dos corantes, Azul básico 99 (A, pico 1), Violeta ácido 43 (B, pico 2), Marrom básico 16 (C, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (D, pico 5), em coluna C18, fase móvel 65:35 ACN/ tampão fosfato + 5,0mL de trietilamina 0,04 mol L⁻¹. vazão = 1,0 ml min⁻¹. T = 30 °C. Detecção: $\lambda = 383$ nm; 482 nm; 499 nm; 523 nm, 618 nm correspondentes à: Azul básico 99 , Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76) e Amarelo básico 57, respectivamente. 57

Figura 10. Espectros de UV-Vis dos corantes: Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E), em meio aquoso. C= 8×10^{-5} mol L⁻¹ 58

Figura 11. Cromatograma CLAE/DAD obtido 8×10^{-5} mol L⁻¹ da mistura dos corantes em coluna C18, fase móvel 65:35 ACN/tampão fosfato + 5,0mL de trietilamina 0,04mmol L⁻¹. vazão = 1,0 ml min⁻¹. T = 30 °C. $\lambda = 413$ nm..... 59

Figura 12. Cromatograma CLAE/DAD obtido para 8×10^{-5} mol L⁻¹ dos corantes, Azul básico 99 (A, pico 1), Violeta ácido 43 (C, pico 2), Marrom básico 16 (B, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (D, pico 5), em coluna C18, fase móvel 65:35 ACN/ tampão fosfato + 5,0mL de trietilamina 0,04 mol L⁻¹. vazão = 0,8 ml min⁻¹. T = 30 °. Detecção: $\lambda = 383$ nm; 482 nm; 499 nm; 523 nm, 618 nm correspondentes à: Azul básico 99 , Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76) e Amarelo básico 57, respectivamente..... 60

Figura 13. Espectros de UV-Vis de corantes, Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E), em meio aquoso. C= 8×10^{-5} mol L⁻¹ 61

Figura 14. Cromatogramas obtidos da mistura, eluída com 65:35 ACN/tampão fosfato com adição de 5,0mL de trietilamina 0,04 mol L⁻¹. vazão= 0,8 ml min⁻¹. T = 30 °C. 1) Azul básico 99 , 2) Violeta ácido 43, 3) Marrom básico 16 , 4) Vermelho básico 76 . λ= 413 nm..... 62

Figura 15. Cromatograma CLAE/DAD obtido na concentração 8x10⁻⁵ mol L⁻¹ dos padrões individuais dos corantes: Azul básico 99 (B, pico 1), Violeta ácido 43 (C, pico 2), Marrom básico 16 (D, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (A, pico 5) e eluída com 35:65 ACN/ água com adição de 2,0mL de Líquido iônico (C₈H₁₅BF₄N₂) 0,04 mol L⁻¹. vazão= 0,4 ml min⁻¹. T = 30 °C. Detecção: λ= 383nm; 482nm; 499nm; 523nm, 618nm para Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, respectivamente..... 64

Figura 16. Cromatograma CLAE/DAD obtido na concentração 8x10⁻⁵ mol L⁻¹ da mistura dos padrões dos corantes Azul básico 99 (1) , Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) eluídos com 35:65 ACN/ água + 2,0mL de Líquido iônico (C₈H₁₅BF₄N₂) 0,04 mol.L⁻¹. vazão = 0,4 ml min⁻¹. T = 30 °C. Detecção: λ= 413nm 65

Figura 17. Curvas de calibração obtidas para os corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) em meio aquoso..... 66

Figura 18. Cromatograma CLAE/DAD obtido da mistura dos padrões dos corantes Azul básico 99 (1), Violeta ácido 43 (2) , Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) na concentração 8x10⁻⁵ mol L⁻¹, extraídos em 50:50 ACN/ água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0mL de Líquido iônico (C₈H₁₅BF₄N₂) 0,04 mol L⁻¹. vazão = 0,4 ml min⁻¹. T = 30 °C. Detecção: λ= 413nm 68

Figura 19. Cromatograma CLAE/DAD obtido da análise dos corantes na tintura comercial extraídos em 50:50 ACN/ água e eluídos com 35:65 ACN/água + 2,0 mL de líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão= $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Detecção= $\lambda = 413\text{nm}$. (1) =pico do corante Azul básico 99, (2)=pico do corante Violeta ácido 43 , (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57..... 70

Figura 20. Comparação dos espectros de UV-Vis obtidos para corantes no modo CLAE/DAD para cada pico cromatográfico na tintura comercial e no padrão dos corantes: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57..... 71

Figura 21. Cromatogramas CLAE/DAD obtido para a água de primeira lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/ água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$ 73

Figura 22. Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtido dos cromatogramas CLAE-DAD referentes aos: A) picos (1 e 2), B) pico 3 e C) pico 4 74

Figura 23. Cromatogramas CLAE/DAD obtido para a amostra II correspondente à segunda lavagem do cabelo (24h após aplicação da tintura e primeira lavagem), extraídos em 50:50 ACN/ água e submetidos à fase móvel: 35:65 ACN/água com adição de 2,0mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$ 75

Figura 24. Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtido dos cromatogramas CLAE-DAD referentes aos: A) picos (1 e 2), B) pico 3 e C) pico 4 75

Figura 25. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela tintura comercial através da lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/ água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. A) $\lambda = 413 \text{ nm}$ e B) 276nm 76

Figura 26. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtido dos cromatogramas CLAE-DAD referentes aos: A) picos (1 e 2), B) pico 3 e C) pico 4..... 77

Figura 27. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela tintura comercial através da lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. T = $30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$ 78

Figura 28. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para os picos 1 e 2 para comparação com os cromatogramas obtidos para as mesmas soluções 78

Figura 29. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela tintura comercial através da lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. T = $30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$ 79

Figura 30. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para os picos 1 e 2 para comparação com os cromatogramas obtidos para as mesmas soluções 79

Figura 31. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela análise da água de estação de tratamento com adição de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da mistura dos padrões A) antes do tratamento B) depois do tratamento, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. T = $30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 431 \text{ nm}$. (1)=pico do corante Azul básico 99 , (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76,(5)=pico do corante Amarelo básico 57..... 80

Figura 32. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela análise da água de estação de tratamento com adição de 1 g de tintura comercial em 10 mL de água coletada antes do tratamento, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$. (1)=pico do corante Azul básico 99 , (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57.....84

Figura 33. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela análise da água de estação de tratamento com adição de 1 g de tintura comercial em 10 mL de água coletada antes do tratamento, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$. (1)=pico do corante Azul básico 99 , (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57.....85

Figura 34. Cromatogramas CLAE/DAD obtidos para a mistura dos padrões dos corantes (curva 2) e com a adição de $200 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio (curva 1), nos tempos de 3 min, 15 min e 60 min, a partir da extração 50:50 ACN/ água e otimização da fase móvel 35:65 ACN/água com líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. $T = 30^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$. (1)=pico do corante Azul básico 99 , (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57 87

Figura 35. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para a mistura dos padrões dos corantes: Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) e com adição de $200 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio nos tempos de 3 min (A), 15 min (B) e 60 min (C)..... 88

Figura 36. Amostras de soluções $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes em meio aquoso para: Azul básico 99 (1), Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) antes (A) e após (B) reação com $200 \mu\text{L mL}$ de H_2O_2 em concentração de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	90
Figura 37. LC–ESI–MS/MS referente ao corante inicial (Amarelo básico 57).....	91
Figura 38. Cromatograma (LC–ESI–MS) monitorado em EMS (<i>Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan</i>). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da...	91
Figura 39. LC–ESI–MS/MS referente ao produto de degradação 2.....	92
Figura 40. LC–ESI–MS/MS referente ao produto de degradação 3.....	93
Figura 41. LC–ESI–MS/MS referente ao produto de degradação 4.....	94
Figura 42. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do corante Vermelho básico 76.....	97
Figura 43. Cromatograma (LC–ESI–MS) monitorado em EMS (<i>Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan</i>). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da...	98
Figura 44. LC–ESI–MS/MS referente ao produto de degradação 1.....	99
Figura 45. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do corante marrom básico 16.....	100
Figura 46. Cromatograma (LC–ESI–MS) monitorado em EMS (<i>Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan</i>). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da.....	102
Figura 47. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação	102
Figura 48. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas Azul básico 99.....	104

Figura 49. Cromatograma (LC–ESI–MS) monitorado em EMS (<i>Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan</i>). Intervalo de aquisição de massas- m/z 50 a 600 Da....	105
Figura 50. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação 3.....	108
Figura 51. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação 4.....	109
Figura 52. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação 2.....	109
Figura 53. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do corante violeta ácido 43.....	111
Figura 54. Cromatograma (LC–ESI–MS) monitorado em EMS (<i>Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan</i>). Intervalo de aquisição de massas- m/z 50 a 600 Da...	112
Figura 55. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro do produto de degradação 2.....	113
Figura 56. LC–ESI–MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro do produto de degradação 3.....	113
Figura 57. Cromatogramas CLAE/DAD obtidos para a mistura dos padrões dos corantes (curva 2) e após reação com 2,00 mL de hipoclorito de sódio $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ durante 24 horas (curva 1), a partir da extração 50:50 ACN/ água e otimização da fase móvel 35:65 ACN/água com líquido iônico ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. $T = 30^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$	115
Figura 58. Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para a mistura dos padrões dos corantes: Azul básico 99 (B), Violeta ácido 43 (C), Marrom básico 16 (D), Vermelho básico 76 (E) e Amarelo básico 57 (F) e com adição de 2,00 mL de hipoclorito de sódio $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ (A), após descanso de 24 horas.....	116

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Absorbância vs concentração dos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, em meio aquoso por espectrofotometria na região do UV-Visível. 51
- Tabela 2. Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Área vs concentração para os corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em meio aquoso. 67
- Tabela 3. Porcentagem de recuperação dos corantes dos corantes na água fortificada com a mistura dos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 69
- Tabela 4. Determinação dos corantes de interesse na tintura de cabelo comercial HF 65 da Arianor por CLAE/DAD sob as seguintes condições de análise: 1,0 g da tintura comercial em 10 mL de água, 35:65 ACN/água + 2,0 mL de líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão= $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Detecção= $\lambda = 413\text{nm}$ 72
- Tabela 5. Tempo de retenção e concentração dos corantes detectados nas amostras das cinco lavagens do cabelo tingido com tintura comercial HF 65 da Arianor, usando a metodologia proposta 80
- Tabela 6. Parâmetros obtidos para recuperação dos corantes de cabelo em amostras simuladas de águas da estação de tratamento antes do tratamento convencional, forticadas com os corantes de cabelo: Azul básico 99, violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57..... 83

Tabela 7. Parâmetros obtidos para recuperação dos corantes de cabelo em amostras simuladas de águas da estação de tratamento após o tratamento convencional, fortificadas com os corantes de cabelo: Azul básico 99, violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 83

Tabela 8. Recuperação dos corantes na tintura de cabelo por CLAE/DAD nas águas coletadas no DAAE antes do tratamento e fortificadas com 1,0 g de tintura comercial..... 85

Tabela 9. Recuperação dos corantes na tintura de cabelo por CLAE/DAD nas águas coletadas no DAAE após o tratamento fortificadas com 1,0 g da tintura comercial..... 86

Tabela 10. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Amarelo básico 57..... 95

Tabela 11. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Vermelho básico 76..... 99

Tabela 12. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Marrom básico 16..... 103

Tabela 13. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Azul básico 99..... 110

Tabela 14. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante violeta ácido 43..... 114

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Degradação do Amarelo básico 57 em solução aquosa de H ₂ O ₂	96
Esquema 2. Rota de degradação proposta para o Vermelho básico 76 em solução aquosa de H ₂ O ₂	98
Esquema 3. Rota de degradação proposta para o Marrom básico 16 em solução aquosa de H ₂ O ₂	101
Esquema 4. Proposta do mecanismo de reação de degradação para o Marrom básico 16 em solução aquosa de H ₂ O ₂	101
Esquema 5. Rota de degradação proposta para o Azul básico 99 em solução aquosa de H ₂ O ₂	105
Esquema 6. Proposta do mecanismo de reação de degradação para o Azul básico 99 em solução aquosa de H ₂ O ₂ ⁶⁴	107
Esquema 7. Rota de degradação proposta para o Violeta ácido 43 em solução aquosa de H ₂ O ₂	111

ABREVIATURAS E SIGLAS

AB 99- Azul básico 99
AV 43- Ácido violeta 43
MB 16- Marrom básico 16
VB 76- Vermelho básico 76
AB 57- Amarelo básico 57
ACN- Acetonitrila
MeOH- Metanol
SDS - dodecil sulfato de sódio
CTAC - cloreto de cetil trimetil amônio
LI- Líquido iônico
 T_r - tempo de retenção
T- temperatura
 λ - comprimento de onda
 v - vazão
 μ - micro
PPD - *para*-fenilenodiamina
PTD - *para*-toluenodiamina
OPDA - *orto*-fenilenodiamina
PAP - *para*-aminofenol,
OAP - *orto*-aminofenol
RE -resorcinol
HQ - hidroquinona
2,5-TDA - 2,5-toluenodiamina
4-ABP – aminobifenol
IBCF - cloroformato de isobutila
PFPA - anidrido pentafluoropropiônico
TTAB e CTAB - brometo de tetradecil-hexadecil-trimetil amônio
IARC - International Agency for Research on Cancer
CP - cromatografia em papel
CCD - cromatografia em camada delgada
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD - Arranjo de diodos
GC/GC-MS - cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massa
EC - eletroforese capilar
TLC - cromatografia em camada fina
SPE - extração em fase sólida
MEKC - cromatografia eletrocínética micelar
ECZ-AD - eletroforese capilar acoplada à detector amperométrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Corantes.....	26
1.2. Corantes de cabelo.....	27
1.3. Aspectos toxicológicos dos corantes de cabelo.....	29
1.4. Métodos analíticos para a determinação de corantes de cabelo e seus derivados.....	31
2. OBJETIVOS.....	41
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	42
3.1. Reagentes e soluções.....	42
3.2. Instrumentação.....	42
3.3. Metodologia	42
3.3.1. Preparação das amostras	43
3.3.2. Preparação da fase móvel	43
3.3.3. Análise dos corantes em formulação comercial.	44
3.3.4. Análise dos corantes nos efluentes do salão de beleza.....	44
3.3.5. Análises dos corantes em amostras de água coletada na Estação de tratamento de água (DAAE- Araraquara).	45
3.3.6. Reações dos corantes com peróxido de hidrogênio e cloro ativo.	45
3.3.7. Análises dos corantes por espectroscopia de massas.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. Comportamento espectrofotométrico dos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em meio aquoso.....	47

4.2. Análise dos corantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	53
4.3. Efeito da adição de trietilamina à fase móvel na otimização cromatográfica...55	
4.4. Efeito da presença de Líquido Iônico na otimização cromatográfica.....	62
4.5. Aplicação do método para determinação dos corantes em tintura comercial..67	
4.6. Análise dos corantes de cabelo em efluentes do salão de cabeleireiro.....	71
4.7. Determinação dos corantes em águas de captação na estação de tratamento de água.....	80
4.8. Degradação dos corantes de tintura de cabelo.....	86
4.8.1. Oxidação dos corantes de cabelo pela ação de peróxido de hidrogênio... 86	
4.8.2. Degradação dos corantes de cabelo com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)..88	
4.8.2.1. Amarelo básico 57.....	89
4.8.2.2. Vermelho básico 76.....	96
4.8.2.3. Marrom básico 16.....	99
4.8.2.4. Azul básico 99.....	102
4.8.2.5. Violeta ácido 43.....	109
4.8.3. Oxidação dos corantes de tintura de cabelo pela ação de hipoclorito de sódio.....	114
5.CONCLUSÕES.....	116
REFERÊNCIAS.....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Corantes

O uso de corantes naturais no tingimento de tecidos é conhecido desde os primórdios da civilização e alguns deles foram símbolo de poder e status. Por exemplo, o vermelho das capas dos centuriões romanos obtido de um molusco chamado Murex, exigia grande quantidade do mesmo para extrair quantidades muito pequenas do corante, culminando na quase extinção deste tipo de caramujo. Outro corante que produziu muita riqueza foi o índigo extraído da planta Indigo tinctoria, conhecido pelos egípcios e indianos há milênios. Até o século XVI foi um dos corantes de grande comercialização constituindo-se em fonte de riqueza pelas grandes plantações no sul dos Estados Unidos ^[1].

Em 1856, William H. Perkin sintetizou o primeiro corante orgânico. A síntese foi casual quando o cientista tentava a oxidação da anilina, com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Como produto da reação terminou gerando um corante de tecidos de cor vermelha, ao qual chamou de Púrpura de Tiro. Perkin patenteou sua descoberta e posteriormente, com ajuda financeira do pai e do irmão, montou a primeira indústria de corantes ^[1].

A indústria de corantes tornou-se próspera e, ao final século XIX, houve grande oferta de corantes sintéticos obtidos principalmente por processos industriais desenvolvidos na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça. A oferta de diferentes tonalidades de cores, robustez do tingimento e baixo preço acabaram suprimindo as necessidades da população por corantes naturais. Hoje os corantes sintéticos são amplamente usados para tintura de tecidos, alimentos, couro e papel. O perfil de grandes exportadores de corantes tem mudado nos últimos anos e atualmente os grandes fabricantes de corantes encontram-se em países asiáticos, como China, Índia e Indonésia ^[1].

1.2. Corantes de cabelo

A tintura de cabelo é um processo adotado por milhões de pessoas, independente da raça, sexo, nacionalidade, religião ou idade. Para atender a este mercado há uma vertiginosa oferta de produtos, que aumenta a cada dia, graças aos avanços no entendimento da estrutura química e molecular dos cabelos, e amplo entendimento dos mecanismos de ação. A busca por novas tecnologias visa não só aumentar a oferta de cores e processos mais simples, rápidos e efetivos, mas também minimizar danos ao cabelo e à saúde do ser humano [2-3].

Atualmente, os corantes usados para tintura de cabelo são bastante diversificados e podem ser classificados em três categorias, de acordo com o tipo de corante e sua persistência no cabelo: temporária, semipermanente e permanente.

I- Tintura temporária - Neste tipo de tintura utiliza-se corantes básicos, que são compostos solúveis em meio aquoso e capazes de reagir preferencialmente com fibras protéicas não protonadas. Esses produtos não se difundem na estrutura interna do cabelo, não requer amônia e não requer abertura da cutícula. É depositado temporariamente na estrutura externa do cabelo por forças iônicas envolvendo grupos do corante e das proteínas do cabelo. Eles produzem maior brilho e grande oferta de tonalidades por não permanecerem adsorvidos no folículo, sendo facilmente removidos por lavagem [2].

II- Tintura semipermanente – Neste tipo de tintura de cabelo, os corantes sintéticos interagem na haste capilar com grau moderado de resistência. Os corantes usados neste tipo de tintura são chamados de corantes ácidos e dispõem na sua estrutura química; grupos amino e fenóis, além do grupo cromóforo. A molécula é relativamente mais estável em relação aos corantes temporários e geralmente duram de 4 a 6 lavagens no cabelo. Neste tipo de coloração não ocorre reação de oxidação comumente visto com tinturas permanentes [2].

III – Tintura permanente - O método envolvendo tintura de cabelo permanente é o mais adotado e utiliza o processo químico oxidativo. Diferentes precursores e aditivos são misturados para desenvolvimento da cor, usando precursores ou acopladores, que reagem entre si gerando a cor, como demonstrado nas reações da Figura 1, por exemplo. Inicialmente o cabelo é tratado com um agente alcalino (amônia, monoetanolamina, aminometilpropanol) que facilita a difusão dos reagentes

na estrutura interna do cabelo (córtex), onde propicia a formação do corante propriamente dito ^[2].

Como espécies precursoras têm se usado diferentes compostos com diferentes substituintes (diaminas, fenóis e etc), tais como a *para*-fenilenodiamina (PPD) e *para*-toluenodiamina (PTD), resorcinol e etc. ^[4]. A oxidação destas substâncias na presença de outros agentes de acoplamento resulta em produtos que dão cor irreversível ao cabelo, uma vez que a reação ocorre no córtex e não na superfície. Esses processos são complexos e podem envolver múltiplos acopladores ou modificadores específicos, tais como derivados aromáticos substituídos de onde destacamos diversas aminas aromáticas e compostos fenólicos como *meta*-fenilediaminas, *meta*-aminofenóis, resorcinol, pirogalol e outros ^[4,5].

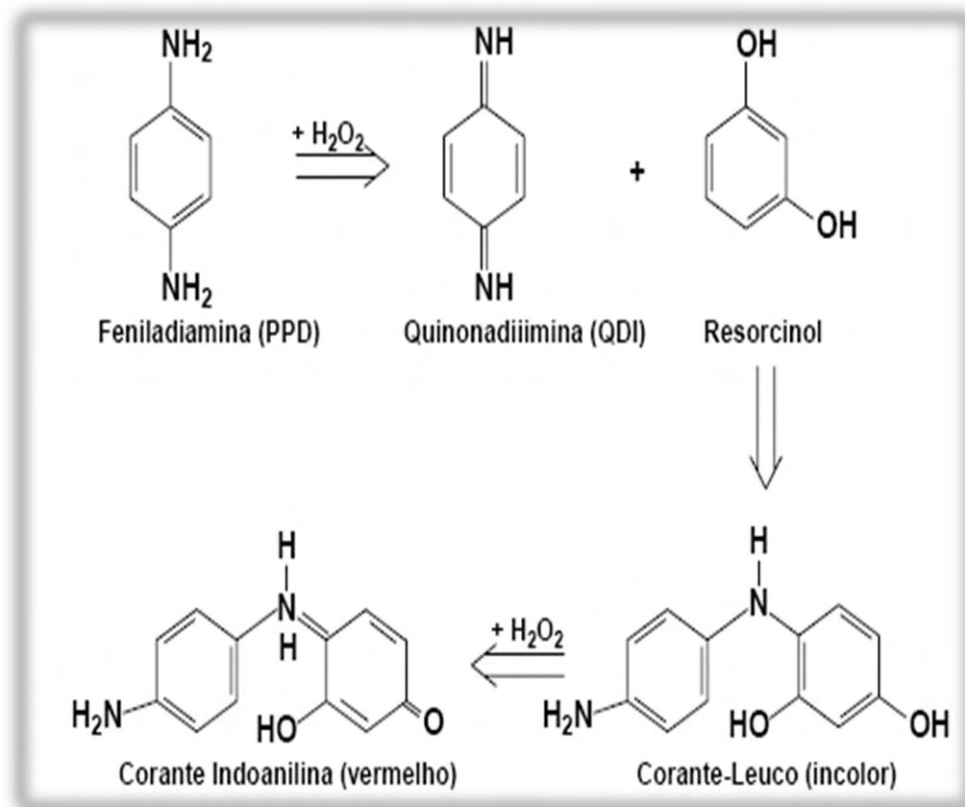


Figura 1. Exemplo de reações envolvendo a formação do corante na estrutura interna do cabelo (tinturas permanentes) ^[6-7].

Deste modo, pode-se observar que o processo de tintura de cabelo é complexo e envolve múltiplos componentes com diferentes funções. Após um processo rotineiro de tintura, pode-se encontrar no efluente diferentes produtos químicos, além de grande profusão de corantes do tipo disperso, básico e corantes formados como produto final da reação de precursores na tintura permanente com as mais diversas características.

Assim, existe uma alta demanda por novas metodologias analíticas capazes de determinar de maneira sensível e seletiva, possíveis corantes provenientes do processo de tintura de cabelo, bem como produtos de degradação quando submetidos à processos de oxidação, redução, hidrólise, cloração e etc. Dentre as inúmeras possibilidades, a ocorrência de amins aromáticas como contaminantes em águas de superfície e efluentes provenientes do processo de tintura de cabelo é preocupante. Ainda mais se considerarmos que outros derivados podem ser gerados durante processos de redução, oxidação, cloração, hidrólise, fotólise e outros, na biota aquática ou nos processos de tratamento de efluentes ^[8-10].

1.3. Aspectos toxicológicos dos corantes de cabelo.

A toxicidade de alguns corantes de cabelo e alguns ingredientes usados na composição de tinturas comerciais ou durante a aplicação tem sido investigada e os resultados apontam moderada toxicidade. Apesar de raros, alguns testes de genotoxicidade têm mostrado resultados positivos para alguns corantes de cabelo e seus ingredientes ^[11,12]. Recentemente, alguns autores têm correlacionado o uso de precursores ^[13] e outros, tais como resorcinol, usados como ingredientes na formulação de corantes, como disruptor endócrino afetando a tiróide ^[14].

Desde 1993, a IARC (International Agency for Research on Cancer) tem alertado que as atividades de cabeleireiros que trabalham com tintura de cabelos requerem cuidados equivalentes às profissões sujeitas à exposição a produtos perigosos. Zahm et al. ^[15] reportam o aumento de linfoma, além de múltiplos mielomas, em mulheres que usam corante de cabelo por longo tempo. Takkouche et al. ^[16] estimam um aumento de 15% no risco de leucemia associado ao uso pessoal de tinturas de cabelo. Além do efeito no local de aplicação, a exposição à estes ingredientes pode levar a doenças sistêmicas, como aumento do risco de carcinoma de bexiga, dermatose de despigmentação. De modo geral, os resíduos destes

corantes podem ser identificados em efluentes e águas naturais, principalmente devido à ineficiência dos métodos de tratamento.

A utilização destes produtos tem levado dúvidas ao público e à discussões científicas sobre seu impacto na saúde humana, especialmente desde que um estudo epidemiológico nos Estados Unidos revelou um aumento do risco de câncer da bexiga para mulheres que usam corantes capilares permanentes pelo menos uma vez por mês e cabeleireiros que foram expostos aos corantes de cabelo [17-20].

Apesar de não existir uma associação significativa entre o uso de tinturas capilares permanentes e o aparecimento de câncer de bexiga associado ao uso do produto, no entanto, uma investigação recente informou um aumento neste tipo de câncer devido ao uso de corantes de cabelo, com aumento do risco proporcional ao tempo de uso, pois mulheres que utilizaram tinturas de cabelo permanentes pelo menos uma vez ao mês apresentam um risco 2,1 vezes maior de câncer de bexiga em relação a mulheres que não utilizaram nenhum tipo de tintura capilar [20].

Simulações feitas do uso de tintura de cabelo em humanos relataram que alguns corantes de cabelo contêm bactérias mutagênicas. Alguns estudos mostraram que os componentes dos corantes de cabelo atuam como agentes mutagênicos ou cancerígenos em cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* TA 1538 e TA 98 [21] e em animais [22]. Pesquisadores descobriram que 89% (150/169) dos tipos de formulações de tinturas comerciais de cabelo permanente são mutagênicos. As tinturas de cabelo oxidantes, ou permanentes, utilizam peróxido de hidrogênio para oxidar compostos aromáticos, tais como *para*-diamina, *para*-aminofenol e seus derivados (intermediários primários), que então reagem com acopladores (intermediários secundários) para que possa surgir a cor desejada no cabelo. Corantes de cabelo foram comparados em ensaios toxicológicos *in vivo* e a toxicidade foi encontrada na ordem decrescente de derivados de *para*-fenilenodiamina > *meta*-fenilenodiamina > fenol [23].

Deste modo, com a crescente popularidade do uso da tintura de cabelo e os recentes problemas de saúde levantados a partir de estudos epidemiológicos sobre corantes capilares permanentes e elevados risco de doenças, o interesse por métodos capazes de identificar e quantificar estes corantes nos mais diversos níveis de concentração tem aumentado.

1.4. Métodos analíticos para a determinação de corantes de cabelo e seus derivados.

Embora o uso de corantes destinados a tintura de cabelo seja altamente relevante no mundo moderno gerando uma grande quantidade de resíduos, os estudos focando os riscos ao ambiente e à saúde por estes corantes, precursores e outros aditivos são raros. É conhecido que algumas das aminas aromáticas usadas na preparação, ou formadas por degradação parcial dos corantes que contem em sua composição grupos azo como cromóforo são compostos biologicamente ativos e podem ser absorvidos percutaneamente, podem ser tóxicas aos mamíferos, apresentar propriedades mutagênicas e carcinogênicas [24]. No entanto, os estudos são pouco difundidos na literatura e a aplicação restrita, uma vez que a maioria dos componentes e formulações são protegidos por patentes.

As tinturas comerciais de cabelo contêm uma mistura de *para*-fenilenodiamina, benzenodióis, aminofenóis e outros substratos aromáticos. No processo de coloração capilar, um corante precursor (por exemplo, 1,4-benzenodiamina, 4-aminofenol) reage com o peróxido de hidrogênio para produzir uma imina, que por sua vez reage com um acoplador (por exemplo, 3-aminofenol, 1,3 -benzenodiol) para produzir o corante. Assim, o conteúdo e a composição de intermediários dos corantes em uma tintura de cabelo afeta grandemente a cor do cabelo.

Os métodos analíticos desenvolvidos para determinação de corantes de cabelo e seus ingredientes, bem como estudos de degradação destes compostos em matrizes ambientais são escassos. Isso é um problema considerando que estes compostos estão presentes em muitos efluentes, esgotos e estações de tratamento de águas de captação estejam continuamente recebendo resíduos de salões de beleza e esgotos domésticos [25].

A maioria dos métodos analíticos encontrados na literatura é destinada a análise dos precursores usados em tintura permanente, e não de outros corantes ácidos ou básicos envolvendo tinturas semi-permanentes ou temporárias. Em adição, na determinação dos precursores da tintura permanente não são considerados os derivados formados após reação dos precursores usados nas formulações. Estudos envolvendo metodologias adequadas para sua contaminação ambiental em efluentes, esgotos e estação de tratamento de água que absorvem

resíduos de salões de beleza e esgotos domésticos são praticamente inexistentes [25].

É importante ressaltar também a importância da determinação de compostos ativos (acopladores) usados na tintura permanente de cabelo na forma de diaminas aromáticas, que são capazes de penetrar no cabelo, onde podem reagir com oxidantes ou outros compostos e originar produtos de alto peso molecular fixando de forma mais efetiva ao cabelo. Precursores da tintura permanente de cabelo têm gerado grande preocupação, principalmente com relação à *para*-fenilenodiamina, resorcinóis e aminofenóis, e outros derivados aromáticos. Estes intermediários têm mostrado propriedades mutagênicas e carcinogênicas [21,26,27]. Devido à toxicidade desses precursores, diversos procedimentos cromatográficos e eletroforéticos têm sido desenvolvidos para separar, determinar e estimar os intermediários de corantes e derivados em produtos de coloração de cabelo. Estes incluem a cromatografia em papel (CP), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massa (GC/GC-MS), e eletroforese capilar (EC) [21,26,27].

Os métodos cromatográficos de análise baseados na cromatografia líquida com diferentes detectores tem sido usualmente empregados para identificação e quantificação de precursores na tintura de cabelo, sendo os principais trabalhos reportados a seguir. A cromatografia em papel (CP) é um dos métodos cromatográficos mais antigos utilizados para a separação e determinação dos componentes de corantes destinados a tintura de cabelo [28], mas é raramente utilizado hoje devido a suas limitações. O método cromatográfico de camada delgada é a versão mais moderna e tem merecido destaque na identificação de *para*-fenilenodiamina, resorcinóis e aminofenóis em formulações comerciais, tal como descrito na literatura [3-28]. No entanto são métodos pouco sensíveis e com baixa seletividade.

A separação e identificação de corantes e derivados por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem mostrado elevada sensibilidade, precisão, e especificidade. Métodos de CLAE com várias estratégias tais como, diferentes tipos de fase estacionária, composição de vários tipos de fases móveis e uma vasta gama de detectores seletivos, torna o método apropriado para a análise de compostos em materiais vegetais tais como henna [29].

Dowle e Malyan ^[30] reportam o uso do método de CLAE de fase normal e reversa com detector UV para separação e identificação de isômeros de aminofenóis em amostras de corantes de cabelo. O método de fase normal foi realizado no modo isocrático em uma coluna Hichrom S-5 NH a uma vazão de 2 mL min⁻¹. A solução de tetraetilenepentano em metanol-diclorometano-hexano foi utilizada como fase móvel. O método de fase reversa foi realizado no modo isocrático a uma vazão de 1 mL min⁻¹ e coluna utilizada foi a PLRP-S e a fase móvel Água/ACN. A técnica utilizada com o modo reverso foi muito mais simples, rápida e com maior reprodutibilidade que o modo de fase normal.

Mariani et al. ^[31] empregou o método de CLAE-UV de fase reversa e coluna RP-18 para análise de 11 nitro derivados, 2 antraquinonas e 5 corantes Arianor e 8 corantes de cabelo comerciais da marca ARIANOR. As amostras foram preparadas pela técnica de extração por sonificação com 1:1 ACN/Água por 10 minutos e separados pelo modo gradiente usando ACN/tampão fosfato (pH = 3 com ácido fosfórico) e detecção no modo UV em comprimentos de onda de 210, 254 e 500 nm. A partir dessas análises foi realizada a quantificação de 1-β-hidroxietilamino-2-nitro-4-bis-(β-hidroxietil)-aminobenzeno, 1-metilamino-2-nitro-4-bis-(β-hidroxietil)aminobenzeno, Disperse Blue 3, 1-β-hidroxietoxi-3-metilamino-4-nitrobenzeno e 1-metoxi-2-β-hidroxietilamino-3-nitrobenzeno em amostras de corantes usadas para tintura de cabelo preto.

Meyer et al. ^[32] desenvolveram e validaram um método sensível e seletivo para determinação de *para*-fenilenediamina e seus metabólitos acetilados acetil-*para*-fenilenediamina e diacetil-*para*-fenilenediamina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos e detector eletroquímico em série. Obtiveram um limite de detecção de 0,5 mol L⁻¹ para fenilenediamina e para o seu metabólito acetilado e de 1,0 mol L⁻¹ para o metabólito di-acetilado. Esse método foi aplicado em estudos ecotoxicológicos e cinética de degradação desses compostos.

Narita et al. ^[33] determinaram simultaneamente 7 aminofenóis, resorcinol e *para*-fenilenediamina em tinturas de cabelo usando CLAE com detecção eletroquímica. O método permite um limite de detecção na faixa de 15 a 40 mg sob potencial de 0,95 V. Os autores concluem que o método se mostrou eficiente e sensível o suficiente para determinar estes compostos em formulações comerciais contendo estes produtos.

Tinturas de cabelo permanentes utilizadas na Alemanha geralmente contêm 2,5-toluenodiamina (2,5-TDA) e em menor quantidade *para*-fenilenodiamina (*para*-PDA), *para*-aminofenol ou outras arilaminas como compostos ativos. A utilização do composto cancerígeno 2,4- toluenodiamina em tinturas de cabelo permanentes era amplamente distribuído até a sua proibição no início de 1970. Apesar da sua semelhança estrutural com 2,4-TDA, o seu isômero 2,5-TDA não é considerado cancerígeno. Por outro lado, a *para*-PDA é classificada como cancerígeno, o que significa que há pelo menos uma alternativa na formulação da tintura comercial para evitar o uso de substâncias cancerígenas [34].

Tanto 2,5-TDA quanto o *para*-PDA que são usadas em tinturas de cabelo permanente foram classificados como sensibilizadores da pele e são capazes de penetrar na pele humana. Da mesma forma, contaminantes cancerígenos e impurezas em formulações de corantes de cabelo comerciais como *orto*-toluidina ou 4-aminobifenil podem também penetrar na pele dessa maneira e assim contribuir para o risco de câncer nos usuários [34].

Uma avaliação precisa dos riscos do uso da tintura de cabelo e o papel das aminas aromáticas carcinogênicas requer conhecimento sobre a absorção sistêmica dos compostos ativos de tinturas de cabelo. Assim, Schettgen et al. [35] quantificaram diaminas aromáticas como compostos ativos presentes como possíveis impurezas e passíveis de penetração dérmica. Métodos analíticos altamente sensíveis como CG-MS foi utilizado para a determinação de diaminas aromáticas na urina de humanos, usando tinturas disponíveis no mercado, e encontraram *orto*-toluidina e 4-aminobifenila em amostras de urina dentro de um período de 48 h após o uso de tinturas de cabelo. O estudo demonstrou que diaminas aromáticas em corantes capilares permanentes são absorvidos dermicamente e podem ser quantificados na urina usando os métodos propostos.

A aplicação da tintura de cabelo de cor marrom-acastanhado mostrou grande quantidade de 2,5-TDA em urina excretada no período de 48 horas. O tempo de meia-vida de 2,5-TDA na urina foi de aproximadamente 8 h, o que implica no interesse de aplicação do método proposto no biomonitoramento de cabeleireiros expostos aos corantes de cabelo [35].

Intermediários da tintura permanente, tais como, benzenodióis e aminofenóis, têm ainda mostrado mutagenicidade *in vitro* e propriedades cancerígenas *in vivo* [36-38]. Devido à toxicidade dos seus componentes, a composição da pasta de coloração

está sob controle do Conselho Diretivo Europeu (76/768/CEE). Procedimentos analíticos usando metodologia baseados em espectroscopia de massas, eletroforese capilar e cromatografia eletrocínética micelar foram desenvolvidos para separar e determinar intermediários dos corantes de cabelo ^[39-41]. Alguns destes métodos requerem um trabalho demorado devido ao alto tempo gasto com extrações seguido de derivatização química.

Dentre os métodos conhecidos, a extração utilizando heptafluoro n-butil é um dos procedimentos mais atraentes. A separação completa de oito componentes dos corantes, incluindo três isômeros de aminofenóis e três aminas aromáticas foi obtida por esta metodologia que, no entanto, apresenta níveis relativamente baixos de reprodutibilidade e recuperação.

Na formação da cor do cabelo, *para*-fenilenodiamina ou *para*-aminofenol reagem com peróxido de hidrogênio para produzir derivados imina que, por sua vez, reagem com um acoplador (por exemplo, 3-aminofenol, 1,3-benzenodiol) para fornecer o corante alvo. Assim, há um grande interesse na detecção dos precursores quanto na determinação dos compostos gerados.

A partir da estabilidade de algumas iminas aromáticas, Di Gioia et al. sugeriram a conversão da *para*-fenilenodiamina (PPD) em uma imina, tendo em conta que composição da tintura comercial não deve afetar a reação de PPD com aldeídos. A aplicação da cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas em modo positivo foi utilizada para determinação de PPD a partir de tinturas comerciais de cabelo. A metodologia proposta é sensível e precisa para a determinação de PPD em tinturas de cabelo comerciais aplicando derivatização da amostra com benzaldeído. A técnica CG-MS permitiu uma estimativa da concentração de PPD em níveis de até 0,05 mg mL⁻¹. A ótima linearidade das curvas analíticas, os excelentes resultados para a recuperação do PPD, os elevados níveis de sensibilidade e precisão tornaram a metodologia recomendável para a quantificação de PPD em produtos comercialmente disponíveis de corantes de cabelo ^[42].

Akyuz M. e Ata S. desenvolveram uma técnica analítica baseada em CG-MS para determinação de aminas aromáticas em corantes de cabelo, henna e amostras de cabelo tingido. No método proposto, as aminas foram isoladas a partir de solução aquosa com clorofórmio contendo bis-2-etilhexilfosfato-(BEHPA) como reagente par-iônico, que após diluição com solução ácida e derivatização com cloroformato de

isobutila (IBCF) mostrou-se adequado ^[44]. Os resultados obtidos demonstraram precisão satisfatória e boa reprodutibilidade para a determinação qualitativa e quantitativa de amins aromáticas em níveis compatíveis com o requerido em tinturas comerciais de cabelo permanentes, henna e amostras de cabelo tingido. O método também foi utilizado para validação de leis do conselho diretivo de cosméticos, devido à sua excelente seletividade no processo de isolamento, alta resolução e sensibilidade em relação à maioria dos outros métodos disponíveis na literatura ^[43].

A classe química das arilaminas, tais como os isômeros *para*, *meta* e *orto*-fenilenodiamina, além de serem usados em tinturas de cabelo são também amplamente utilizados na indústria farmacêutica, química, borracha, indústrias fotográficas e de corantes ^[44]. Estes intermediários de corantes têm mostrado diferenças nas respostas para mutagenicidade *in vitro*, dermatite alérgica, nefrotóxicos, e propriedades cancerígenas *in vivo* ^[45]. Portanto, a análise simultânea de isômeros de fenilenodiamina é muito importante na analítica bioquímica.

Métodos analíticos, incluindo cromatografia líquida (CLAE), cromatografia em camada fina (TLC), eletroforese capilar (CE), têm sido desenvolvidos para analisar estes produtos em tintura comercial. Dentre essas técnicas, CE tem atraído grande atenção na determinação destes isômeros, devido a sua eficiência na separação, pequeno volume de amostra, baixo consumo de reagentes e alta velocidade de análise ^[46]. No entanto, apesar das suas vantagens, a sensibilidade exibida é baixa dificultando a sua aplicação para análise traço de amostras reais.

A maioria dos métodos propostos requer pré-tratamento da amostra antes da análise. Para isto, envolve a técnica de extração, tal como ultrassom, extração por microondas, microextração em fase líquida, extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida.

Nos últimos anos, a SPE tem desempenhado um papel proeminente no pré-tratamento da amostra, e é empregada para extrair uma vasta gama de produtos químicos, devido ao seu baixo consumo de solventes orgânicos, simplicidade, alta porcentagem de recuperação, elevados fatores de pré-concentração, facilidade de automação e operação ^[47]. Malayappan et al. ^[48] utilizou o polímero β -ciclodextrina poliuretano como matéria de fase sólida na micro-extração para a separação de amins aromáticas cancerígenas em amostras ambientais. Cinzas de carvão são subprodutos da combustão em caldeiras e a sua porosidade ^[49], disponibilidade e

baixo preço apresentam um grande potencial como extrator de fase sólida para análise de traços.

A utilização de cromatografia líquida acoplada à detector de fluorescência é discutido na literatura ^[50] para a determinação de intermediários tais como *para*-fenilenodiamina (PPD), *orto*-fenilenodiamina (OPDA), *para*-aminofenol (PAP), *orto*-aminofenol (OAP), resorcinol (RE) e hidroquinona (HQ) em tinturas comerciais de cabelo permanentes e de águas residuais de lavagem após os cabelos serem tingidos usando SPE para pré-tratamento da amostra ^[51].

Cromatografia gasosa (CG) tem sido usada para separação e identificação de diamino toluenos e *para*-fenilenodiaminas, porém estes métodos possuíam pouca sensibilidade e um alto tempo de consumo na derivatização para análises envolvendo níveis de concentrações baixos. Goldstein ^[52] usou um método de cromatografia a gás para determinação de diaminas aromáticas em corantes de cabelo, em que era utilizado um padrão interno para determinar *para*-fenilenodiamina e *para*-toluenodiamina na faixa de mg/mL.

Choudhary ^[53] propôs método analítico rápido, simples e sensível para a determinação simultânea de 1,4- diaminobenzeno, 2,5-diaminotolueno e 2,4-diaminoanisol em corantes de cabelo permanentes usando cromatografia gasosa acoplado com um detector de ionização de chama. O limite de detecção foi de 5 ng/μL para 1,4- diaminobenzeno e 20 ng/μL para 2,4- diaminooanisol e 2,5-diaminotolueno. O desvio padrão relativo do limite de detecção para os três compostos foi de 5,6%; 5,8% e 4,6%, respectivamente. Uma recuperação de 85% foi obtido para diaminas em tintura comercial permanente.

Um método simples e confiável baseado em cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos foi descrito por Scarpi et al. ^[54]. Neste, divulga-se a determinação simultânea de nove corantes de cabelo semi-permanentes e temporários em 13 formulações de tintura comercial temporária de cabelo. O método não envolve qualquer procedimento de extração prévia e é suficientemente rápido e preciso para análises de rotina.

Turesky et al. ^[55] desenvolveram um método analítico para o isolamento, identificação e quantificação de 4- Aminobifenol (4-ABP) nas tinturas comerciais de cabelo, o qual foi detectado em oito das 11 tinturas de cabelo e encontrado em tintura de coloração preta, vermelha e loiro, mas não em tinturas de cabelo castanhos. 1,4-fenilenodiamina (PPD) é um componente chave para o

desenvolvimento da cor de muitos corantes capilares permanentes. Alguns grupos de pesquisa avaliaram que o PPD pode conter tanto o 4-ABP (até 500 ppb) quanto o 2-ABP (até 70 partes por milhão) e concluíram que isso pode ser uma fonte de contaminação de ABP em tinturas para o cabelo.

O composto 4-Aminobifenol foi isolado a partir de corantes por extração com hexano, seguido por cromatografia sílica gel, com ou sem tratamento químico do extrato com zinco / HCl, e uma purificação final com uma resina de troca catiônica de fase reversa. A estrutura de 4-ABP foi confirmada tanto por CLAE com ionização por eletrospray acoplado com espectrometria de massa (HPLC-ESI-MS/MS), quanto por cromatografia gasosa com espectrometria de massa no modo negativo (GC-NICI-MS) seguido de derivatização química com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA). Os níveis de 4-ABP variaram de níveis não detectáveis (menos de 0,29 partes por bilhão (ppb) até 12,8 ppb. O isômero não cancerígeno 2-bifenilamina (2-ABP) também foi encontrado em quantidades até 310 ppb ^[55].

Lin, C.E. et al. ^[56] analisaram a separação de 13 intermediários de corantes, incluindo benzeno, benzenodióis e aminofenóis, em corantes de cabelo permanentes (oxidativos) por cromatografia micelar eletrocínética (MEKC) usando brometo de tetradecil-hexadecil-trimetil amônio (TTAB e CTAB) como agentes catiônicos tensoativos em um tampão fosfato, pH ácido. Os parâmetros de separação, tais como concentração micelar, pH do tampão, concentração do tampão e modificadores orgânicos, foram examinados e observou-se que houve influência na seletividade e na migração dos intermediários. Os resultados indicaram que a concentração de micelas e pH do tampão são os dois fatores mais importantes que afetam a migração e a separação destes intermediários dos corantes. A mobilidade eletroforética de 6-metil-3-aminofenol, 1,3-benzenodiol e 1,2-benzenodiol, devido às interações micelar-soluto, aumentou acentuadamente com o aumento da concentração micelar, mas diminuiu com o aumento da proporção de modificadores orgânicos. Assim, a seletividade e a ordem de migração dos analitos que migram consecutivamente podem ser alterados variando-se os parâmetros de separação dos três analitos analisados. A separação foi obtida utilizando TTAB a uma concentração de 18 mM ou com CTAB a uma concentração de 13 mM a pH 5,0 ^[56].

Fanali. S. ^[57] estudou a separação de seis intermediários de corantes, incluindo três aminofenóis e três isômeros de benzenodiamina, os quais foram analisados por eletroforese capilar. Mais recentemente, a separação de uma mistura

de 14 intermediários de corantes foi investigada por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) utilizando elevadas concentrações de dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de cetil trimetil amônio (CTAC) como agentes tensoativos a pH alcalino. Verificou-se que a reprodutibilidade é bastante baixa, a pH alcalino, devido ao aumento da dissolução da sílica ^[58], e que os intermediários de corantes, tais como benzenodiaminas e aminofenóis são otimamente separados a um pH ácido, cerca de 5,0-5,5, em eletroforese capilar (CE). Assim, espera-se que a separação destes analitos em pH ácido seja melhor do que a pH alcalino.

Wang, L.H. et al ^[59] desenvolveram um método de cromatografia líquida com detector eletroquímico desenvolvido para medidas quantitativas para três derivados de diaminas (p-fenilenodiamina, N, N'-P-fenileno bis acetamida, e 4-aminoacetanilida), provenientes de tintura de cabelo, na urina humana e no sangue, urina e fezes de coelhos. A célula de detecção consistiu de um sinal eletroquímico de carbono vítreo obtido com um eletrólito de suporte contendo 20% de metanol-5 mM ortofosfato octil amônio (pH 6,30) como fase móvel.

Dong. S. e Chi. L. ^[60] separaram e detectaram simultaneamente cinco principais componentes de tinturas de cabelo, *meta*, *orto* e *para*-fenilenodiamina e os isômeros catecol e resorcinol para melhorar o limite de detecção utilizando eletroforese capilar acoplada à detector amperométrico (ECZ-AD) sob eletrodo de trabalho de platina. Os efeitos do pH, potencial do eletrodo de trabalho, concentração do tampão, a tensão de separação e tempo de injeção em ECZ-AD foram investigados. Sob condições ótimas, os cinco analitos poderiam ser perfeitamente separados em tampão borato 0,30 mol L⁻¹ e tampão fosfato 0,40 mol L⁻¹ (pH 5,8) no tempo de 15 min. O eletrodo de platina de diâmetro de 300 µm obteve boas respostas em 0,85 V para os cinco analitos. As curvas de calibração no intervalo de 1,0 × 10⁻⁶ a 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ e os limites de detecção obtidos a partir de 10⁻⁷ mol L⁻¹ (S / N = 3).

Um dado relevante para monitoramento ambiental é diagnosticar os principais produtos formados em paralelo com o processo oxidativo envolvendo intermediários primários e acopladores como no caso da tintura permanente. Como mostrado previamente, o processo de tintura temporário é baseado no uso de *para*-fenilenodiamina (PPD), *orto*-aminofenol (OAP), *para*-aminofenol (PAP) e *para*-toluenodiamine, onde são misturados a diferentes acopladores tais como *meta*-aminofenol (MAP), *meta*-hidroxifenol ou resorcinol. Nestes processos os

intermediários primários reagem com peróxido de hidrogênio para formar a diimina correspondente, que por sua vez reage com outros acopladores de diferente estrutura. Produtos destas reações incompletas não são divulgados na literatura embora sejam formadas em profusão. Do mesmo modo, os relatos na literatura sobre a oxidação de corantes semi-permanentes e temporários sujeitos à oxidação por peróxido de hidrogênio ou cloretos são escassos, embora sejam amplamente utilizados nos processos de tintura de cabelo.

Assim, é possível concluir que a maioria dos trabalhos envolve apenas o estudo dos precursores e não dos corantes formados após reação dos precursores ou dos outros tipos de corantes básicos usados nas formulações. Em adição, não são encontrados na literatura estudos direcionados para sua contaminação ambiental quando presentes em efluentes, resíduos de salões de beleza e esgotos domésticos. No entanto, a demanda aumenta gradativamente e requer metodologias para determinação de corantes com grupos antraquinona e azo como cromóforo. Uma outra grande preocupação é sobre a ocorrência e danos provocados por estes corantes de cabelo no meio ambiente.

Deste modo, seria altamente relevante desenvolver procedimentos analíticos baseados na cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos para avaliação destes produtos como contaminantes em águas superficiais, bem como capaz de identificar intermediários primários gerados durante processo de oxidação por peróxidos e cloretos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método analítico para identificação e quantificação de corantes de cabelo em meio aquoso e derivados gerados durante processos oxidativos usando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para a proposta escolheu-se cinco corantes semi-permanentes: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 2.

Após otimização, a metodologia analítica será utilizada para a detecção dos corantes em amostra de tintura comercial, águas de captação de tratamento de água e águas oriundas de processo simulado de tinturas de cabelo.

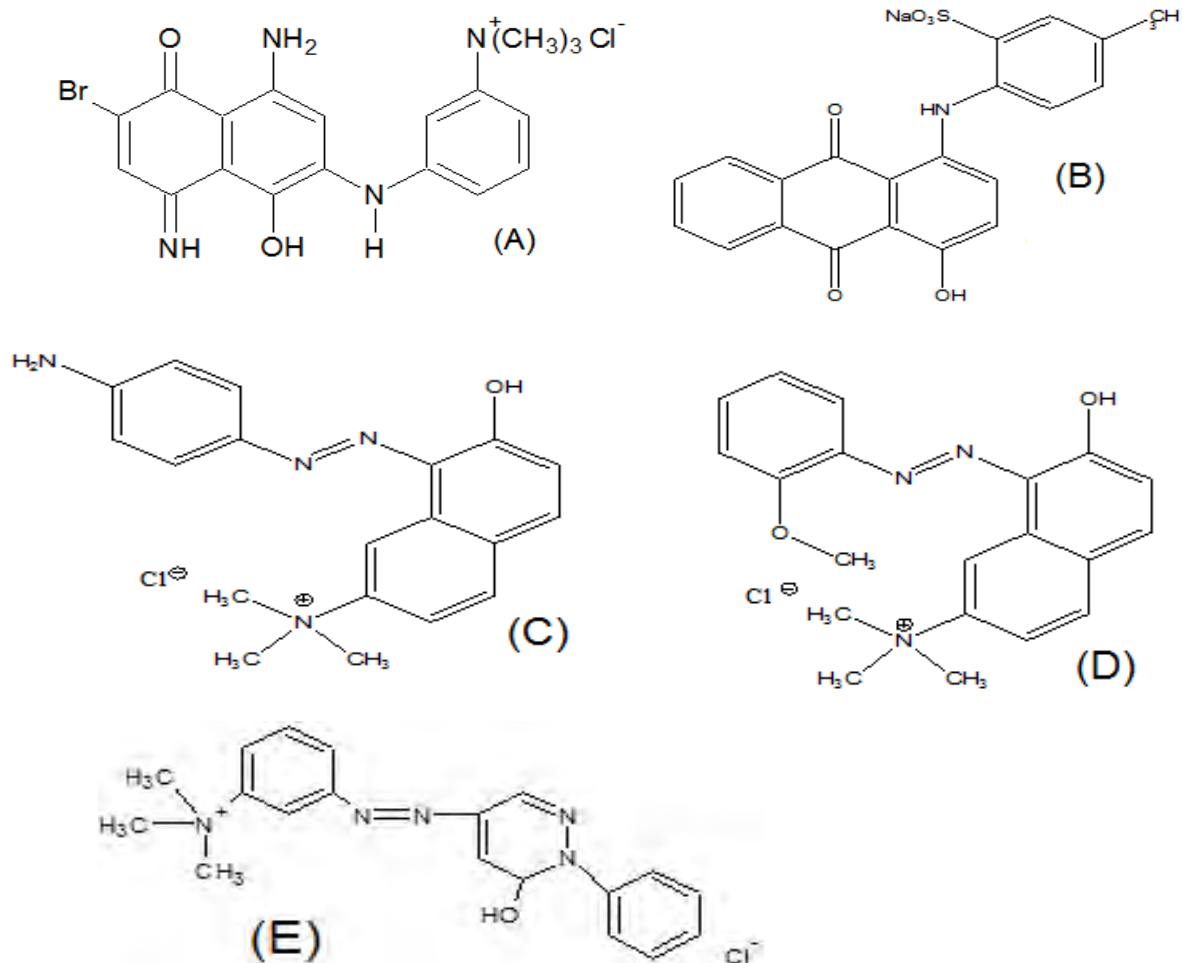


Figura 2. Estrutura química dos corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Os cinco corantes utilizados: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 (Figura 2) foram fornecidos pela LCW Corantes, marca ARIANOR, em amostras individuais e combinadas em formulações comerciais do corante (HF65). A amostra comercial da marca HF65 contendo todos os corantes foi analisada após dissolução em água ultrapura. Para fins analíticos também utilizou-se a mistura dos padrões dos corantes de interesse, dissolvendo-os diretamente em água.

Os eluentes cromatográficos utilizados foram: metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) da marca Merck e água purificada em sistema MilliQ (Millipore).

O líquido iônico utilizado para separação cromatográfica dos corantes foi o tetrafluoroborato 1-butil-3-metilimidazólio ($C_8H_{15}BF_4N_2$) (MM)= 226,40 g mol⁻¹ e densidade(d)= 0,85 g mL⁻¹. C= 0,04 mol L⁻¹. Ainda utilizou-se a trietilamina ($N(CH_2CH_3)_3$) (MM) = 101,20 g mol⁻¹ e densidade(d)= 0,73 g mL⁻¹. C= 0,04 mol L⁻¹, ambos como aditivos à fase móvel.

Solução tampão hidrogênio fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0 foi preparada a partir dos sais Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 . A solução tampão carbonato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 9,0 preparado a partir dos sais $Na_2CO_3/NaHCO_3$. As soluções citadas foram preparadas empregando-se água purificada de qualidade Milli-Q ($\rho = 18,2 M\Omega cm^{-1}$).

Nas reações de oxidação dos corantes utilizou-se água oxigenada 30 volumes (Merck), c= 0,900 mol L⁻¹ e soluções de cloro ativo (Q'BOA) com 25 g L⁻¹ de hipoclorito de sódio.

3.2 Instrumentação

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em um cromatógrafo Shimatzu, modelo LC-10AT, equipado com duas bombas, injetor automático (volume de injeção de 20 μ L) e utilizando detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M10AVP).

A separação cromatográfica dos corantes analisados foi realizada em coluna analítica de fase reversa e pré-coluna Luna-C18 da marca Phenomenex.

Empregou-se um pHmetro da marca Digital Gehaka modelo PG 2000, para as medidas de pH.

As medidas de espectrofotometria na região do UV-Vis foram obtidas utilizando-se um espectrofotômetro da Hewlett Packard (HP) modelo 8453 interfaciado na faixa espectral de 200 a 1000 nm em cubeta de quartzo, da marca Hellma, com capacidade de 5,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm. Os espectros de absorbância na região UV-VIS foram também obtidos a partir da seleção dos picos no próprio cromatograma em modo hidrodinâmico.

Extração em fase sólida foi realizada utilizando um Manifold (Vacuum Manifold Processing Station) e cartucho Strata-X 33u fase reversa polimérica com dimensão de 200 mg / 3 mL, Phenomenex, USA.

Os produtos de degradação dos corantes de cabelo quando submetidos ao processo de cloração foram identificados por análises de LC-ESI-MS-MS QTrap. O método desenvolvido baseou-se primeiramente na varredura total (EMS - Enhanced Mass Spectrometry), acoplada a metodologia usando (EPI) – Enhanced product ion) para fins de elucidação estrutural.

3.3. Metodologia

3.3.1. Preparação das amostras

As soluções individuais dos cinco corantes foram preparadas em concentração de 8×10^{-5} mol L⁻¹ a partir da sua dissolução em água pura. As amostras foram estocadas em frascos de vidro e mantidas sob refrigeração até a sua utilização. Soluções diluídas nas concentrações desejadas foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição em água.

3.3.2. Preparação da fase móvel

A separação dos componentes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em amostras individuais e

misturas comerciais foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se como eluente a mistura de acetonitrila/H₂O variando-se as proporções de acetonitrila de 95% até 5%, contendo líquido iônico (40,00 mmol L⁻¹). Em um frasco de 1 L foi adicionado a água com o líquido iônico e no outro frasco a acetonitrila, estes foram conectados ao CLAE-DAD para as análises. Nas amostras onde testou-se o efeito da trietilamina usou-se como eluente acetonitrila/H₂O e também variou-se as proporções de acetonitrila de 95% até 5%, em que a trietilamina (40,00 mmol L⁻¹) foi adicionada a água para as análises cromatográficas.

3.3.3. Análise dos corantes em formulação comercial

Amostra de tintura comercial de cabelo foi submetida a análise cromatográfica usando etapa prévia de extração em fase sólida usando cartuchos de Strata- X de 200 mg/ 3 mL. Os extratos foram obtidos a partir de 1,0 g da tintura comercial (HF65) dissolvidos em 10 mL de água ultrapura em um balão em sistema de extração a vácuo (Manifold).

Os cartuchos foram condicionados com 3 mL de metanol e adição subsequente de 3 mL de água ultrapura. Posteriormente, foi feita a lavagem da amostra com passagem pelo sistema de 10 mL da amostra dissolvida em 10 mL de água, em seguida foi realizada a passagem de 3 mL de água ultrapura no cartucho. A amostra foi eluída com 6 mL da mistura ACN/H₂O 50:50 (v/v) e secou-se em baixo fluxo de N₂. Após esta etapa, ressuspendeu-se a amostra em um balão de 10 mL com água Milli-Q ultra pura e analisadas em triplicata por CLAE/DAD.

3.3.4. Análise dos corantes nos efluentes do salão de beleza.

A tintura comercial HF 65 foi preparada seguindo recomendações do fabricante. O conteúdo do frasco contendo 120 g do material foi aplicado diretamente nos cabelos. Segundo rótulo do fabricante o mesmo contém: água, extrato de algas, sorbitol, álcool benzílico, EDTA, ácido cítrico, trietanolamina, 1.2-propanodiol, glicose, hidroxietil celulose, cloreto de hidroxipropiltrimônio, diazolidinil ureia, cocoamidopropil betaína, Marrom básico 17, Azul HC 2, Azul básico 99, Marrom básico 16, Violeta ácido 43, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57. Após

aplicação, os cabelos foram massageados para que a tintura fosse distribuída uniformemente sobre eles, e após 30 min, os cabelos foram enxaguados com água morna até a retirada total da tintura. A água de lavagem foi coletada em frasco de 1 L. Lavagens posteriores do cabelo durante 5 dias também foram coletadas e armazenadas em frascos de 1 litro sob temperatura de -5 °C.

As amostras, antes das análises cromatográficas por CLAE-DAD, foram submetidas à extração em fase sólida com cartucho Strata-X.

3.3.5. Análises dos corantes em amostras de água coletada na Estação de tratamento de água (DAAE- Araraquara).

Amostras de 1 litro de água foram coletadas da estação de tratamento do DAAE- Araraquara antes e após o tratamento (no dia 10 de dezembro de 2011 às 15h30min). Estas amostras antes das análises foram filtradas á vácuo em papel de filtro 0,45 para remoção dos resíduos. Estas amostras foram analisadas segundo a metodologia proposta e em virtude de não ter sido detectado os corantes de cabelo foram submetidas a uma amostra simulada contendo os corantes de interesse. Para isto, as amostras coletadas foram fortificadas propositalmente com quantidade apropriada dos padrões dos corantes em concentração de 8×10^{-5} mol L⁻¹ e analisadas segundo medidas das áreas dos picos cromatográficos utilizando-se curva analítica dos padrões nos respectivos tempos de retenção. Outra amostra de 1 litro de água foi fortificada com soluções contendo a tintura comercial e analisadas segundo semelhante procedimento.

Todas as amostras analisadas por CLAE-DAD foram submetidas à extração em fase sólida utilizando-se cartucho Strata-X. Após eluição as mesmas foram secas em N₂ e ressuspendidas com água ultrapura. O mesmo procedimento foi adotado para amostras de água sem fortificação, a qual serviu de branco nas medidas.

3.3.6. Reações dos corantes com peróxido de hidrogênio e cloro ativo.

Na reação de oxidação dos corantes com peróxido de hidrogênio, padronizado previamente, usando-se o seguinte procedimento: 1,0 g da tintura comercial foi dissolvida em 10 mL de água Milli-Q. A amostra de 10 mL foi tratada com 200 µL de H₂O₂ (0,90 mol L⁻¹) e a mistura mantida à temperatura ambiente. As

amostras foram coletadas após tempos de reação entre: 15 min, 60 min e 120 min. A determinação de peróxido de hidrogênio foi realizada através da titulação com permanganato de potássio [61].

Nas amostras de oxidação do corante com cloro ativo utilizou-se uma alíquota de 25 g.L⁻¹ de cloro ativo que foi misturado à 10 mL de solução do corante. A determinação do teor de cloro ativo (2,3 g L⁻¹) foi obtida por padronização com tiosulfato de sódio (método de iodometria) [62]. Os produtos das reações foram analisados por CLAE/DAD.

3.3.7. Análises dos corantes por espectroscopia de massas.

Amostras previamente tratadas dos corantes individualmente com hipoclorito de sódio foram submetidos a extração em fase sólida (cartucho Strata-X) e os produtos diluídos com 50:50 ACN:H₂O, ácido fórmico 0,1 % antes da injeção. Os analitos foram separados em uma coluna Agilent Zorbax C-18 (5 µm, 150 mm x 4.6 mm) usando um amostrador automático Agilent 1200 e uma bomba Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies). Na eluição utilizou-se o modo gradiente usando como modificador de fase o ácido fórmico 0,1 % em ambos solventes H₂O (solvente A) e ACN (solvente B) nas seguintes condições: gradiente linear de 10-80% B de 0 a 8 minutos, 80% B de 8-15 minutos, gradiente linear de 80-100% B de 15-18 minutos, 100% B de 18-25 minutos. A vazão foi de 500 µL min⁻¹.

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas *ion trap linear* (QTrap; Applied Biosystems) equipado com um *TurbolonSpray* conectado ao sistema de cromatografia líquida. Para obter os dados espectrais, foram aplicados 550 °C na temperatura do vaporizador e uma tensão de 3,5 kV no *TurbolonSpray* no modo de ionização positivo. O potencial de dessolvatação foi ajustado para 40 V e N₂ ultrapuro foi usado como gás de colisão.

Para as análises de EPI, a velocidade de varredura foi de 4000 uma s⁻¹, energia de colisão de 30 ± 20V e 50 ms para a captura de íon. Todos os experimentos foram realizados na faixa de 50 a 600 *m/z* com um potencial de entrada de 8 V e trapeamento em Q₀ habilitado.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Comportamento espectrofotométrico dos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em meio aquoso.

Primeiramente foram feitas análises dos cinco corantes analisados pela técnica de espectrofotometria com o objetivo de obter os comprimentos de onda característicos de cada um dos corantes através da absorbância máxima, a qual originará a cor característica dos corantes. A Figura 3 apresenta os respectivos espectros na região do UV-Vis obtidos para 1×10^{-5} mol L⁻¹ dos corantes: Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) em meio aquoso.

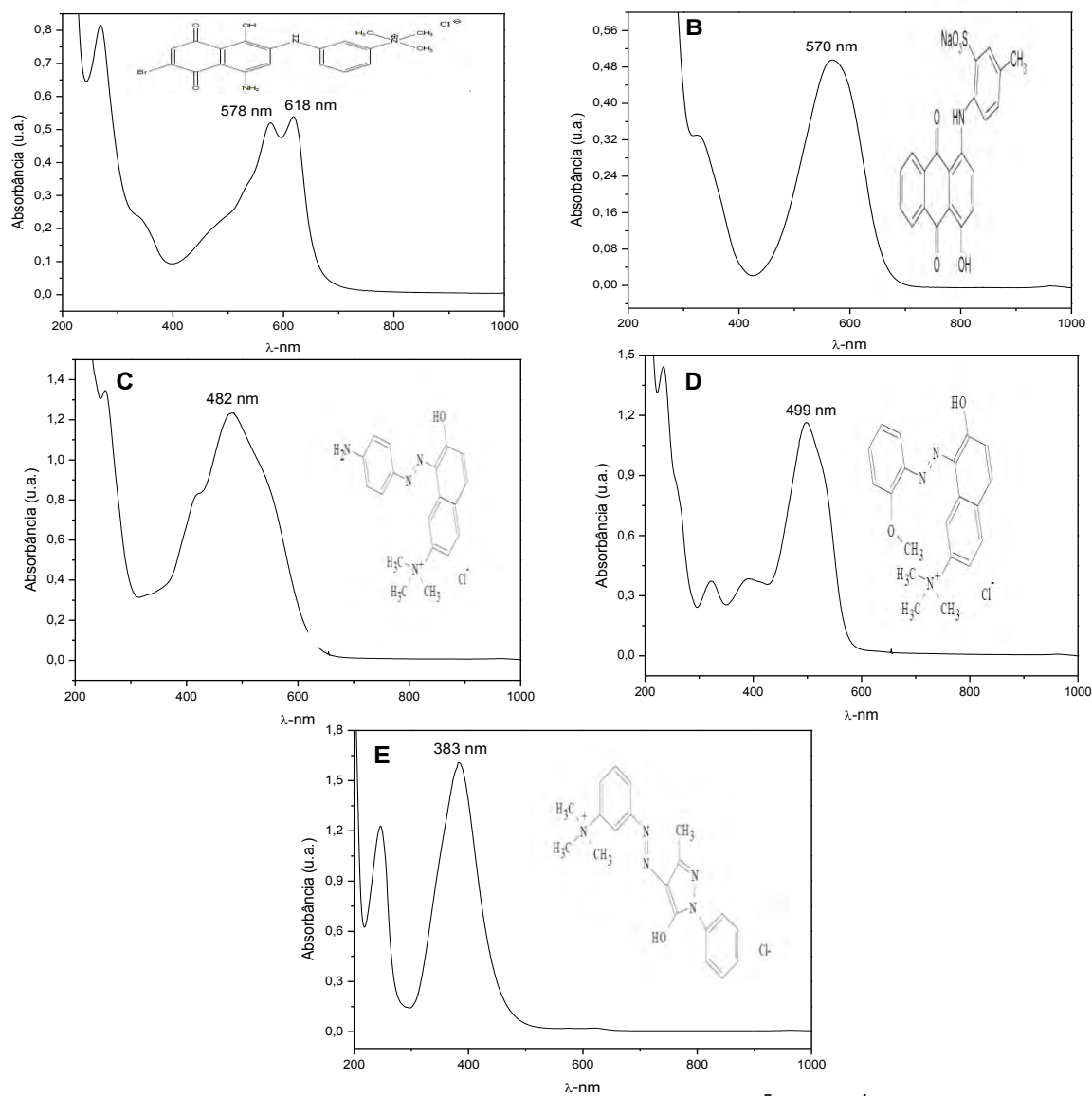


Figura 3. Espectros de absorção na região do UV-Vis 1×10^{-5} mol L⁻¹ dos corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) em meio aquoso.

A análise desses espectros indica que os corantes analisados apresentam grupos cromóforos, com absorvância máxima nos respectivos comprimentos de onda de: Azul básico 99 ($\lambda = 578 \text{ nm}$) e ($\lambda = 618 \text{ nm}$), Violeta ácido 43 ($\lambda = 570 \text{ nm}$), Marrom básico 16 ($\lambda = 482 \text{ nm}$), Vermelho básico 76 ($\lambda = 499 \text{ nm}$) e Amarelo básico 57 ($\lambda = 383 \text{ nm}$). A única exceção foi observada na Figura 3(A) cujos espectros obtidos para o corante Azul básico 99, apresenta dois picos na região do visível ($\lambda = 578 \text{ nm}$ e 618 nm) provavelmente devido a contaminantes, pois este corante possui grandes impurezas. Além disto, observa-se a ocorrência de picos na região do ultravioleta para todos os corantes, atribuídos ao caráter aromático presente na molécula.

A seguir, utilizando-se os picos de máxima absorvância para os corantes, Azul básico 99 ($\lambda = 618 \text{ nm}$), Violeta ácido 43 ($\lambda = 570 \text{ nm}$), Marrom básico 16 ($\lambda = 488 \text{ nm}$), Vermelho básico 76 ($\lambda = 499 \text{ nm}$) e Amarelo básico 57 ($\lambda = 383 \text{ nm}$), construiu-se as curvas analíticas para determinação espectrofotométrica dos corantes, testando para isto intervalo de concentração entre $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mostrados na Figura 4.

Uma relação linear entre Absorvância e concentração do corante é obtida em todo o intervalo de concentração investigado, indicando comportamento que segue a lei de Lambert-Beer.

Os respectivos limites de detecção e quantificação foram determinados pelas equações $\mathbf{LD = xb + 3 sb}$ onde: xb = valor médio do branco para o conjunto de dados, sb = desvio padrão do branco para o conjunto de dados, k = fator numérico, escolhido de acordo com o intervalo de confiança desejado e $\mathbf{LQ = xb + 10 sb}$, para o Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E), respectivamente. Os respectivos parâmetros analisados linearidade, coeficiente de correlação (r), absortividade molar, limite de detecção (LD) e limite de quantificação(LQ) são apresentados na Tabela 1.

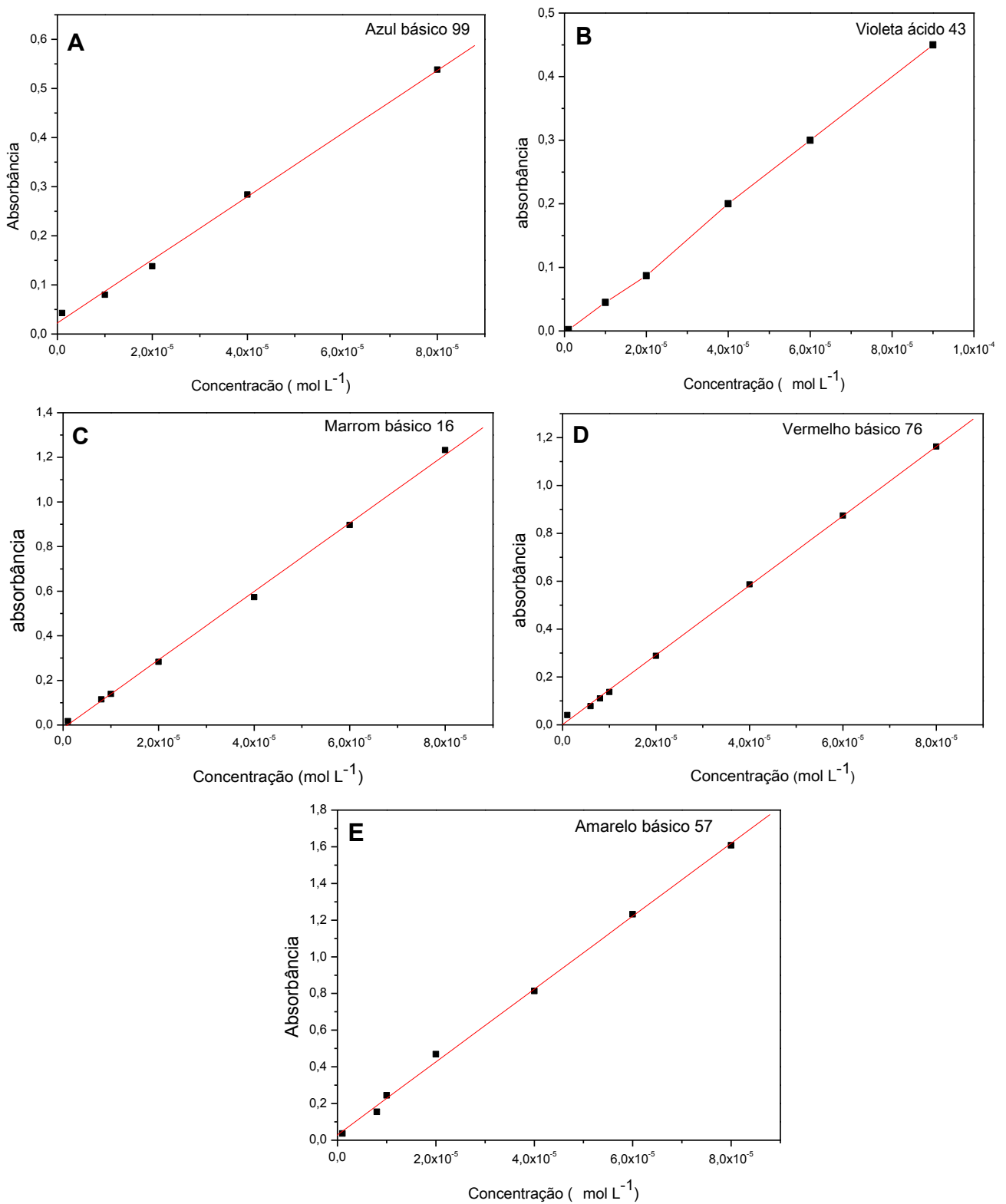


Figura 4. Curvas de calibração obtidas para os corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) em meio aquoso.

Tabela 1. Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Absorbância vs concentração dos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, em meio aquoso por espectrofotometria na região do UV-Visível (medidas em triplicata).

Corantes	λ (nm)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)	Limite de detecção / mol L ⁻¹	Limite de quantificação / mol L ⁻¹
Azul básico 99	618	$y=12761,67x+0,0126$	0,9912	$1,21 \times 10^{-7}$	$3,66 \times 10^{-7}$
Violeta ácido 43	570	$y=11859,50x+0,0637$	0,9971	$3,65 \times 10^{-7}$	$1,11 \times 10^{-6}$
Marrom básico 16	482	$y=25407,40x+0,0160$	0,9905	$1,79 \times 10^{-8}$	$5,43 \times 10^{-8}$
Vermelho básico 76	499	$y=23434,67x+0,0020$	0,9925	$1,78 \times 10^{-8}$	$5,44 \times 10^{-8}$
Amarelo básico 57	383	$y=29934,85x+0,0230$	0,9915	$1,56 \times 10^{-8}$	$4,73 \times 10^{-8}$

De acordo, com os parâmetros analíticos encontrados observa-se que a técnica de espectrofotometria na região do visível poderia ser utilizada para determinação dos corantes em amplo intervalo de concentração e baixos limites de quantificação, tais como 10^{-8} mol L⁻¹. Isto ocorre devido a alta absorvidade molar dos corantes em estudo. No entanto, os espectros podem apresentar sobreposição de bandas em amostras contendo misturas dos corantes. Por isto, investigou-se a seguir o comportamento espectrofotométrico de mistura dos cinco corantes em meio aquoso.

A Figura 5 apresenta os respectivos espectros na região do UV-Vis obtidos na concentração de $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ dos corantes. Foram feitas misturas equimolares de Marrom básico 16 e Amarelo básico 57, Marrom básico 16 e Vermelho básico 76, Marrom básico 16 e Azul básico 99, Amarelo básico 57 e Vermelho básico 76, Amarelo básico 57 Azul básico 99 e Vermelho básico 76 e Azul básico 99 em meio

aquoso e misturados na mesma proporção para comprovar se estes corantes juntos interferem nas medidas espectrais um do outro.

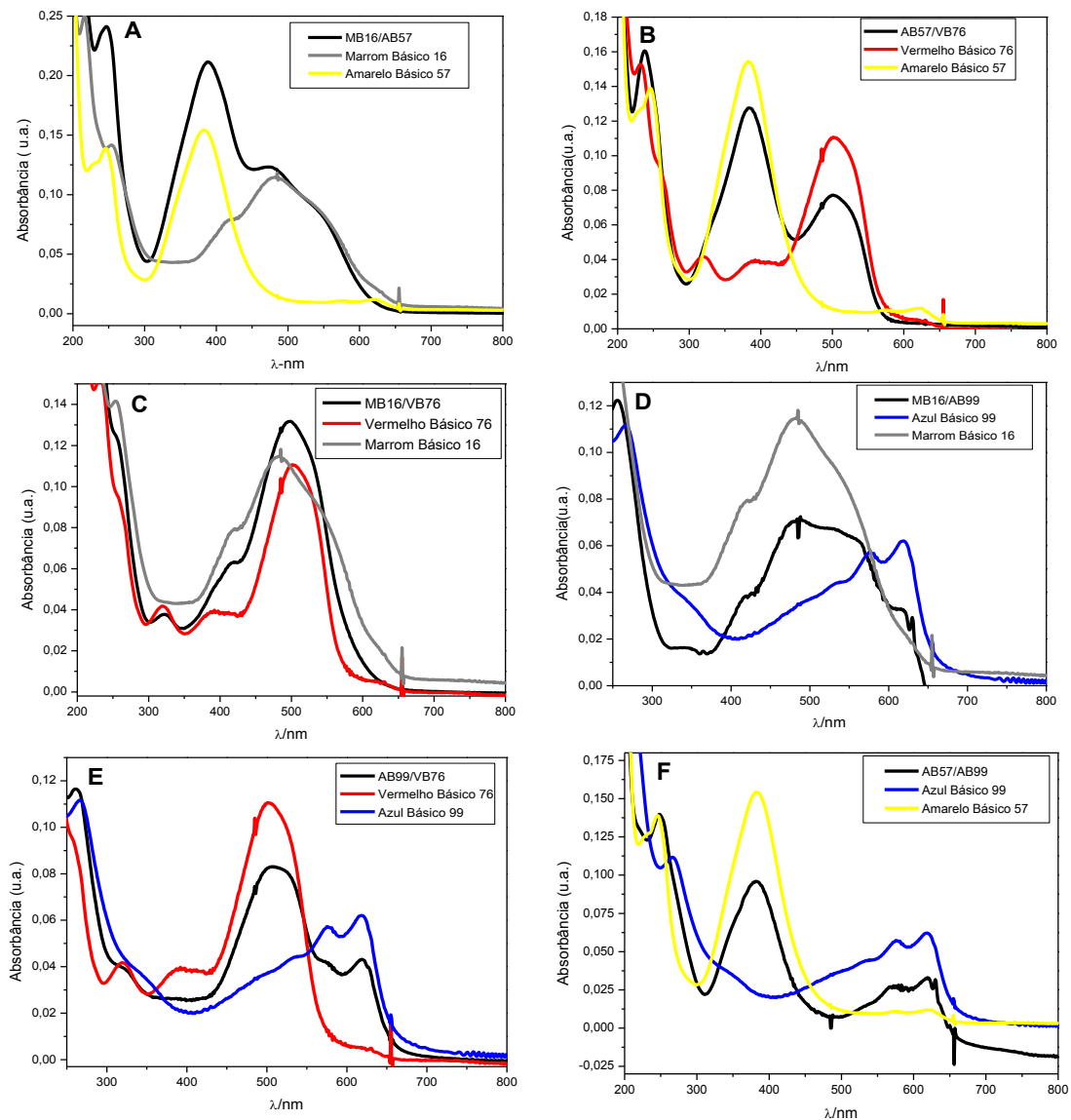


Figura 5. Espectros UV-Vis de corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em meio aquoso e misturados na mesma proporção. $C = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A análise da Figura 5 indica que os espectros das misturas dos corantes apresentadas nos gráficos A, B, C, D e E mostraram bandas bem definidas e não sobrepostas, podendo afirmar que esses corantes não reagem quando são misturados entre si como misturas binárias. No entanto, nos espectros C e D observou-se a sobreposição das bandas impedindo a análise individual desses componentes na mistura de ambos, pois os corantes nestes dois gráficos

apresentaram comprimentos de onda muito semelhantes devido aos espectros de absorbância apresentados.

O comportamento espectrofotométrico da mistura dos padrões, em meio aquoso, dos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 e outra mistura porém na ausência do Azul básico 99 são apresentados na Figura 6.

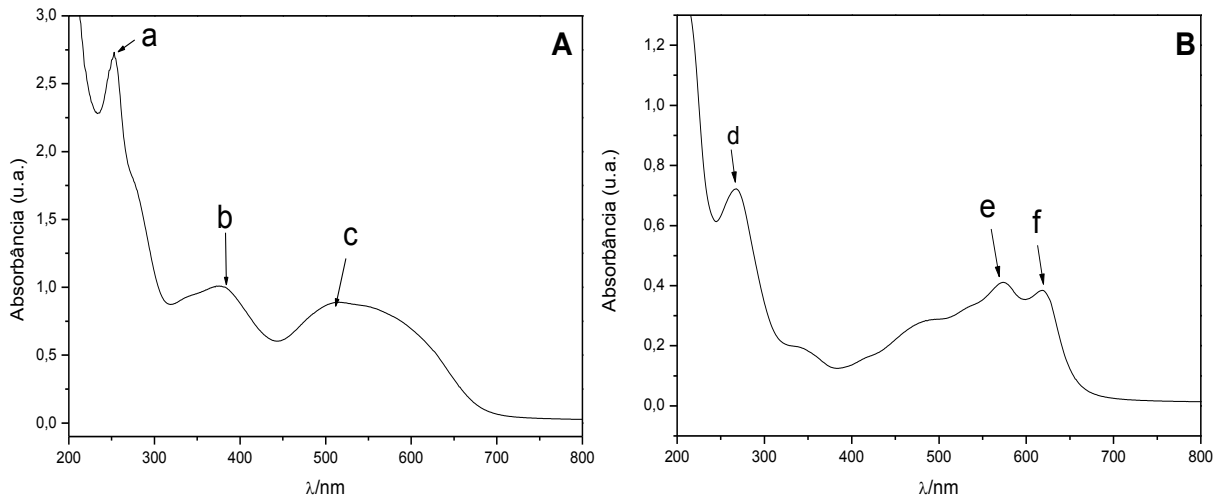


Figura 6. Espectros de UV-Vis de: (A) mistura dos corantes (Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57). (B) mistura dos corantes (Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57), em meio aquoso. $C = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

É observado sobreposição espectral das bandas de absorção dos corantes na mistura, dificultando a identificação de seus componentes. O espectro da Figura 6-A apresenta absorções com máximos nos comprimentos de onda: $\lambda = 252 \text{ nm}$, $\lambda = 380 \text{ nm}$ e $\lambda = 510 \text{ nm}$, correspondentes as letras a, b e c, respectivamente. Já o gráfico B também apresenta três absorções principais nos seguintes comprimentos de onda: $\lambda = 268 \text{ nm}$, $\lambda = 576 \text{ nm}$ e $\lambda = 618 \text{ nm}$, correspondente as letras d, e e f, respectivamente. Na análise da mistura dos cinco corantes pela técnica de espectrofotometria não houve a formação de cinco espectros UV-Vis como esperado, sendo que esta técnica não é a mais apropriada para a separação e quantificação dos corantes.

Deste modo, investigou-se a seguir a possibilidade de usar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, cuja seletividade é melhor, além de inúmeras vantagens como alta sensibilidade, alta resolução, versatilidade e bons resultados

quantitativos. A técnica oferece a vantagem de poder ser associada ao detector de arranjo de diodos (DAD) que ainda permite a obtenção dos espectros dos analitos de interesse eluídos em diferentes tempos de retenção. Assim, é possível distinguir espécies que eluem em um mesmo tempo de retenção e que absorvem em comprimentos de onda distintos. Alguns estudos empregando esta técnica em fase-reversa foram reportados para corantes azo.

4.2. Análise dos corantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As melhores condições cromatográficas para identificação e separação dos corantes, Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, foram investigados usando amostras individuais dos mesmos e CLAE/DAD.

Para isto, estudou-se inicialmente a fase móvel metanol/tampão fosfato pH=7,0, no modo isocrático na proporção de 50:50 (v/v) e vazão de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 30 °C. Diferentes parâmetros foram testados tais como: composição da fase móvel, seletividade, vazão entre outros. A utilização de metanol como fase móvel não apresentou resultados satisfatórios, o que pode ser explicado pela pouca interação dos corantes com a fase estacionária. Deste modo, testou-se a seguir a utilização de um solvente mais apolar, já que os corantes são mais polares, como acetonitrila.

A utilização de ACN/água e ACN/tampão fosfato pH=7,0, como fase móvel, foi testada em diferentes proporções, com intuito de melhorar a resolução dos picos e diminuir o tempo da corrida cromatográfica. Em proporções de 45:55 ACN/tampão fosfato pH=7,0, obteve-se as melhores condições, embora ainda observa-se cromatogramas com picos largos e de baixa resolução. Estes resultados são mostrados na Figura 7.

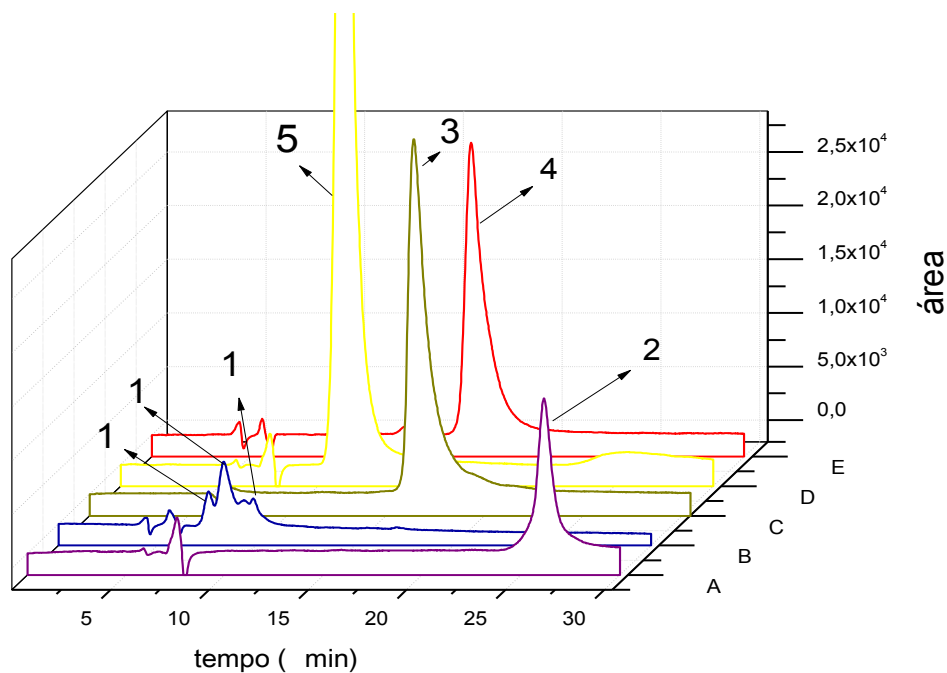


Figura 7. Cromatograma CLAE-DAD obtido para $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes Azul básico 99 (B, pico1), Violeta ácido 43 (A, pico 2), Marrom básico 16 (C, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (D, pico 5) em meio aquoso obtidos em coluna C18, fase móvel 45:55 ACN/tampão fosfato. vazão = $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detecção: $\lambda = 383 \text{ nm}; 482 \text{ nm}; 499 \text{ nm}; 523 \text{ nm}, 618 \text{ nm}$ correspondentes à: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76) e Amarelo básico 57, respectivamente.

Pela análise observa-se que os corantes, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, são identificados em tempo de retenção de: $t_r = 26,23 \text{ min}$; $t_r = 16,15 \text{ min}$; $t_r = 17,48 \text{ min}$ e $t_r = 11,29 \text{ min}$ minutos respectivamente. Como pode ser observado os cromatogramas obtidos para o corante Azul básico 99, apresentam 3 picos em tempos de retenção de: $t_r = 7,57 \text{ min}$; $t_r = 8,53 \text{ min}$ e $t_r = 9,80 \text{ min}$ minutos respectivamente. Este comportamento indica que o corante Azul básico 99 apresenta alto índice de impureza e é na verdade um composto comercializado pela mistura, de pelo menos, 3 componentes.

Em adição, o alargamento dos picos observado pode ser atribuído aos silanóis residuais presentes na coluna e, portanto, poderiam inibir a eluição das substâncias de interesse de modo eficiente.

Em seguida, os cinco corantes foram misturados e analisados nas mesmas condições mostradas anteriormente. Os resultados são apresentados na Figura 8.

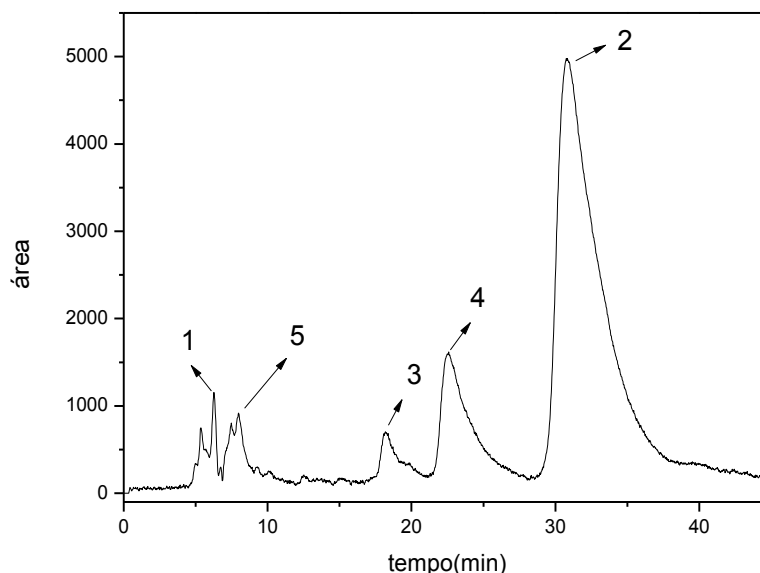


Figura 8. Cromatograma CLAE-DAD obtido para $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da mistura dos corantes Azul básico 99 (1), Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) em meio aquoso obtidos em coluna C18, fase móvel 45:55 ACN/ tampão fosfato. vazão = $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

Pela análise da Figura 8 é possível observar que os corantes não foram totalmente separados e os picos cromatográficos são assimétricos, mostrando que o método proposto não é eficiente para a separação de misturas nem para otimização individual dos corantes.

Sendo assim, com o objetivo de diminuir o encaudamento dos picos e obter uma separação cromatográfica melhor foi testado a adição de trietilamina e líquido iônico para mascarar os sítios de adsorção fortes em silanóis residuais, proporcionando melhor simetria dos picos cromatográficos.

4.3. Efeito da adição de trietilamina à fase móvel na otimização cromatográfica.

O efeito da concentração de trietilamina no perfil cromatográfico foi investigada em diferentes condições analíticas. Fases móveis em diferentes proporções foram testadas e as melhores condições experimentais obtidas foram: fase móvel de 65:35 ACN/tampão fosfato $\text{pH} = 7,0$ e adição de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, de trietilamina sob vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A concentração dos corantes foi de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com injeções de $20 \text{ } \mu\text{L}$. Os resultados obtidos para os cinco corantes são mostrados na Figura 9.

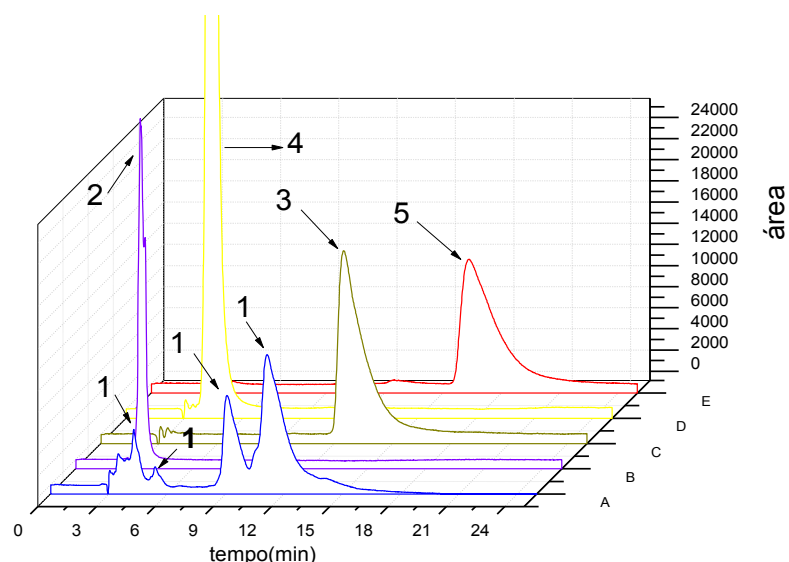


Figura 9. Cromatograma CLAE/DAD obtido para $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes, Azul básico 99 (A, pico 1), Violeta ácido 43 (B, pico 2), Marrom básico 16 (C, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (D, pico 5), em coluna C18, fase móvel 65:35 ACN/ tampão fosfato + 5,0mL de trietilamina $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. T = $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detecção: $\lambda = 383 \text{ nm}; 482 \text{ nm}; 499 \text{ nm}; 523 \text{ nm}, 618 \text{ nm}$ correspondentes à: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76) e Amarelo básico 57, respectivamente.

A análise da Figura 9 indica que os picos obtidos para a análise dos padrões dos corantes separadamente mostra que Violeta ácido 43 e Amarelo básico 57 não apresentaram encaudamentos e são identificados no tempo de retenção de: $t_r = 4,45 \text{ min}$ e $t_r = 6,25 \text{ min}$, respectivamente. No entanto, embora o fluxo tenha sido diminuído para $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, os cromatogramas obtidos para os corantes Vermelho básico 76, Marrom básico 16, identificados em $t_r = 22,5 \text{ min}$, $t_r = 16,4 \text{ min}$, respectivamente, continuaram a apresentar encaudamento. Os picos do corante Azul básico 99 nos $t_r = 6,08 \text{ min}$; $t_r = 11,57 \text{ min}$ e $t_r = 14,3 \text{ min}$, respectivamente, também apresentaram encaudamento, além de confirmar que o corante se trata de uma mistura e não de um padrão puro. A identificação de cada corante foi comprovada pelos respectivos espectros UV-Vis mostrados na Figura 10.

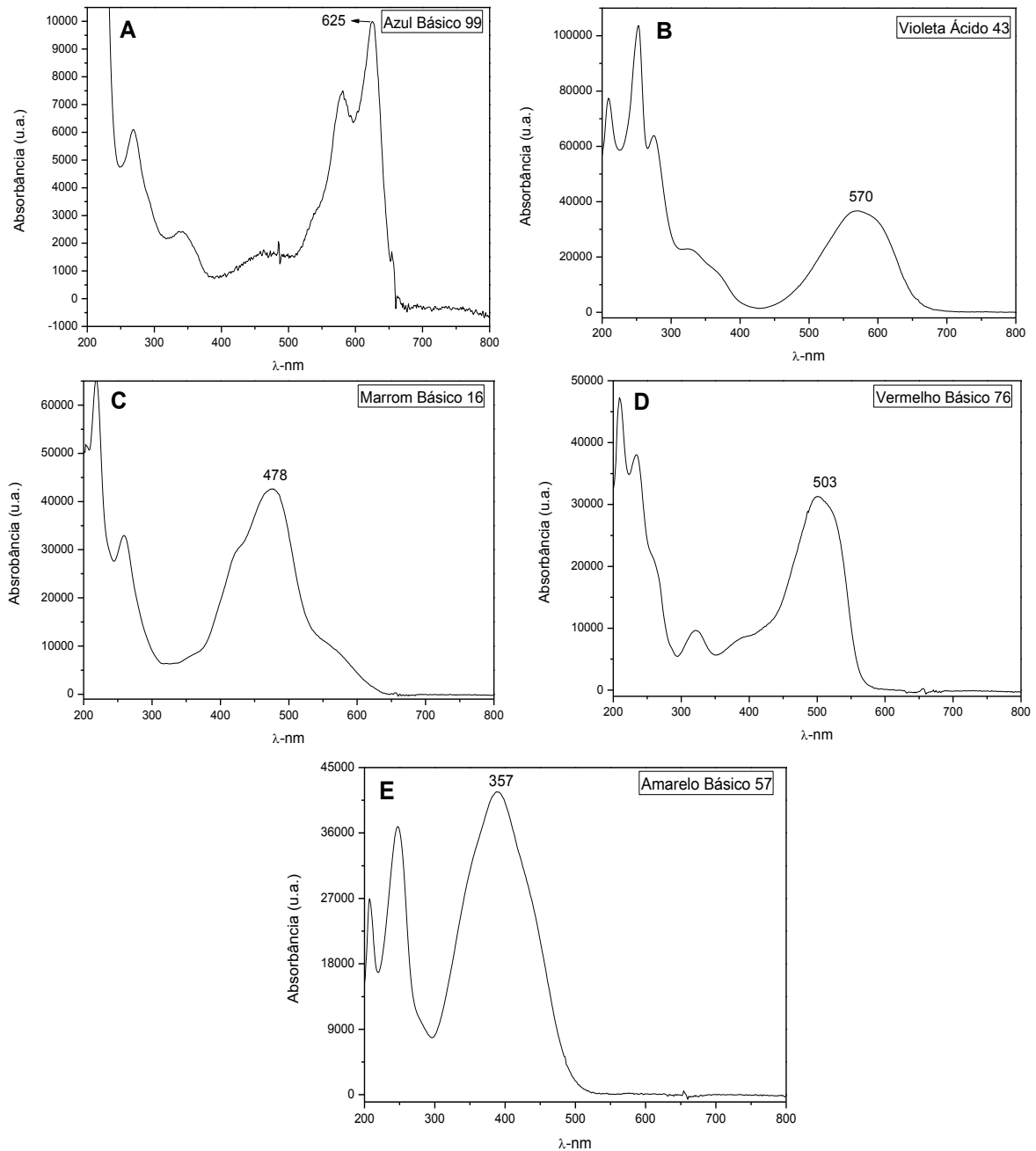


Figura 10. Espectros de UV-Vis dos corantes: Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E), em meio aquoso. $C = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 10 estão representados todos os espectros de UV-Vis para os picos correspondentes à cada corante na mistura. Assim, pode-se concluir que mesmo mudando o fluxo o problema encontrado na separação dos corantes continua presente, o qual interfere na separação dos outros corantes. Apesar do fluxo ser menor, os picos continuaram a sair com encaudamento mesmo na presença de trietilamina.

Outros parâmetros foram testados tais como, vazão, temperatura, proporção de fase móvel e observou-se maiores alterações nas condições cujo cromatograma está apresentado na Figura 11.

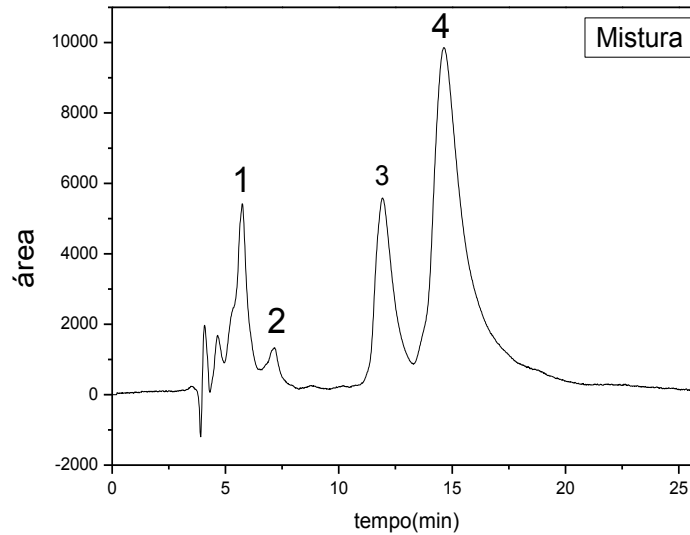


Figura 11. Cromatograma CLAE/DAD obtido $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da mistura dos corantes em coluna C18, fase móvel 65:35 ACN/tampão fosfato + 5,0mL de trietilamina $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

A mistura dos padrões dos corantes analisados na Figura 11 apresenta picos encaudados e muito próximos, sendo muito difícil identificar os corantes nestas condições experimentais. Os picos 1, 2, 3 e 4 apresentaram tempos de retenção de: $t_r = 5,76 \text{ min}$; $t_r = 7,12 \text{ min}$; $t_r = 11,92 \text{ min}$ e $t_r = 14,70 \text{ min}$, respectivamente.

Utilizando-se as mesmas condições experimentais utilizada na Figura 9, porém com fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, obteve-se melhor resolução dos picos como mostrado na Figura 12.

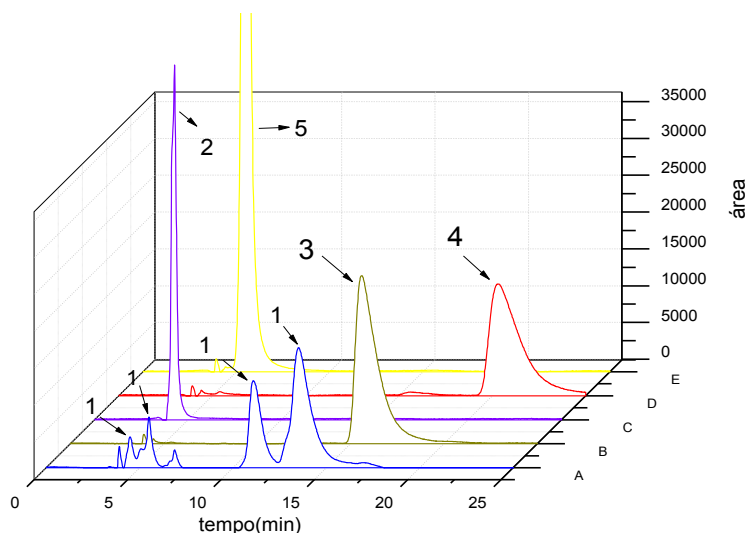


Figura 12. Cromatograma CLAE/DAD obtido para $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes, Azul básico 99 (A, pico 1), Violeta ácido 43 (C, pico 2), Marrom básico 16 (B, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (D, pico 5), em coluna C18, fase móvel 65:35 ACN/ tampão fosfato + 5,0mL de trietilamina $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. T = $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detecção: $\lambda = 383 \text{ nm}; 482 \text{ nm}; 499 \text{ nm}; 523 \text{ nm}, 618 \text{ nm}$ correspondentes à: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76) e Amarelo básico 57, respectivamente.

Análise da Figura 12 indica que os picos obtidos para os corantes Violeta ácido 43 (pico 2) e Amarelo básico 57 (pico 5) não apresentaram encaudamentos e são identificados no tempo de retenção de: $t_r = 4,45 \text{ min}$ e $t_r = 6,25 \text{ min}$. No entanto, embora o fluxo tenha sido diminuído para $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ os cromatogramas obtidos para os corantes Vermelho básico 76 e Marrom básico, identificados em $t_r = 22,5 \text{ min}$ e $t_r = 16,4 \text{ min}$, respectivamente, continuaram a apresentar encaudamento. Deste modo, identificações dos corantes foram comprovadas pelos respectivos espectros (Figura 13).

Na Figura 13 estão representados todos os espectros UV-Vis correspondentes aos picos cromatográficos da mistura. Assim, pode-se concluir que mesmo mudando a vazão, o problema encontrado na separação dos corantes permanece, ou seja, o corante Azul básico 99 interfere na separação dos demais. Apesar do fluxo ser menor, os picos continuaram a sair com encaudamento mesmo na presença de trietilamina.

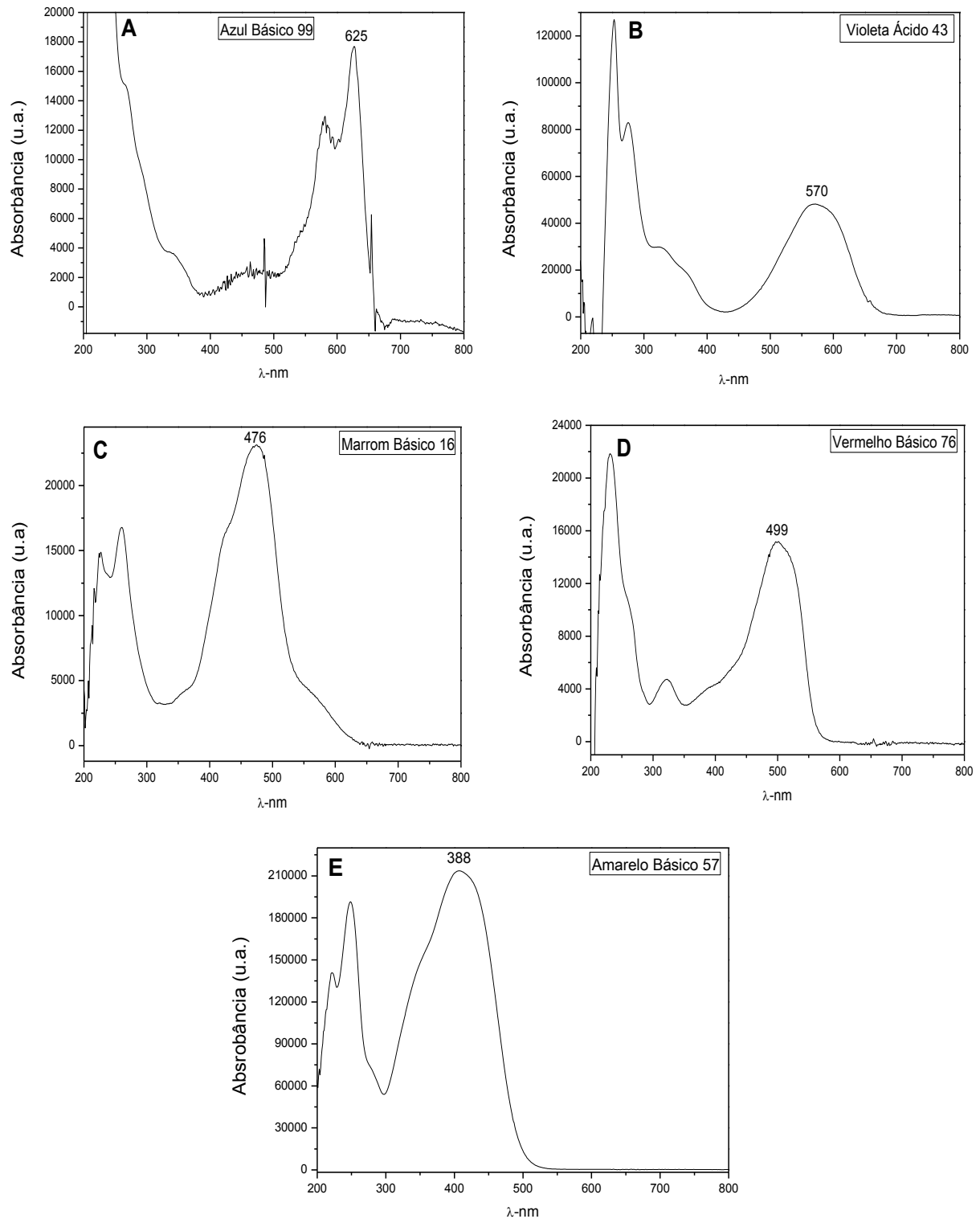


Figura 13. Espectros de UV-Vis de corantes, Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E), em meio aquoso. $c = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Outros parâmetros foram testados e observou-se grandes mudanças no cromatograma da mistura dos corantes apresentados na Figura 14.

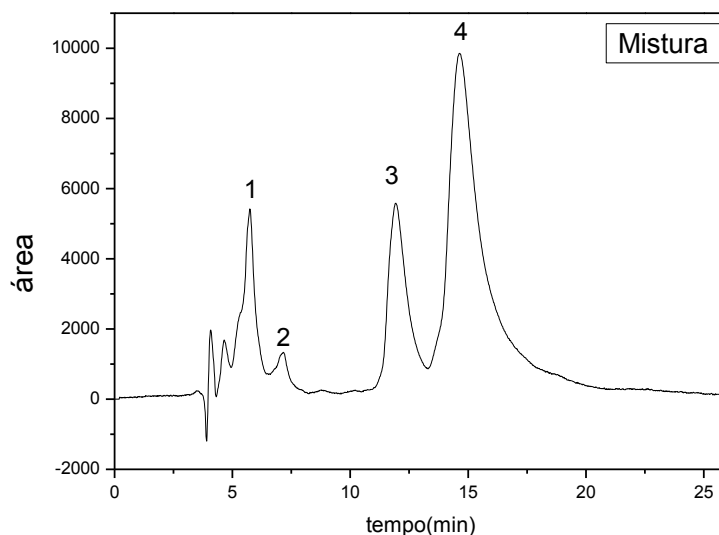


Figura 14. Cromatogramas obtidos da mistura, eluída com 65:35 ACN/tampão fosfato com adição de 5,0mL de trietilamina $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão= $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

Embora o perfil cromatográfico seja bem resolvido para os corantes individuais observa-se a perda de resolução dos picos na mistura, sendo que os picos 1, 2, 3 e 4 apresentaram tempos de retenção de: $t_r = 5,44 \text{ min}$; $t_r = 7,18 \text{ min}$; $t_r = 11,37 \text{ min}$ e $t_r = 15,58 \text{ min}$, respectivamente. Os picos cromatográficos referentes ao Azul básico 99 são pouco resolvidos e complicados pela ocorrência de uma mistura complexa pelo alto teor de contaminantes. Sendo assim, não houve sucesso para uma separação satisfatória de todos os corantes na mistura, indicando que provavelmente deve ocorrer alguma interação entre os componentes da mistura e a trietilamina.

Deste modo investigamos a seguir o efeito do líquido iônico tetrafluoroborato 1-butil-3-metilimidazólio ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) na separação cromatográfica dos corantes variando-se outras condições experimentais tais como: mudança no fluxo, temperatura, proporção de acetonitrila na fase móvel e concentração do líquido iônico adicionado à fase móvel.

4.4. Efeito da presença de Líquido Iônico na otimização cromatográfica.

Uma alternativa recentemente desenvolvida para se contornar problemas advindos do uso solventes orgânicos em eletroanalítica e extração líquido-líquido é o uso de líquidos iônicos (LIs) a temperatura ambiente (usualmente chamado de RTIL, do inglês Room Temperature Ionic Liquid) ^[16,17]. A literatura revela um crescente interesse na aplicação deste como eletrólito, devido suas propriedades físico-químicas diferenciadas. LIs é a nomenclatura habitual designada a compostos que estão presentes na forma de íons no estado líquido sob temperaturas ao redor de 25 °C. Sua formação comumente envolve cátions orgânicos não simétricos volumosos e um ânion inorgânico fracamente coordenado ^[16,17]. Os LIs possuem pressão de vapor negligenciável, não são inflamáveis e apresentam alta estabilidade química e térmica. Propriedades estas desejadas em materiais promissores na substituição de reações que requerem solventes orgânicos voláteis ^[18].

Muitos LIs são solúveis em água e podem ser usados como eletrólito de suporte ideal para estudos eletroquímicos, aditivos na fase móvel em cromatografia líquida e eletroforese capilar, além de serem utilizados como fase estacionária em cromatografia gasosa. Com o aumento da cadeia alquílica há uma tendência à diminuição do tempo de retenção dos analitos e isso pode ser explicado devido à delocalização da carga positiva do cátion imidazólico, repulsão dos ânions presente nos LIs com o analito e também pelo efeito de impedimento estérico ^[19,20].

As diferentes propriedades dos LIs têm despertado o interesse para desenvolver novos métodos de separação e análises, especialmente em eletroforese capilar e cromatografia com detecção eletroquímica ^[19,20]. No presente trabalho, a expectativa no uso destes compostos se baseia como aditivos no eluente capazes de preservar suas propriedades intermoleculares que resultariam na melhora da separação cromatográfica devido aos seguintes efeitos: para que os cátions do LI possam interagir e competir com os grupos silanóis da fase estacionária e os grupos alquila não polares da fase estacionária possam interagir com o cátion quaternário do LIs; os que os ânions constituintes dos LIs sejam responsáveis por formação de par iônico com os solutos catiônicos, os quais seriam os corantes de cabelo.

Ao adicionar o líquido iônico na fase móvel utilizou diferentes valores de vazões e proporções de ACN/água, porém a fase móvel 65:35 ACN/ água + 2,0 mL

de líquido iônico tetrafluoroborato 1-butil-3-metilimidazólio ($C_8H_{15}BF_4N_2$) sob concentração de $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ foi a que apresentou melhores resultados.

A Figura 15, apresenta os cromatogramas CLAE/DAD obtidos para solução $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos cinco corantes preparados individualmente, que foram analisados separadamente nas condições descritas a seguir.

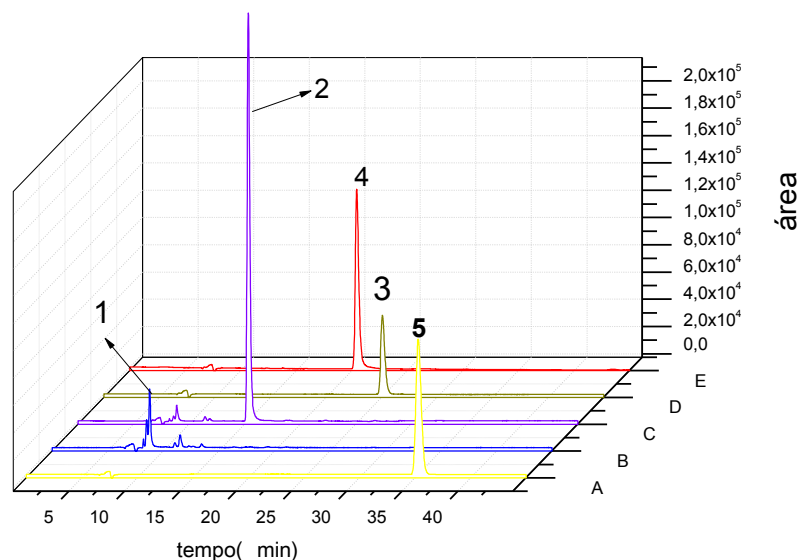


Figura 15. Cromatograma CLAE/DAD obtido na concentração $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos padrões individuais dos corantes: Azul básico 99 (B, pico 1), Violeta ácido 43 (C, pico 2), Marrom básico 16 (D, pico 3), Vermelho básico 76 (E, pico 4) e Amarelo básico 57 (A, pico 5) e eluída com 35:65 ACN/ água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão= $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detecção: $\lambda = 383 \text{ nm}$; 482 nm ; 499 nm ; 523 nm , 618 nm correspondente à: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76) e Amarelo básico 57, respectivamente.

Os tempos de retenção para os corantes, Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, foram $t_r = 8,71 \text{ min}$; $t_r = 15,86 \text{ min}$; $t_r = 20,58 \text{ min}$; $t_r = 25,17 \text{ min}$ e $t_r = 35,30 \text{ min}$, respectivamente. Estes resultados sugerem que a adição do líquido iônico à fase móvel promove uma excelente separação e resolução dos padrões dos corantes com picos sem encaudamento. A Figura 16 apresenta os picos cromatográficos da mistura dos padrões.

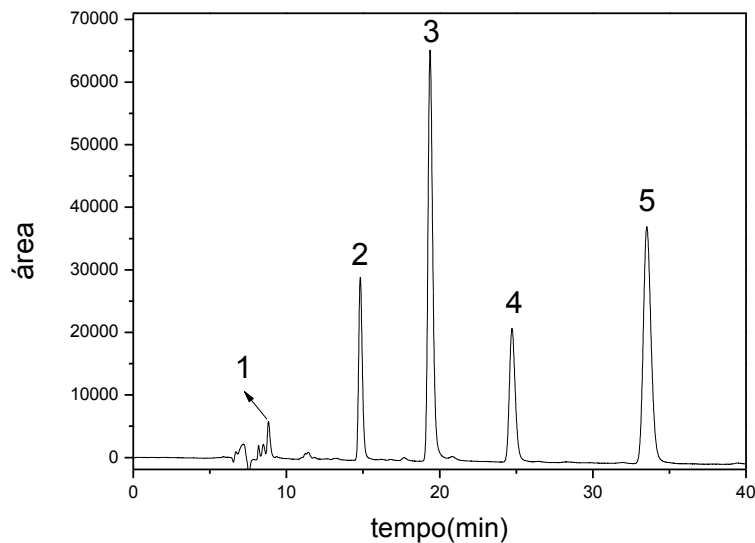


Figura 16. Cromatograma CLAE/DAD obtido na concentração $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da mistura dos padrões dos corantes Azul básico 99 (1) , Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) eluídos com 35:65 ACN/ água + 2,0mL de Líquido iônico ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. T = $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detecção: $\lambda = 413\text{nm}$.

A mistura dos padrões apresentou cinco picos bem definidos e resolvidos com os seguintes tempos de retenção: $t_r = 8,96 \text{ min}$; $t_r = 14,85 \text{ min}$; $t_r = 19,35 \text{ min}$; $t_r = 24,59 \text{ min}$ e $t_r = 34,59 \text{ min}$, que correspondem, respectivamente, aos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 e pelos espectros ainda pode-se comprovar que cada pico obtido na separação da mistura está no mesmo tempo de retenção dos seus respectivos padrões puros.

A Figura 17 mostra as respectivas curvas analíticas obtidas no CLAE/DAD referente a mistura dos cinco corantes. Uma relação linear entre Área e Concentração do corante é obtida em todo o intervalo de concentração investigado, indicando comportamento que segue a lei de Lambert-Beer.

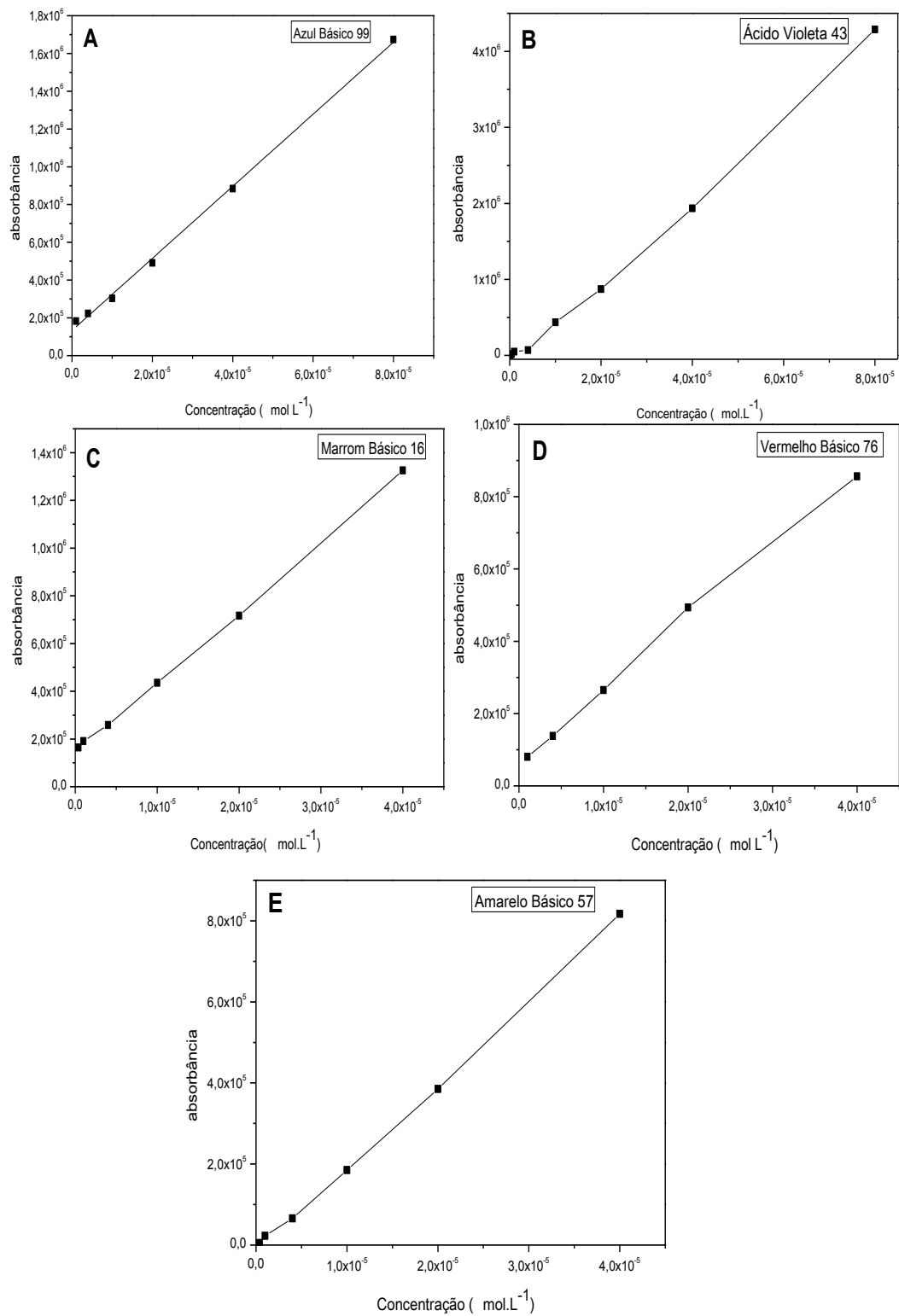


Figura 17. Curvas de calibração obtidas para os corantes Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) em meio aquoso.

Os respectivos limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Área vs concentração para os corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em meio aquoso (medidas em triplicata).

Corantes	T _r (min)	λ _{max}	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)	Limite de detecção/ mol L ⁻¹	Limite de quantificação / mol L ⁻¹
Azul básico 99	8,71	618	$y=1,91 \times 10^{10}x+133.295,7$	0,9981	$1,21 \times 10^{-7}$	$3,66 \times 10^{-7}$
Violeta ácido 43	15,86	570	$y=5,34 \times 10^{10}x-78.208,9$	0,9956	$2,71 \times 10^{-6}$	$8,21 \times 10^{-6}$
Marrom básico 16	20,58	482	$y= 2,92 \times 10^{10}x+148.466,0$	0,9980	$7,53 \times 10^{-7}$	$2,28 \times 10^{-6}$
Vermelho básico 76	25,17	499	$y= 2,01 \times 10^{10}x+65.552,9$	0,9970	$1,91 \times 10^{-6}$	$5,86 \times 10^{-6}$
Amarelo básico 57	35,30	383	$y=2,05 \times 10^{10}x-10.277,6$	0,9980	$1,09 \times 10^{-6}$	$3,31 \times 10^{-6}$

Observa-se que as curvas analíticas dos corantes apresentam coeficientes de correlação próximos à 1. Os valores de LQ e LD, que foram obtidos através da equação de reta gerada pela curva analítica, apresentam valores na ordem de 10^{-6} a 10^{-7} e boa sensibilidade.

4.5. Aplicação do método para determinação dos corantes em tintura comercial.

Antes de começar a análise da tintura comercial foi necessário a sua purificação, já que nelas não estavam contidos somente os 5 corantes estudados, mas também outros compostos tais como, sorbitol, extrato de algas, EDTA, ácido cítrico, álcool benzílico, cloreto de hidroxipropil trimônio, entre outros. Sendo assim, foi utilizada a extração em fase sólida, eluente 50:50 ACN/água, para a retirada desses constituintes da tintura comercial. Primeiramente, foi aplicado o método de extração para a mistura dos padrões, e comparando-se os resultados obtidos com a mistura dos padrões não submetidos à extração em fase sólida. A Figura 18 apresenta os cromatogramas CLAE da mistura dos 5 padrões dos corantes após extração em fase sólida.

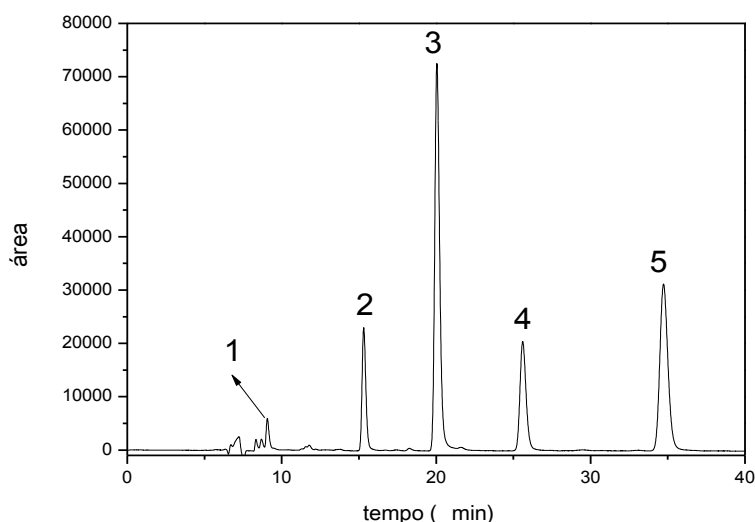


Figura 18. Cromatograma CLAE/DAD obtido da mistura dos padrões dos corantes Azul básico 99 (1), Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) na concentração $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Detecção: $\lambda = 413 \text{ nm}$.

É possível observar na Figura 18 que os 5 corantes são separados apropriadamente em tempos de retenção para AB 99, VA 43, MB 16, VB 76 e AB 57, $t_r = 9,12$ min; $t_r = 15,32$ min; $t_r = 20,06$ min; $t_r = 25,64$ min e $t_r = 34,83$ min, respectivamente. Os cromatogramas da mistura dos padrões dos corantes apresentaram excelente separação dos picos após utilizar o método de extração proposto, mostrando que o método é eficiente e que poderia ser usado na amostra comercial.

Através das áreas dos picos nos cromatogramas e a equação da reta obtida pela curva de calibração dos cinco corantes calculou-se a concentração de cada corante na mistura e a sua respectiva recuperação da água fortificada com os corantes da mistura dos padrões (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de recuperação dos corantes na água fortificada com a mistura dos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 (medidas em triplicata).

Corantes analisados por CLAE (DAD)	Concentração adicionada (mol L ⁻¹)	Concentração encontrada após extração por SPE (mol L ⁻¹)	Porcentagem de recuperação (%)
Azul básico 99	$7,50 \times 10^{-6}$	$7,51 \times 10^{-6}$	$100,0 \pm 1,0$
Violeta ácido 43	$2,93 \times 10^{-5}$	$2,52 \times 10^{-5}$	$86,0 \pm 2,0$
Marrom básico 16	$8,65 \times 10^{-6}$	$7,18 \times 10^{-6}$	$83,0 \pm 2,0$
Vermelho básico 76	$1,32 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^{-5}$	$88,0 \pm 1,0$
Amarelo básico 57	$1,96 \times 10^{-5}$	$1,78 \times 10^{-5}$	$90,0 \pm 1,0$

Os resultados indicaram índices satisfatórios de recuperação entre 83 à 100% mostrando que o método de extração em fase sólida proposto é eficaz, podendo ser utilizado nas tinturas comerciais de cabelo.

A otimização da etapa prévia de extração em fase sólida em cartucho Strata-X, foi testado utilizando-se vários tipos de solventes para eluição e as melhores condições foram ACN/água na proporção de 50:50 ACN/água. A seguir, alíquotas da amostra de tintura comercial ($m=1,00$ g) extraídas previamente e dissolvidas em ACN/água foram submetidas à análise por CLAE/DAD utilizando a metodologia proposta e os cromatogramas são mostrados na Figura 19.

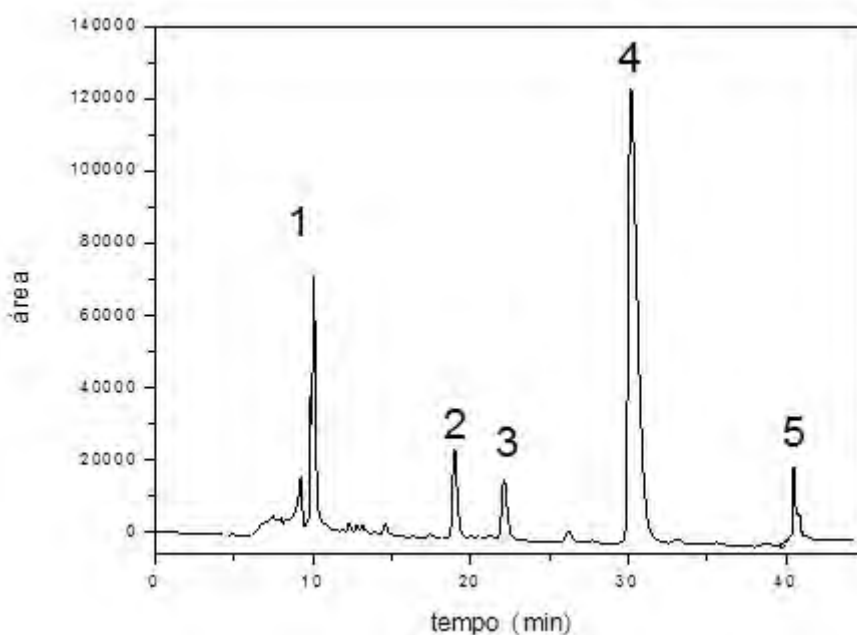


Figura 19. Cromatograma CLAE/DAD obtido da análise dos corantes na tintura comercial extraídos em 50:50 ACN/ água e eluídos com 35:65 ACN/água + 2,0 mL de líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04$ mol L^{-1} . vazão= $0,4$ ml min^{-1} . $T = 30$ °C, Detecção= $\lambda = 413$ nm. (1) =pico do corante Azul básico 99, (2)=pico do corante Violeta ácido 43 , (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57.

Os cromatogramas obtidos para a amostra comercial HF 65 apresentaram picos bem resolvidos nos seguintes tempos de retenção: $tr=10,05$ min; $tr=18,98$ min; $tr=22,14$ min; $tr=30,14$ min; $tr=36,54$ min, correspondentes aos corantes AB 99, VA 43, MB 16, VB 76 e AB 57, respectivamente. Considerando que o ligeiro deslocamento dos picos pode ser atribuído à presença de outros constituintes na formulação, alterando a interação dos corantes com a fase estacionária. Comparou-se a seguir os espectros de UV-Vis obtidos para cada pico da tintura comercial e amostra padrão do corante investigado. Os respectivos espectros UV-Vis do padrão e do corante na formulação comercial são mostrados na Figura 20.

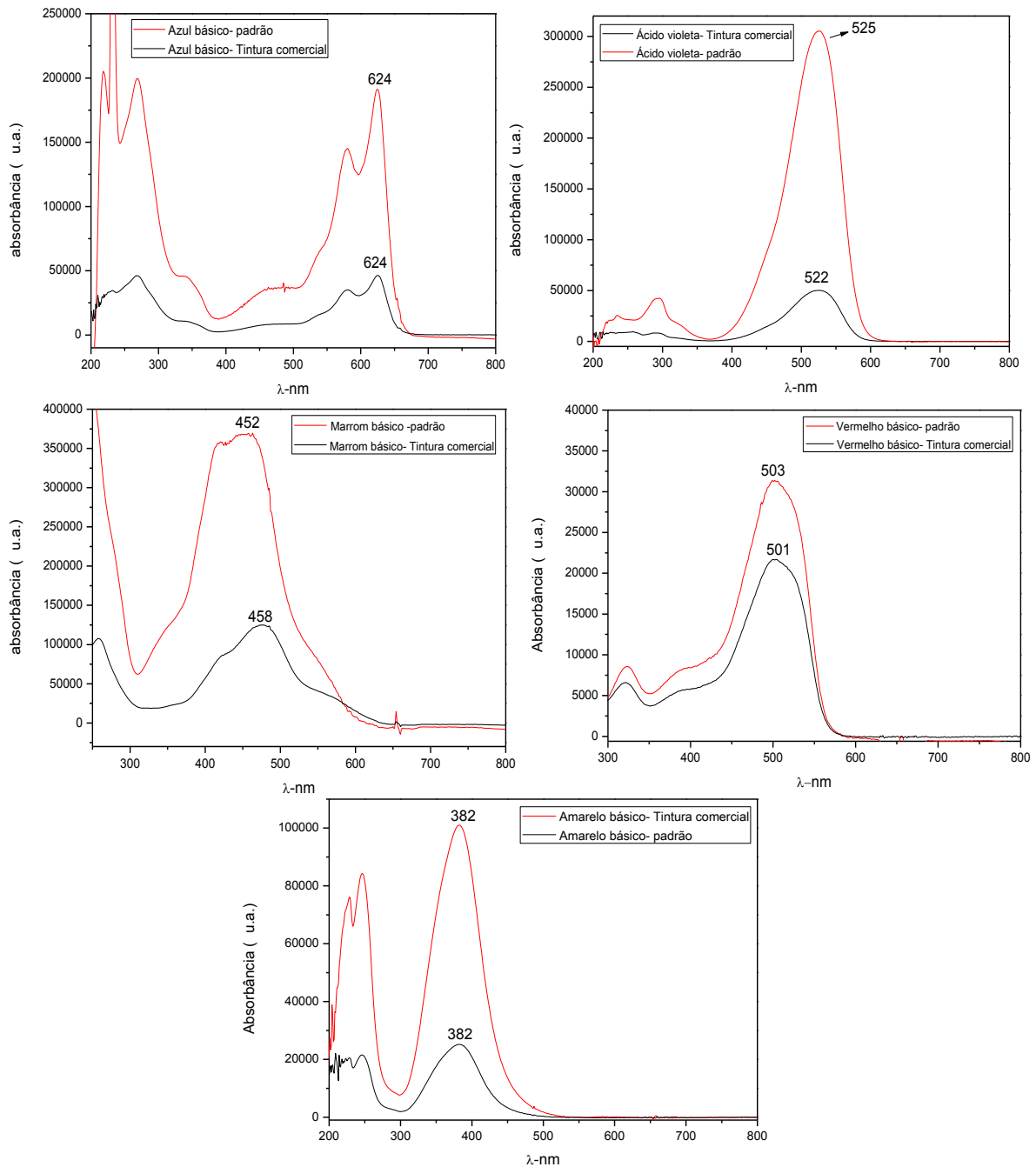


Figura 20. Comparação dos espectros de UV-Vis obtidos para corantes no modo CLAE/DAD para cada pico cromatográfico na tintura comercial e no padrão dos corantes: Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57.

A análise dos espectros UV-Vis na Figura 20 confirmam que os corantes na tintura oferecem boa correlação com o padrão e comprovam que o método de

extração em fase sólida oferece condições apropriadas para a análise de todos os componentes na formulação comercial.

A seguir o método foi testado para as amostras da tintura analisando-se a concentração de cada corante na amostra comercial HF 65, através da correlação entre as áreas dos picos e da curva de calibração. Os resultados obtidos da análise cromatográfica são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação dos corantes de interesse na tintura de cabelo comercial HF 65 da Arianor por CLAE/DAD sob as seguintes condições de análise: 1,0 g da tintura comercial em 10 ml de água, 35:65 ACN/água + 2,0 mL de líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão= $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, Detecção= $\lambda = 413\text{nm}$ (medidas em triplicata).

Corantes encontrados na amostra comercial	Concentração encontrada (mol L^{-1})	Massa corante encontrada (1g/120g de tintura comercial)	Porcentagem dos corantes na tintura comercial (%)
Azul básico 99	$4,33 \times 10^{-5}$	23,46	$19,0 \pm 1,0$
Violeta ácido 43	$8,81 \times 10^{-6}$	4,56	$4,0 \pm 2,0$
Marrom básico 16	$5,86 \times 10^{-6}$	2,51	$2,0 \pm 1,0$
Vermelho básico 76	$1,31 \times 10^{-4}$	58,40	$48,0 \pm 1,0$
Amarelo básico 57	$1,99 \times 10^{-5}$	8,88	$7,0 \pm 1,0$

Estes resultados indicam que na composição da tintura comercial HF 65 o corante Vermelho básico 76 aparece em maior quantidade em relação aos demais. Os corantes Marrom básico 16, Violeta ácido 43 e Amarelo básico 57 estão presentes em menor quantidade na tintura, mas o método permite a determinação de todos os corantes presentes em sua composição, conforme dados da formulação comercial.

4.6. Análise dos corantes de cabelo em efluentes do salão de cabeleireiro.

No intuito de testar o método para monitorar a concentração dos corantes de interesse nas águas do esgoto após tintura dos cabelos, tingiu-se o cabelo com amostras da tintura comercial HF 65 e coletou-se as águas de lavagem do cabelo

em cinco dias consecutivos. Considerando que a coleta foi realizada respeitando-se as cinco etapas de lavagem dos cabelos tingidos pela formulação comercial HF 65, ao final foram obtidas cinco amostras.

A amostra I foi obtida após a primeira lavagem (20 min depois de aplicada a tintura no couro cabeludo). A água oriunda das lavagens do cabelo tingido também foram coletadas e analisadas do mesmo modo. A Figura 21 mostra os cromatogramas CLAE/DAD obtidos para a análise I (água da primeira lavagem) diluída para 1 litro de solução e submetida à extração prévia, segundo a parte experimental.

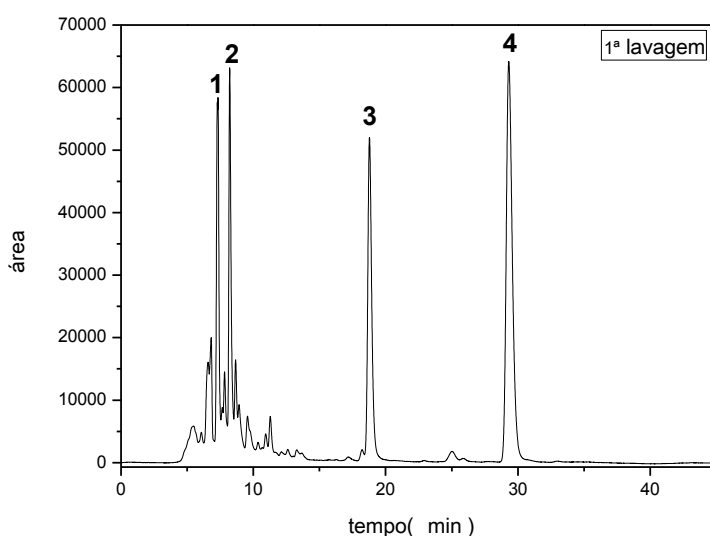


Figura 21. Cromatogramas CLAE/DAD obtido para a água de primeira lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/ água e submetidos à fase móvel: 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

Os cromatogramas obtidos apresentaram 4 picos cromatográficos em tempos de retenção de: $t_r=7,24 \text{ min}$; $t_r=8,17 \text{ min}$; $t_r=18,86 \text{ min}$ e $t_r= 29,19 \text{ min}$, que correspondem aos picos 1, 2, 3, e 4 respectivamente. Os respectivos espectros UV-Vis para cada corante correspondentes aos picos detectados na Figura 21 são apresentados nas curvas A-C da Figura 22.

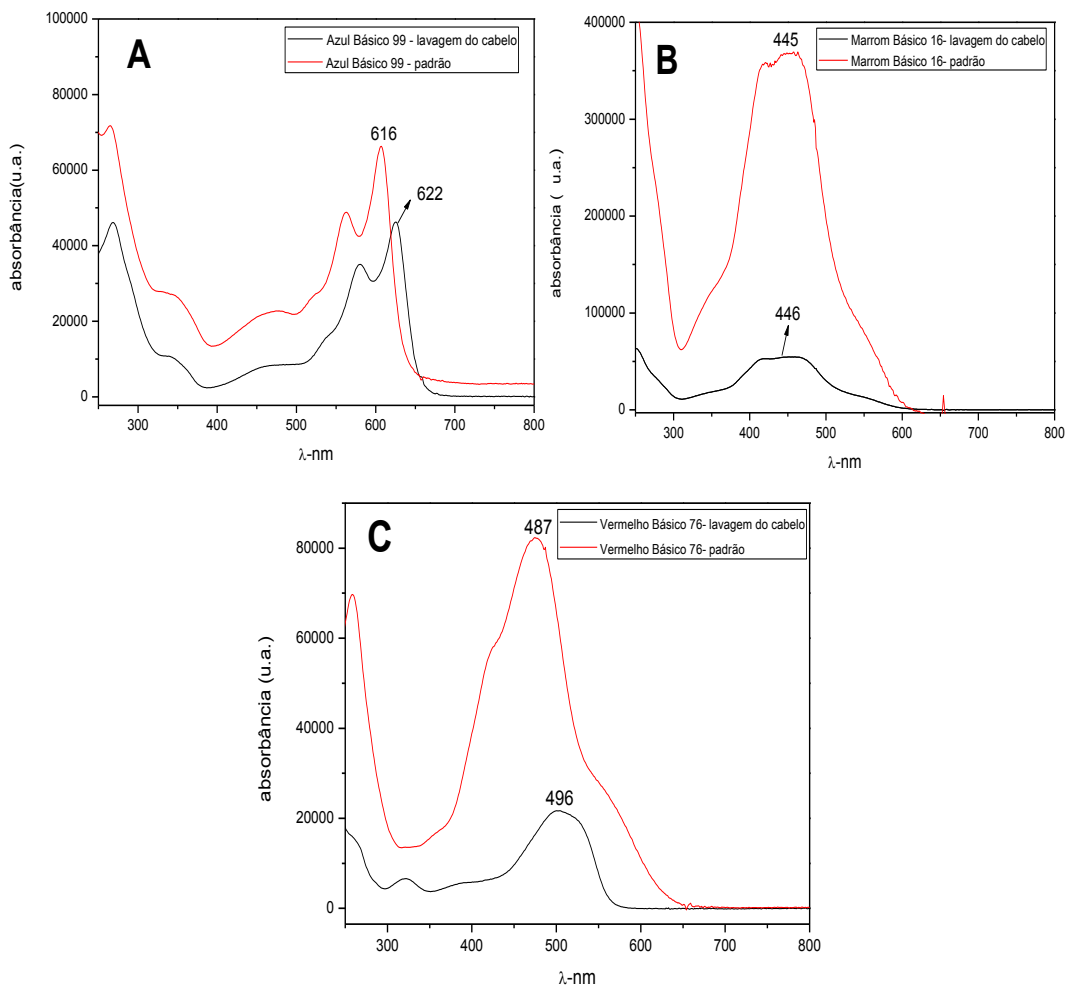


Figura 22. Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtido dos cromatogramas CLAE-DAD referentes aos: A) picos (1 e 2), B) pico 3 e C) pico 4.

Pode-se concluir pela comparação do tempo de retenção e sobreposição espectral do UV-Vis obtido para a amostra e os corantes de interesse, que os picos 1 e 2 são referentes ao corante Azul básico 99 (A) e o espectro dos picos 3 (B) e 4 (C) à ocorrência dos corantes Marrom básico 16 (B) e Vermelho básico 76 (C), respectivamente. Os corantes, Amarelo básico 57 e Violeta ácido 43, não apresentaram picos cromatográficos na amostra indicando, que provavelmente foram degradados por hidrólise, oxidação ou outras reações envolvidas no processo de tintura ou foram 100% retidos no cabelo.

A amostra II correspondente à lavagem realizada no segundo dia do experimento apresentaram o cromatograma apresentado na Figura 23.

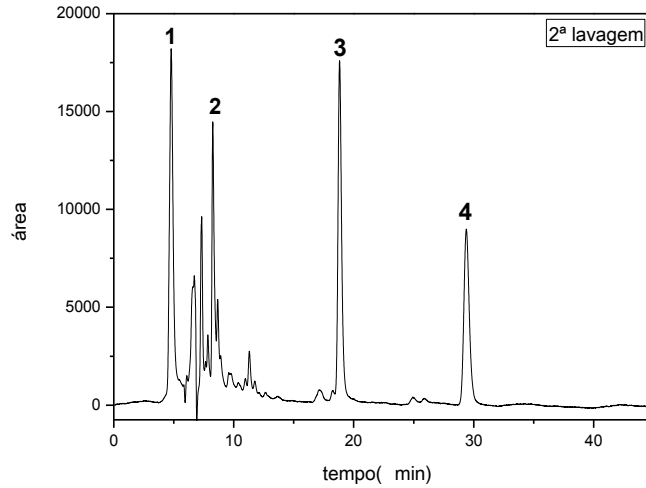


Figura 23. Cromatogramas CLAE/DAD obtido para a amostra II correspondente à segunda lavagem do cabelo (24h após aplicação da tintura e primeira lavagem), extraídos em 50:50 ACN/ água e submetidos à fase móvel: 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

Os picos cromatográficos 1, 2, 3 e 4 apresentaram os seguintes tempos de retenção: $t_r = 4,80 \text{ min}$; $t_r = 8,28 \text{ min}$; $t_r = 18,86 \text{ min}$ e $t_r = 29,31 \text{ min}$, respectivamente. A figura 24 apresenta os espectros correspondentes à cada pico do cromatograma.

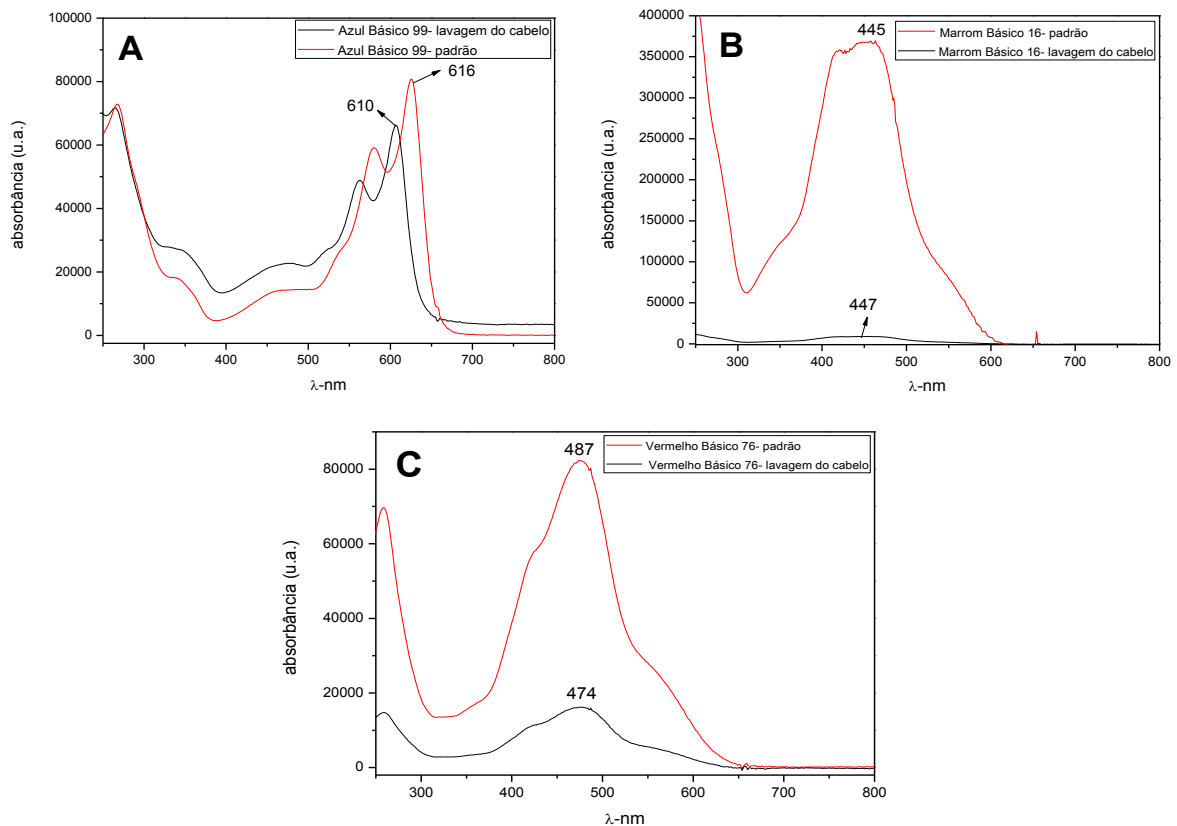


Figura 24. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtido dos cromatogramas CLAE-DAD referentes aos: A) picos (1 e 2), B) pico 3 e C) pico 4.

A comparação dos respectivos tempos de retenção e espectro UV-Vis dos padrões e amostras indicam que os picos 1 e 2 (A), obtido nos cromatogramas da figura 23, podem ser atribuídos ao corante Azul básico 99, os picos cromatográficos 3 (B) e 4 (C) se tratam dos corantes Marrom básico 16 e Vermelho básico 76, respectivamente. O fato do tempo de retenção dos corantes ter mudado em relação ao observado, pode ser devido à ação do tempo, pois como o cabelo ficou exposto ao sol e até ao vento, estes seriam fatores que provocariam a degradação dos corantes e também outros resíduos da lavagem do cabelo. As respectivas concentrações dos corantes na água de lavagem é mostrada na Tabela 5.

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos para a terceira lavagem (48h) após a tintura.

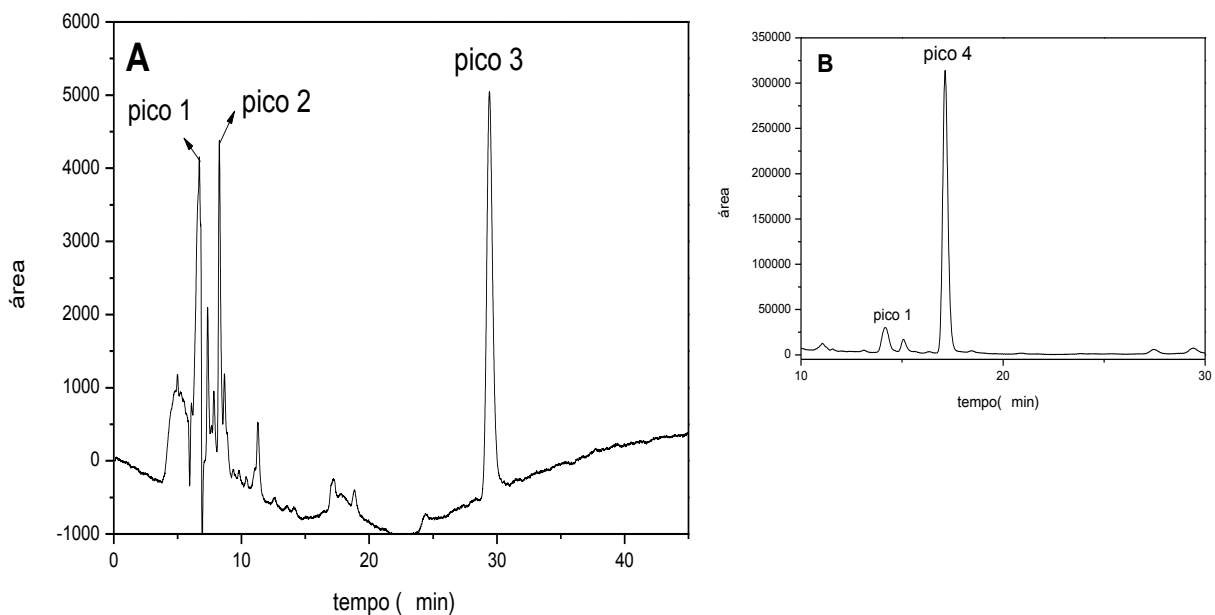


Figura 25. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela tintura comercial através da lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/ água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. A) $\lambda = 413 \text{ nm}$ e B) 276 nm .

A Figura 25 (a) apresenta picos cromatográficos em $t_r = 6,68 \text{ min}$ (pico 1) e $t_r = 8,51 \text{ min}$ (pico 2) e $t_r = 29,31 \text{ min}$ (pico 3), porém ao mudar o comprimento de onda para $\lambda = 276 \text{ nm}$, foi observado um novo pico com alta absorvância no $t_r = 17,45 \text{ min}$ (pico 4).

Para comprovar se os picos cromatográficos obtidos correspondem aos corantes de interesse foram sobrepostos os espectros UV-Vis de cada pico na amostra e mostrados na Figura 26.

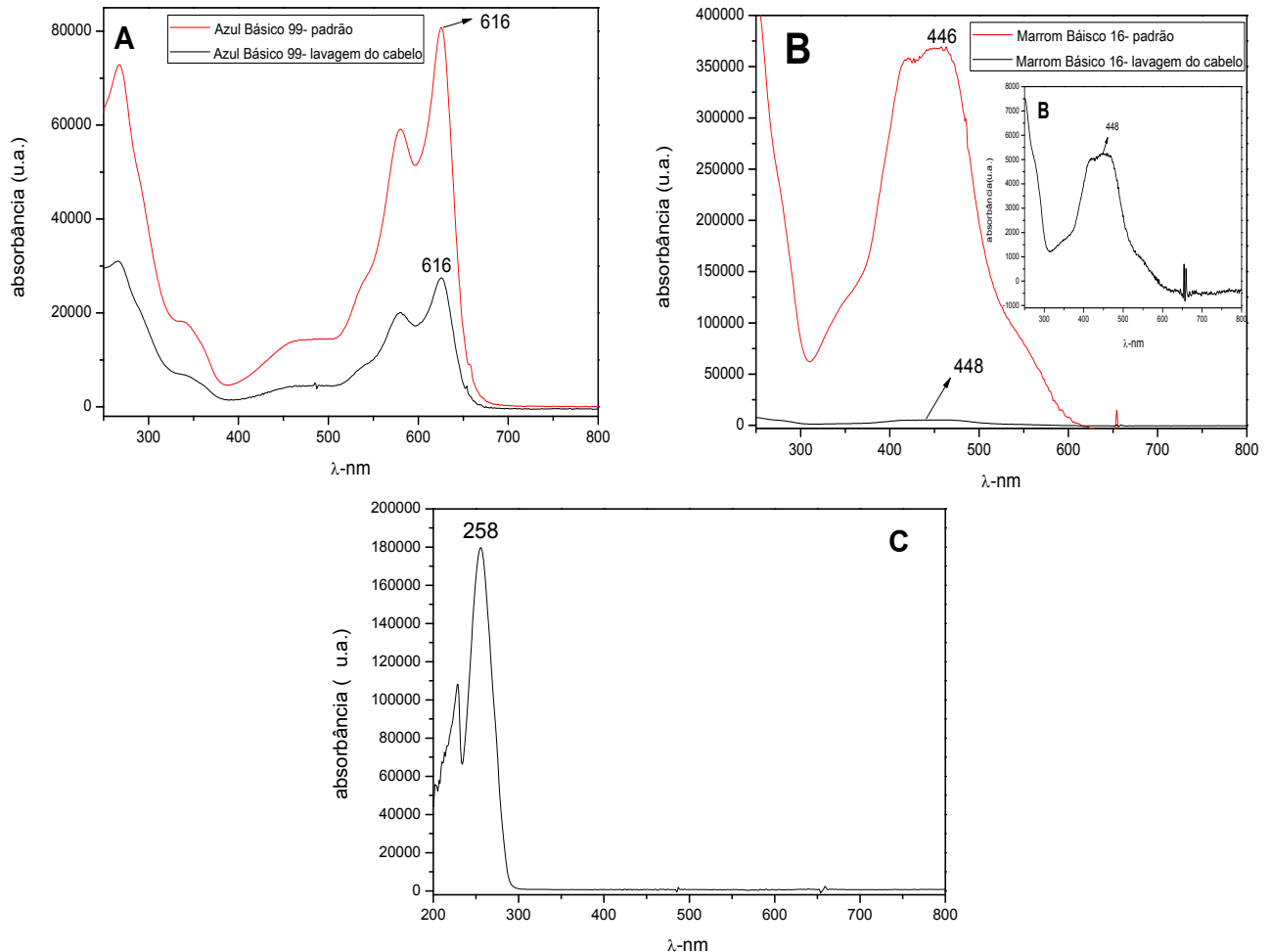


Figura 26. Espectros de absorbância na região do UV-Vis obtido dos cromatogramas CLAE-DAD referentes aos: A) picos (1 e 2), B) pico 3 e C) pico 4.

Mesmo na 3ª lavagem ainda foram obtidos espectros de dois corantes analisados, apesar da baixa concentração, os corantes Azul básico 99 (pico 1 e 2) e Marrom básico 16 (pico 3) foram detectados, o pico 4 provavelmente se trata de algum produto proveniente da degradação dos corantes.

Ao analisar a amostra IV correspondente à 4ª lavagem de cabelo é possível observar que foram obtidos picos cromatográficos semelhantes apenas ao corante Azul básico 99 como pode ser visto na Figura 27.

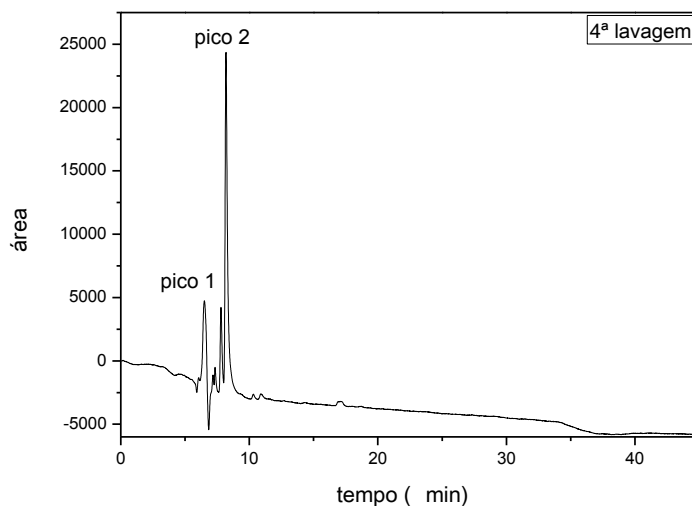


Figura 27. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela tintura comercial através da lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

Nos cromatogramas da 4ª lavagem somente dois picos cromatográficos foram obtidos e em tempos de retenção muito semelhantes, $t_r = 6,43 \text{ min}$ e $t_r = 7,94 \text{ min}$, correspondentes aos picos 1 e 2, respectivamente. Provavelmente ambos se tratam do corante Azul básico 99 ou algum produto de degradação dos mesmos. Os respectivos espectros de UV-Vis obtidos para cada pico são mostrados na Figura 28.

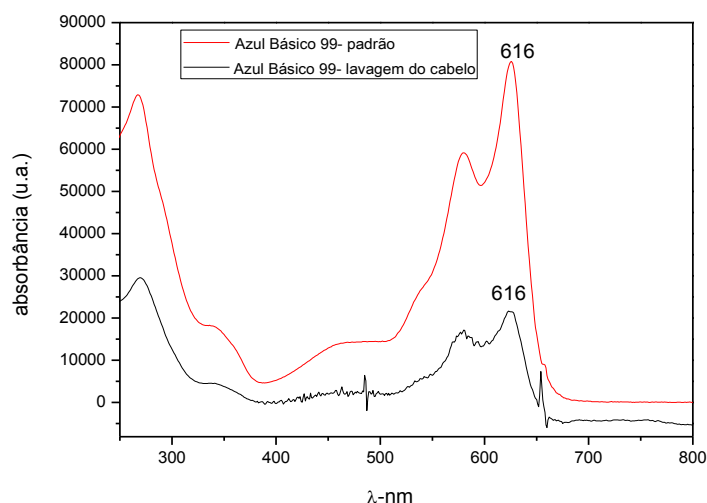


Figura 28. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para os picos 1 e 2 para comparação com os cromatogramas obtidos para as mesmas soluções.

A análise dos espectros UV-Vis da 4ª lavagem indica que somente o corante Azul básico 99 foi encontrado, porém em concentrações menores do que nos outros dias de lavagem.

A figura 29 mostra os cromatogramas obtidos para a água da lavagem obtida após o 5º dia de aplicação da tintura. A amostra apresentou cromatogramas com dois picos cromatográficos, em tempos de retenção de $t_r = 6,54$ min e $t_r = 8,17$ min, respectivamente. Este comportamento corresponde a presença do corante Azul básico 99. Os respectivos espectros UV-Vis de cada pico estão representados na Figura 30.

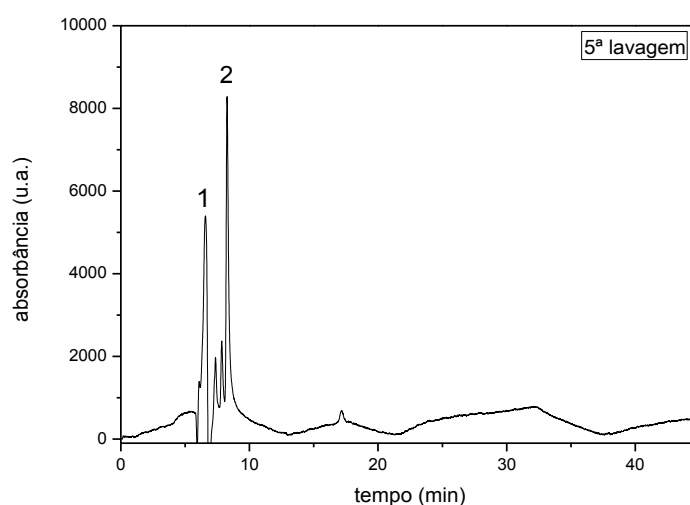


Figura 29. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela tintura comercial através da lavagem do cabelo, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

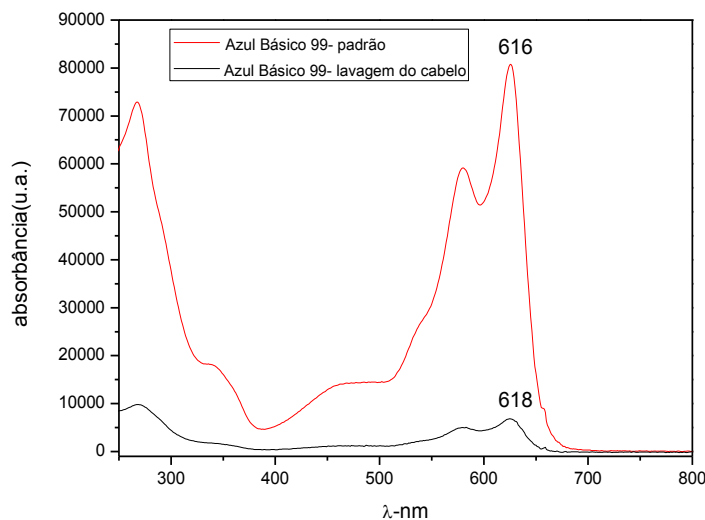


Figura 30. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para os picos 1 e 2 para comparação com os cromatogramas obtidos para as mesmas soluções.

Os espectros UV-Vis da Figura 30 comprovam que os picos 1 e 2 correspondem ao corante Azul básico 99 e os outros corantes analisados na primeira lavagem foram retirados junto com a lavagem do cabelo nos outros dias permanecendo apenas o corante Azul básico 99. Através dos cromatogramas analisados referentes às cinco lavagens do cabelo é possível concluir que somente o corante Azul básico 99 está presente em todas as águas de lavagem, sendo assim a sua penetração no couro cabeludo é mais persistente do que em relação aos outros corantes da tintura comercial.

As respectivas concentrações de cada corante nas águas de lavagem foram determinadas por CLAE-DAD usando a metodologia proposta e estimadas segundo a área extrapolada na curva de calibração. A Tabela 5 mostra os valores das concentrações dos corantes detectados nas águas de lavagem do cabelo tingido com a tintura comercial HF 65 da Arianor.

Tabela 5. Tempo de retenção e concentração dos corantes detectados nas amostras das cinco lavagens do cabelo tingido com tintura comercial HF 65 da Arianor, usando a metodologia proposta (medidas em triplicata).

Sequência das águas de lavagem do cabelo tingido coletadas em dias consecutivos.	Corantes analisados	Tempo de retenção Tr (min)	Concentração dos corantes (mol L ⁻¹)
I	Azul básico 99	Pico 1= 7,24	9,99x 10 ⁻⁵
	Azul básico 99	Pico 2= 8,17	1,02x 10 ⁻⁵
	Marrom básico 16	Pico 3= 18,86	9,86x 10 ⁻⁶
	Vermelho básico 76	Pico 4= 29,19	6,35x 10 ⁻⁶
II	Azul básico 99	Pico 1= 4,80	7,93x 10 ⁻⁶
	Azul básico 99	Pico 2= 8,28	7,72x 10 ⁻⁶
	Marrom básico 16	Pico 3= 18,86	3,68x 10 ⁻⁶
	Vermelho básico 76	Pico 4= 29,31	5,72x 10 ⁻⁶
III	Azul básico 99	Pico 1= 6,68	6,14x 10 ⁻⁶
	Azul básico 99	Pico 2= 8,51	6,18x 10 ⁻⁶
	Marrom básico 16	Pico 3= 29,31	1,25x 10 ⁻⁶
IV	Azul básico 99	Pico 1= 6,43	5,28x 10 ⁻⁶
	Azul básico 99	Pico 2= 7,94	5,95x 10 ⁻⁶
V	Azul básico 99	Pico 1= 6,54	3,26x 10 ⁻⁶
	Azul básico 99	Pico 2= 8,17	3,44x 10 ⁻⁶

A análise da tabela 5 mostra que provavelmente os corantes: Violeta ácido 43 e Amarelo básico 57 são degradados durante o processo de tintura ou lavagem do corante. Entretanto, todos os outros corantes: Azul básico 99, Marrom básico 16 e Vermelho básico 76 são liberados durante o processo de lavagem após a tintura. Embora a concentração dos mesmos esteja em baixo nível de concentração nas águas de lavagem, os resultados são indicativos de que os esgotos estão recebendo tanto os resíduos da tintura quanto parte dos corantes aderidos superficialmente na fibra do cabelo. Estudos posteriores voltados para a toxicidade e mutagenicidade destes corantes estão em curso, e serão avaliados posteriormente.

4.7. Determinação dos corantes em águas de captação na estação de tratamento de água.

Considerando que parte destes corantes poderiam atingir as estações de tratamento de água servidas à população, investigou-se a seguir a eficiência do método para monitoramento destes corantes nestas condições experimentais. Embora o método proposto apresente nível de determinação de concentração em torno de 10^{-5} a 10^{-6} mol L⁻¹, os cromatogramas CLAE/DAD obtidos para amostras da água coletada antes e após tratamento e submetidos à extração não apresentaram nenhum pico cromatográfico.

No entanto, como os corantes analisados nas águas de estação de tratamento poderiam estar presentes em concentração muito baixa dificultando sua identificação, foi realizada uma simulação da ocorrência dos corantes de interesse em águas de captação antes e após o tratamento. Deste modo, as amostras foram fortificadas com a tintura comercial e submetidas à análise.

Amostras de 1 litro de água coletadas antes (I) e após o tratamento (II) de água convencional foram fortificadas com 8×10^{-5} mol L⁻¹ de cada padrão dos corantes de interesse e submetidos à filtração à vácuo para a retirada de resíduos e extração em fase sólida. Os cromatogramas são mostrados na Figura 31, curvas A e B respectivamente para amostras coletadas antes e após o tratamento.

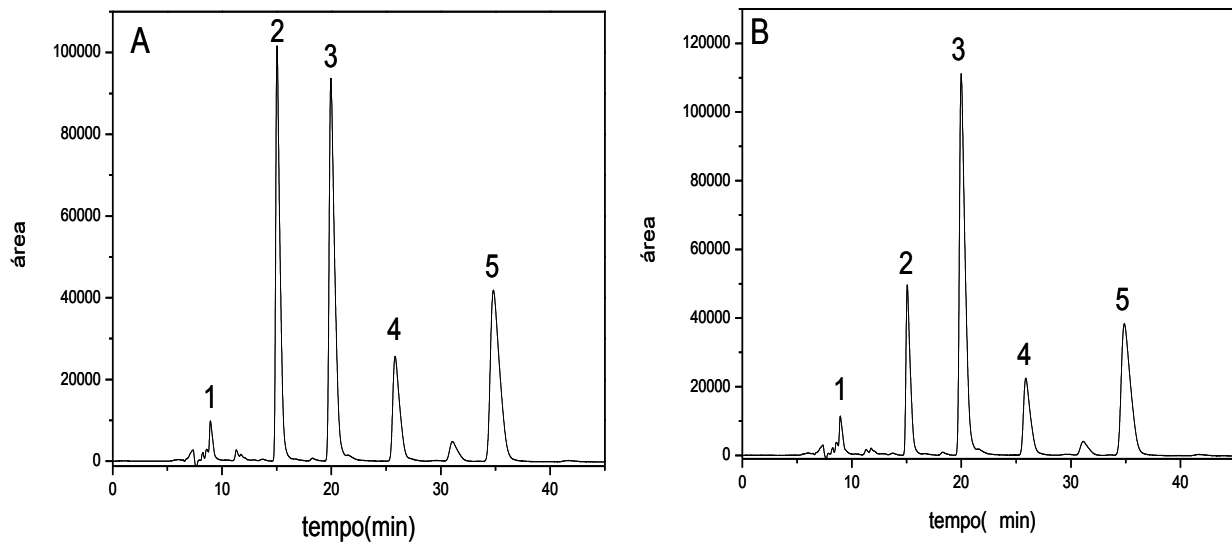


Figura 31. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela análise da água de estação de tratamento com adição de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ da mistura dos padrões A) antes do tratamento B) depois do tratamento, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$. (1)=pico do corante Azul básico 99 , (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76,(5)=pico do corante Amarelo básico 57.

Os picos cromatográficos do cromatograma A apresentaram os seguintes tempos de retenção: $t_r = 8,98 \text{ min}$, $t_r = 15,02 \text{ min}$, $t_r = 20,02 \text{ min}$, $t_r = 25,83 \text{ min}$ e $t_r = 34,88 \text{ min}$. Enquanto que o gráfico B apresentou picos cromatográficos nos seguintes tempos de retenção: $t_r = 8,98 \text{ min}$, $t_r = 15,14 \text{ min}$, $t_r = 20,13 \text{ min}$, $t_r = 25,94 \text{ min}$ e $t_r = 34,88 \text{ min}$, o que indica que a análise dos corantes padrões tanto na água tratada quanto na água não tratada apresentam tempos de retenção muito semelhantes, porém houve diferença na absorbância dos picos cromatográficos dos corantes na água de captação da estação de tratamento em relação à água ultrapura utilizada no laboratório. A tabela 6 indica a concentração de cada corante na amostra e a sua porcentagem de recuperação em relação à concentração original adicionada propositalmente à amostra.

Tabela 6. Parâmetros obtidos para recuperação dos corantes de cabelo em amostras simuladas de águas da estação de tratamento antes do tratamento convencional, fortificadas com os corantes de cabelo: Azul básico 99, violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 (medidas em triplicata).

	Concentração adicionada (mol L ⁻¹)	Concentração encontrada (mol L ⁻¹)	Porcentagem de recuperação (%)
Azul básico 99	7,46x 10 ⁻⁶	7,44x 10 ⁻⁶	99,80
Violeta ácido 43	3,87x 10 ⁻⁵	3,73x 10 ⁻⁵	96,50
Marrom básico 16	9,87x 10 ⁻⁶	9,14x 10 ⁻⁶	92,68
Vermelho básico 76	1,73x 10 ⁻⁵	1,47x 10 ⁻⁵	85,47
Amarelo básico 57	2,98x 10 ⁻⁵	2,91x 10 ⁻⁵	97,78

A tabela 6 indica que todos os corantes apresentaram concentrações na faixa de 10⁻⁵ e indicaram índices satisfatórios de recuperação entre 85 à 99% mostrando que mesmo na água de estação de tratamento foi possível obter uma ótima recuperação dos corantes analisados.

A concentração de cada corante na amostra e a sua porcentagem de recuperação em relação à concentração original é mostrada na tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros obtidos para recuperação dos corantes de cabelo em amostras simuladas de águas da estação de tratamento após o tratamento convencional, fortificadas com os corantes de cabelo: Azul básico 99, violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 (medidas em triplicata)

	Concentração adicionada (mol L ⁻¹)	Concentração encontrada (mol L ⁻¹)	Porcentagem de recuperação (%)
Azul básico 99	7,45x 10 ⁻⁶	7,43x 10 ⁻⁶	99,76
Violeta ácido 43	3,15x 10 ⁻⁵	2,58x 10 ⁻⁵	81,88
Marrom básico 16	1,02x 10 ⁻⁵	9,95x 10 ⁻⁶	97,50
Vermelho básico 76	1,62x 10 ⁻⁵	1,30x 10 ⁻⁵	80,63
Amarelo básico 57	2,81x 10 ⁻⁵	2,65x 10 ⁻⁵	94,38

A tabela 7 indica valores semelhantes aos da tabela 6 mostrando que tanto na água tratada quanto na não tratada é possível obter uma recuperação satisfatória dos corantes.

A Figura 32 mostra as análises das águas da estação antes do tratamento fortificadas com tinta comercial.

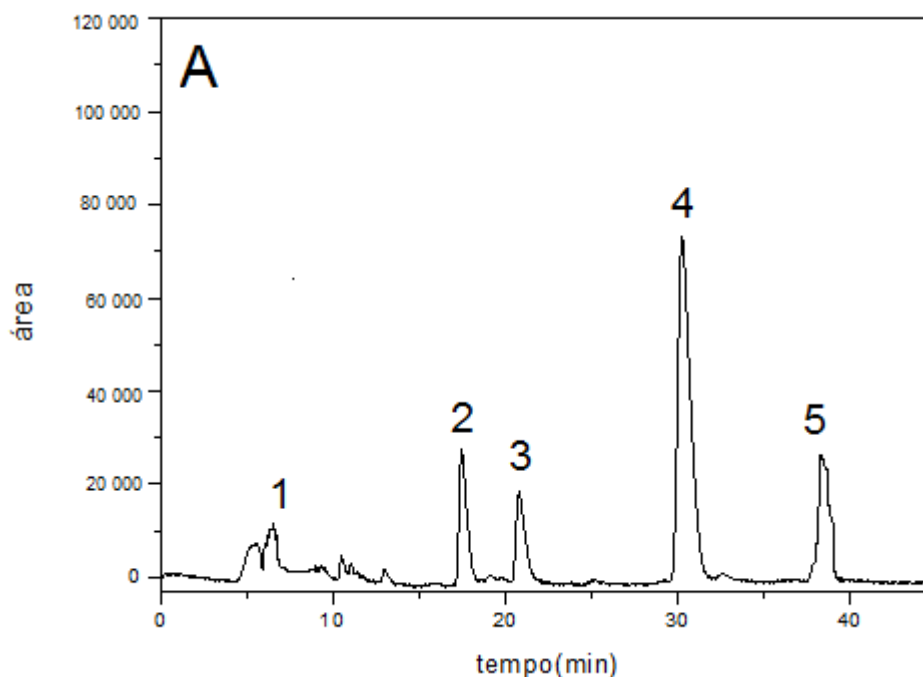


Figura 32. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela análise da água de estação de tratamento com adição de 1 g de tinta comercial em 10 mL de água coletada antes do tratamento, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($C_8H_{15}BF_4N_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$. (1)=pico do corante Azul básico 99, (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57.

Assim como ocorreu com a análise da mistura dos padrões não houve mudanças significativas na análise da tinta comercial nas águas de tratamento, pois os cinco corantes foram detectados em seus respectivos tempos de retenção, porém em absorvâncias diferentes do que quando analisadas com água ultrapura. Foram apresentados picos cromatográficos nos tempos de retenção: $t_r = 7,22 \text{ min}$; $t_r = 18,74 \text{ min}$; $t_r = 21,45 \text{ min}$; $t_r = 31,78 \text{ min}$ e $38,54 \text{ min}$, que correspondem aos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, respectivamente.

A tabela 8 mostra a porcentagem de recuperação dos corantes na tinta comercial quanto analisada com a água antes do tratamento.

Tabela 8. Recuperação dos corantes na tintura de cabelo por CLAE/DAD nas águas coletadas no DAAE antes do tratamento e fortificadas com 1,0 g de tintura comercial.

Corantes analisados	Massa encontrada (m/m)	Concentração encontrada (mol L^{-1})
Azul básico 99	0,048	$1,46 \times 10^{-5}$
Violeta ácido 43	0,056	$8,93 \times 10^{-6}$
Marrom básico 16	0,042	$7,25 \times 10^{-6}$
Vermelho básico 76	0,297	$9,37 \times 10^{-5}$
Amarelo básico 57	0,059	$2,62 \times 10^{-5}$

Estes resultados indicam que quando a água da estação de tratamento foi fortificada com a tintura comercial, a concentração dos corantes foi semelhante a tintura analisada com água ultrapura, mostrando um ótimo comportamento dos corantes nas águas da estação de tratamento de água.

A Figura 33 mostra as análises das águas da estação após o tratamento com fortificação da tintura comercial.

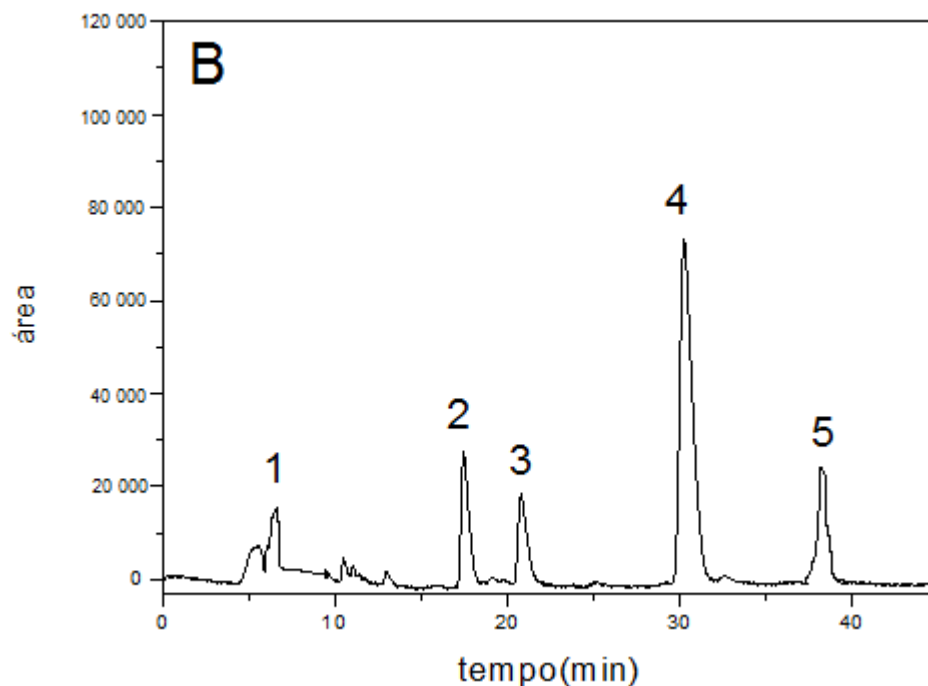


Figura 33. Cromatogramas CLAE/DAD obtido pela análise da água de estação de tratamento com adição de 1 g de tintura comercial em 10 mL de água coletada antes do tratamento, extraídos em 50:50 ACN/água e em seguida eluídos com 35:65 ACN/água com adição de 2,0 mL de Líquido iônico ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$. (1)=pico do corante Azul básico 99, (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57.

Na análise da tintura comercial nas águas após o tratamento não houve grandes mudanças nos resultados se comparados com os obtidos na Figura 32, pois os cinco corantes foram detectados em seus respectivos tempos de retenção, porém em absorvâncias diferentes do que quando analisadas com água ultrapura. Foram apresentados picos cromatográficos nos tempos de retenção: $t_r = 8,02$ min; $t_r = 17,54$ min; $t_r = 21,63$ min; $t_r = 31,14$ min e $t_r = 37,41$ min, que correspondem aos corantes Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57, respectivamente.

A tabela 9 mostra a porcentagem de recuperação dos corantes na tintura comercial quanto analisada com a água após o tratamento.

Tabela 9. Recuperação dos corantes na tintura de cabelo por CLAE/DAD nas águas coletadas no DAAE após o tratamento fortificadas com 1,0 g da tintura comercial em 10 mL de água.

Corantes analisados	Massa encontrada (m/m)	Concentração encontrada (mol L ⁻¹)
Azul básico 99	0,050	$1,58 \times 10^{-5}$
Violeta ácido 43	0,057	$8,95 \times 10^{-6}$
Marrom básico 16	0,042	$7,21 \times 10^{-6}$
Vermelho básico 76	0,300	$9,43 \times 10^{-5}$
Amarelo básico 57	0,057	$2,55 \times 10^{-5}$

A tabela 9 indica que a água após o tratamento fortificada com a tintura comercial apresenta resultados muito semelhantes em relação à água fortificada antes do tratamento, mostrando que em ambos os casos ocorre efeito matriz, que pode influenciar nas absorvâncias dos picos cromatográficos dos corantes e consequentemente na porcentagem de recuperação e concentração dos corantes na tintura comercial. Isso ocorre porque na água da estação de tratamento existem outros compostos que podem interferir nas análises cromatográficas e assim nas absorvâncias dos picos cromatográficos.

4.8. Degradação dos corantes de tintura de cabelo.

4.8.1. Oxidação dos corantes de cabelo pela ação de peróxido de hidrogênio.

A influência do peróxido de hidrogênio sobre a oxidação dos corantes de cabelo foi estudada a seguir com o intuito de explorar o efeito da mesma sobre os sinais cromatográficos do corante, considerando que no salão de beleza o peróxido de hidrogênio é um aditivo dos processos de tintura bastante utilizado. A amostra da mistura dos padrões contendo os cinco corantes de cabelo foi submetida à reação com H_2O_2 conforme descrito na seção experimental. Os cromatogramas obtidos para os corantes Azul básico 99 (1), Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) em concentração de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ são mostradas na Figura 33 para alíquotas analisadas antes e após tempos de 3 min, 15 min e 60 min de reação.

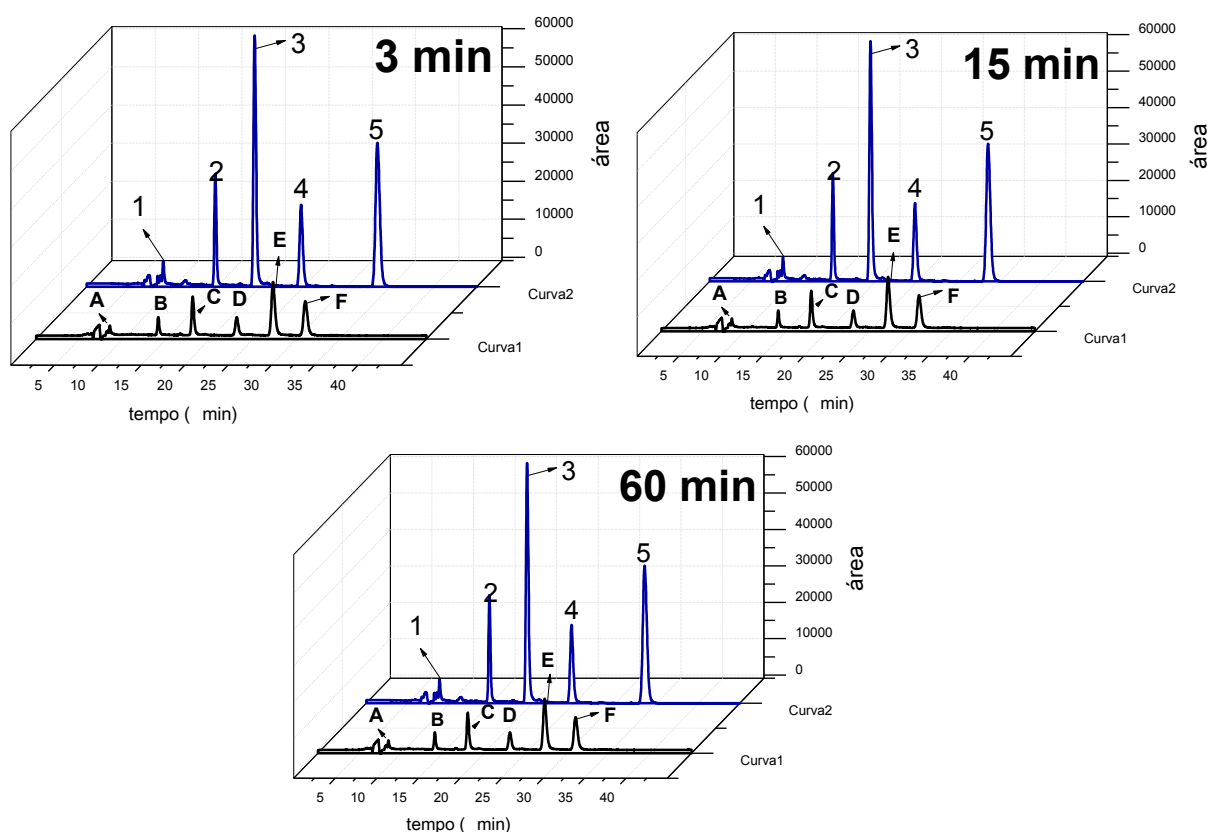


Figura 34. Cromatogramas CLAE/DAD obtidos para a mistura dos padrões dos corantes (curva 2) e com a adição de 200 μL de peróxido de hidrogênio (curva 1), nos tempos de 3 min, 15 min e 60 min, a partir da extração 50:50 ACN/ água e otimização da fase móvel 35:65 ACN/água com líquido iônico ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. $T = 30^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$. $C = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (1)=pico do corante Azul básico 99, (2)=pico do corante Violeta ácido 43, (3)=pico do corante Marrom básico 16, (4)=pico do corante Vermelho básico 76, (5)=pico do corante Amarelo básico 57.

A análise da Figura 34 indica que a absorvância de todos os picos cromatográficos dos corantes diminuiu após 3 min de reação com o peróxido. Do mesmo modo, aumentando-se o tempo de reação não há mudanças significativas, indicando que o tempo de 3 min é suficiente para a total reação com o peróxido de hidrogênio. No entanto, ainda observa-se que a oxidação do corante pela ação do H_2O_2 promove a ocorrência de seis picos bem definidos em tempos de retenção de 7,82 min; 14,33 min; 18,54 min; 23,56 min; 27,45 min e 32,35 min, correspondentes as letras A-F, respectivamente, sendo que o aparecimento de um pico cromatográfico a mais do que o esperado provavelmente se trata de algum composto formado pela degradação de um dos corantes.

A Figura 35 mostra os respectivos espectros de UV-Vis obtidos para cada corante tratado com peróxido de hidrogênio e tempo de reação entre 3 a 60 min.

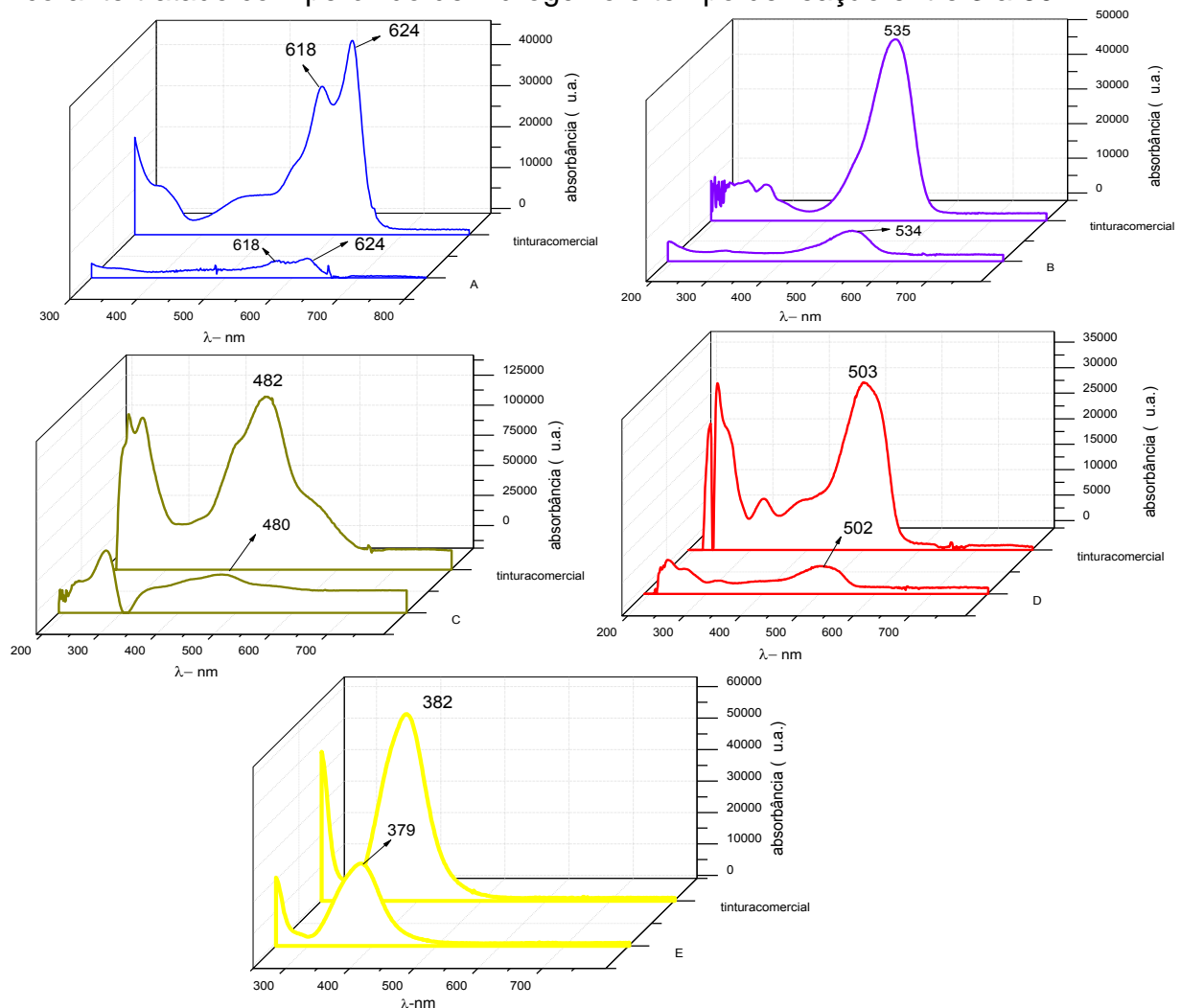


Figura 35. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para a mistura dos padrões dos corantes: Azul básico 99 (A), Violeta ácido 43 (B), Marrom básico 16 (C), Vermelho básico 76 (D) e Amarelo básico 57 (E) e com adição de 200 μ L de peróxido de hidrogênio nos tempos de 3 min (A), 15 min (B) e 60 min (C).

É possível observar que não há supressão das bandas na região do visível para todos os corantes de interesse. Concomitantemente, observa-se que não houve a quebra das ligações que originam os grupos cromóforos dos corantes, pois todos os espectros de UV-Vis dos corantes após reação com peróxido de hidrogênio permaneceram iguais aos espectros dos corantes padrões. Assim, estes resultados confirmam que a oxidação dos corantes não promove clivagem do grupo cromóforo, pois não houve perda de coloração dos corantes analisados ao reagirem com o agente oxidante.

A seguir, foram realizadas análises de espectroscopia de massas para a identificação dos principais produtos formados. Para isto, o produto da reação dos cinco corantes, Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76, Amarelo básico 57 obtido da reação com solução aquosa de H_2O_2 foi extraído e submetido à análise por LC-ESI-MS-MS QTrap. O processo de degradação sofrido pelas moléculas em ambos os casos foi monitorado por LC-ESI-MS(/MS) 3200 Qtrap, utilizando tanto a polaridade positiva quanto a negativa para que se obter o máximo de informações a respeito dos produtos de degradação formados em cada experimento.

4.8.2. Degradação dos corantes de cabelo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A Figura 36 apresenta a coloração das amostras dos corantes Azul básico 99 (Figura 36-1), Violeta ácido 43 (Figura 36-2), Marrom básico 16 (Figura 36-3), Vermelho básico 76 (Figura 36-4) e Amarelo básico 57 (Figura 36-5) em meio aquoso sob concentração de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A coloração das amostras submetidas à reação química com $200 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio após 30 min de reação são mostradas na Figura 36 (B), respectivamente.

Inicialmente observa-se que todos os corantes quando submetidos à ação de $200 \mu\text{L mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio apresentam leve descoloração no período de 30 min, conforme mostrado na Figura 36.

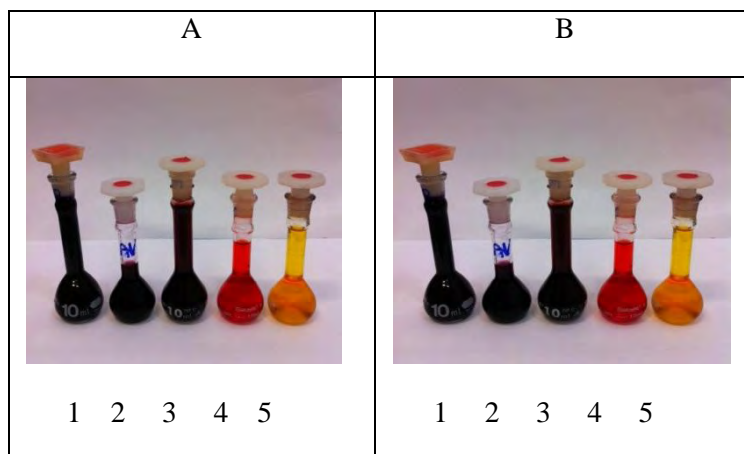


Figura 36. Amostras de soluções $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes em meio aquoso para: Azul básico 99 (1), Violeta ácido 43 (2), Marrom básico 16 (3), Vermelho básico 76 (4) e Amarelo básico 57 (5) antes (A) e após (B) reação com $200 \mu\text{L mL}$ de H_2O_2 em concentração de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.8.2.1. Amarelo básico 57

O espectro de LC-ESI-MS/MS obtido para o corante Amarelo básico 57 é mostrado na Figura 37. A análise do cromatograma apresentou um pico principal detectado por massas em $t_r = 10,89 \text{ min}$ e outro de menor intensidade em $t_r = 10,10 \text{ min}$ provavelmente atribuído a ocorrência de contaminantes em menor quantidade. Os dois picos cromatográficos verificados no espectro de massa são semelhantes com $m/z 336,18 \text{ Da}$, sugerindo que há a possibilidade de serem isômeros de posição. O espectro do íon precursor $m/z 336,2$ apresentou o mesmo perfil do padrão analítico, indicando que o corante possui estrutura seguramente similar ao corante comercializado como Amarelo básico 57.

A seguir, investigou-se a possível identificação do produto de degradação do corante Amarelo básico 57 após tratamento com solução aquosa de H_2O_2 durante 30 min. A Figura 38 apresenta o respectivo cromatograma em EMS (*Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan*). A Figura 38 mostra um cromatograma de íons totais (EMS) do produto obtido. Pelos resultados da separação cromatográfica dessa amostra, verifica-se a formação dos produtos de degradação foram detectados pela varredura realizada no intervalo de 50 a 600 Da. O respectivo cromatograma obtido apresenta picos cromatográficos de interesse em tempos de retenção iguais a $t_r = 3,36$; $t_r = 9,96$; $t_r = 10,74$ e $t_r = 16,14 \text{ min}$.

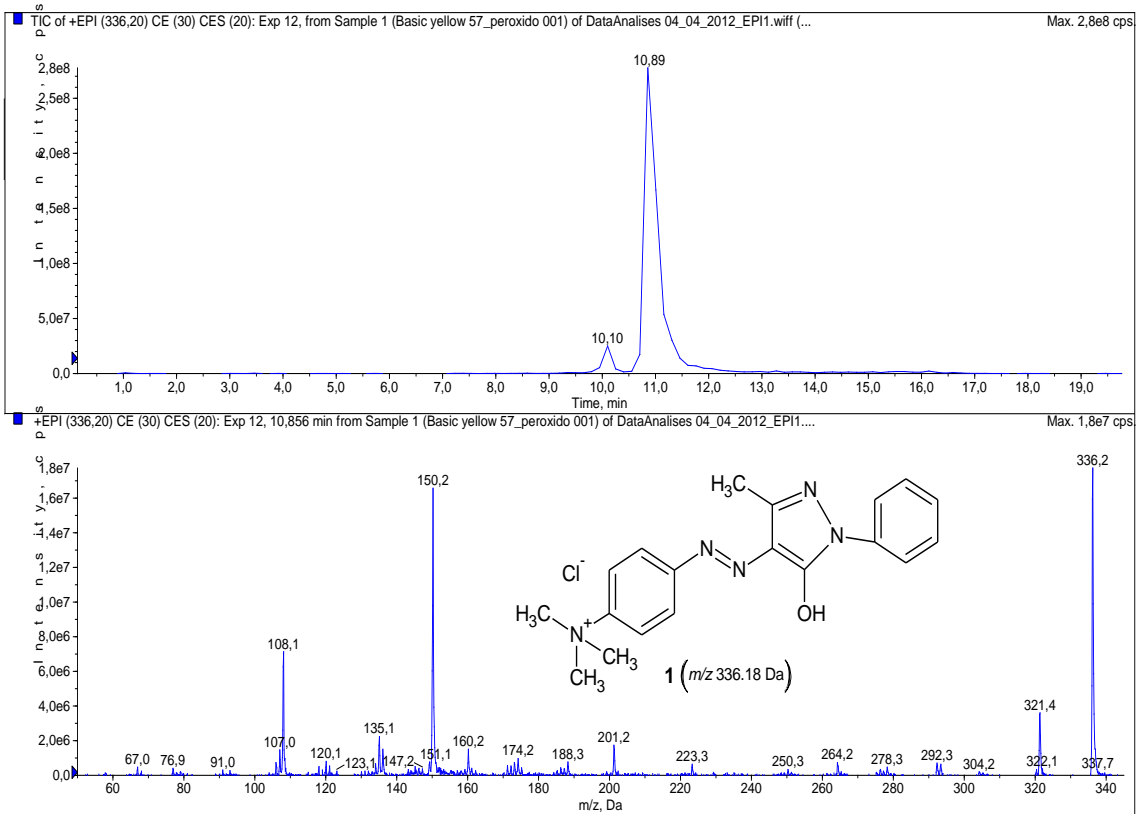


Figura 37. LC-ESI-MS/MS referente ao corante inicial (Amarelo básico 57).

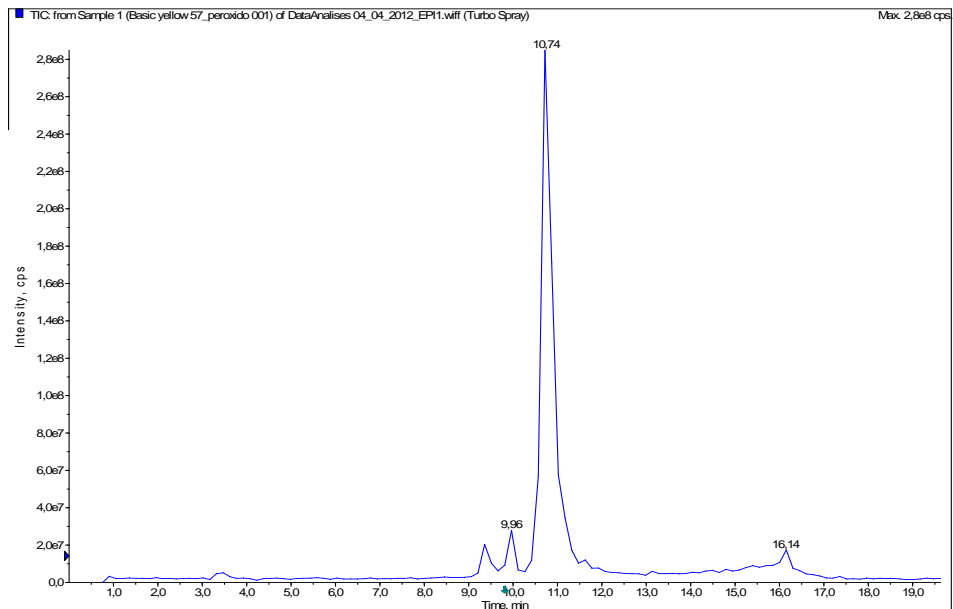


Figura 38. Cromatograma (LC-ESI-MS) monitorado em EMS (*Enhanced Mass Spectrometry - Full Scan*). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da.

Exceto pelo pico em $t_r=10,74$ min atribuído a resíduos do corante original todos os outros picos em 3,36, 9,96 e 16,14 min são atribuídos a produtos da degradação do corante. No entanto, observa-se que a oxidação com peróxido de hidrogênio não promove a completa degradação do corante original. Após otimização, a seguir realizou-se a aquisição dos dados no modo EMS usando sistema LC-ESI-MS/MS Qtrap. Para isto, utilizou-se estudos de dissociação em fase gasosa dos principais produtos de degradação formados, cujos respectivos cromatogramas e espectros de massas são apresentados nas Figuras 39 – 41.

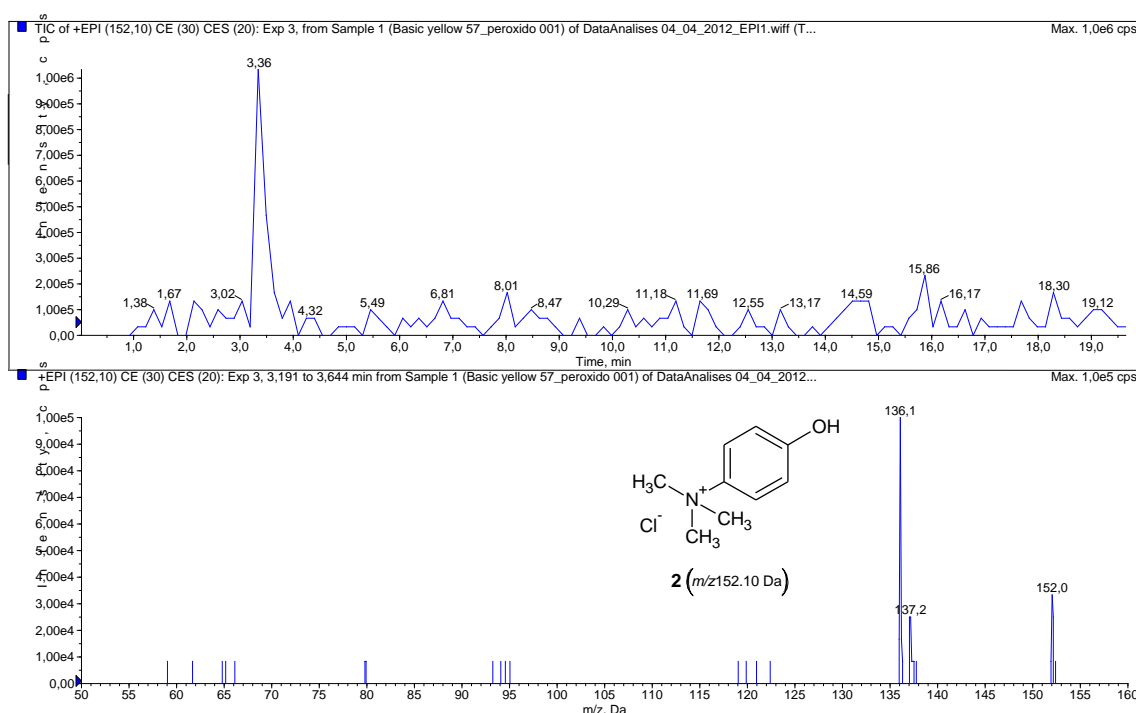


Figura 39. LC-ESI-MS/MS referente ao produto de degradação 2.

Observa-se na Figura 39 que o pico em $t_r=3,36$ min do cromatograma correspondente ao espectro com $m/z=152,10$ Da pode ser assinalado como produto 2, demonstrado na inserção do espectro. A origem deste produto corresponde a $\Delta m/z$ para os cátions formados $[M - CH_3]^+$ (15 Da) correspondentes a presença do radical metila na molécula, e o cátion $[M - O]^+$ (16 Da) indicam que houve a incorporação de um átomo de oxigênio na molécula, ou seja, a presença da hidroxila no anel aromático fica bem caracterizada. Portanto, esses fragmentos mais m/z 152 são significativamente importantes e garantem a consistência da proposta.

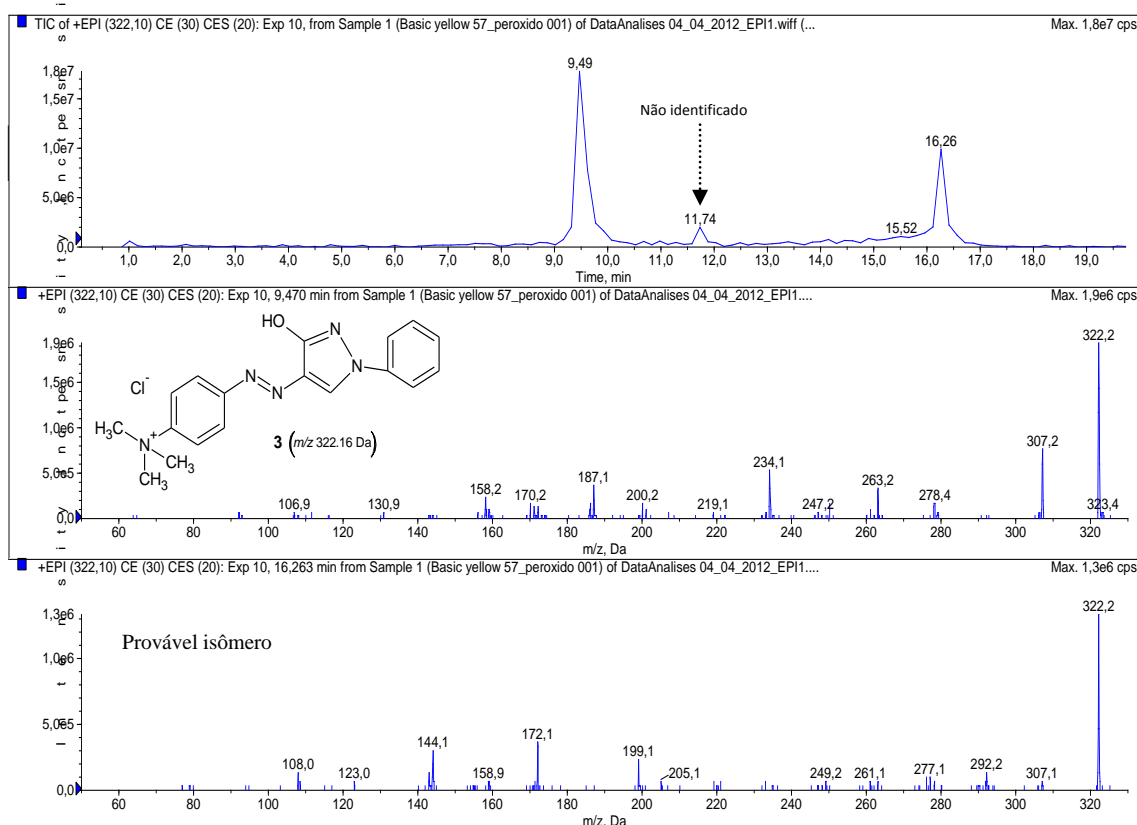


Figura 40. LC-ESI-MS/MS referente ao produto de degradação 3.

A Figura 40 apresenta o cromatograma onde observa-se a formação de três picos em $t_r = 9,49$; $t_r = 11,74$ e $t_r = 16,26$ min, denominado produto 3. Estes compostos apresentam espectros de massas em MS/MS muito similares, principalmente os obtidos dos picos cromatográficos em $t_r = 9,49$ e $t_r = 16,26$ min. Para o produto de degradação 3 foi proposto de acordo com o estudo dos produtos de dissociação alguns produtos com estrutura química mostrada na Tabela 10. Os produtos de dissociação do íon precursor 3 (m/z 322,2) deram origem aos seguintes fragmentos m/z 307 – $[M - CH_3]^+$, m/z 278 – $[M - NH_2CO]^+$, m/z 263 – $[M - N(CH_3)_3]^+$, m/z 158 – $[M - C_9H_{14}N_3]^+$ e m/z 187 – $[M - C_9H_{13}N]^+$.

Quanto ao fragmento de m/z 278 pode-se justificar a presença do mesmo apenas a uma perda neutra isobárica relacionada a $\Delta m/z = 44,0$ Da, correspondente ao radical $NH_2CO\cdot$, que ocorre em algumas moléculas que contêm nitrogênio heterocíclico e grupos carbonílicos ou enólicos próximos ao nitrogênio. Trata-se de um fragmento interessante e atípico.

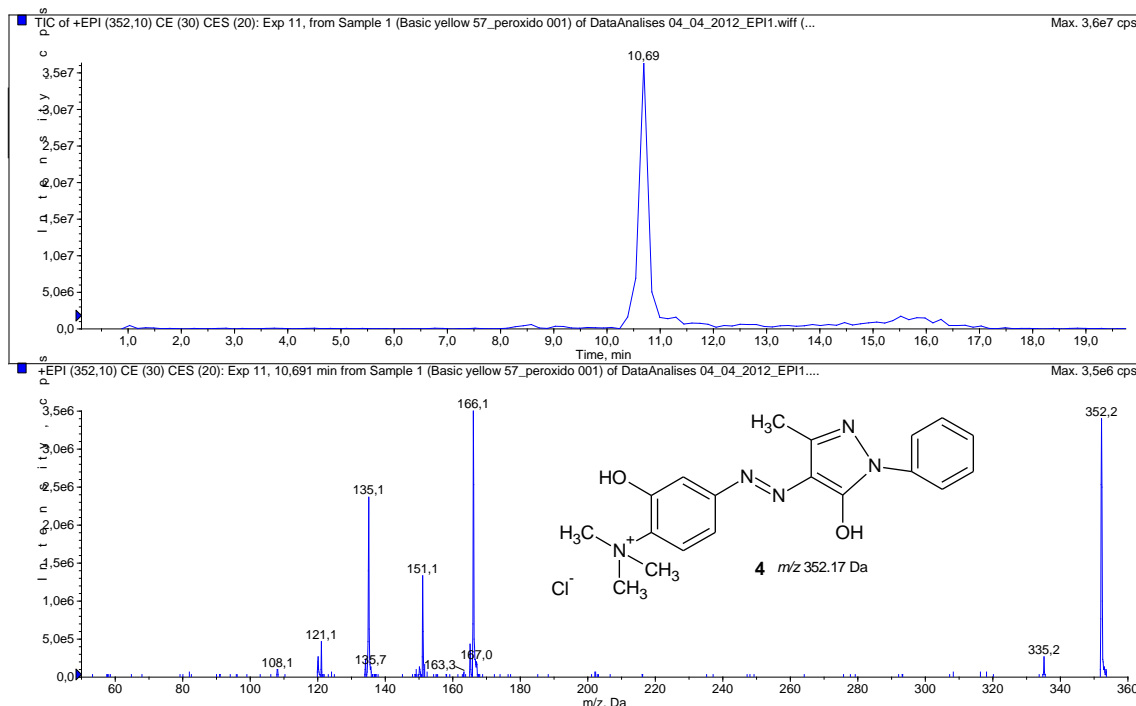
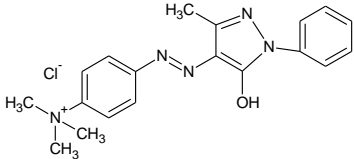
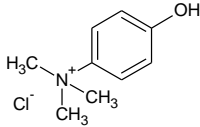
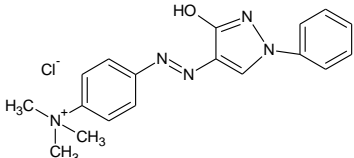
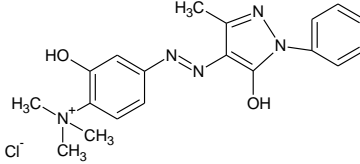


Figura 41. LC-ESI-MS/MS referente ao produto de degradação 4.

O produto 4 identificado no cromatograma pelo pico bem definido em $t_r = 10,69$ min, bem como o respectivo espectro de massas do íon precursor m/z 352,2 é também mostrado na Figura 41. Os dados correspondentes aos produtos de dissociação iônica são: (Tabela 10) – m/z 335,2 – $[M - \text{NH}_3]^+$, m/z 166,1 – $[M - \text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}]^+$, m/z 151,1 – $[M - \text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}]^+$, m/z 135,1 – $[M - \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}]^+$ e m/z 121,1 – $[M - \text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2]^+$. A formação do produto 4 poderia ocorrer via ataque eletrofílico de radicais hidroxila gerados no tratamento com peróxido de hidrogênio. Como consequência há a introdução da hidroxila no anel aromático vizinho ao grupo $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Isto é comprovado pelo fragmento m/z 151,1 – $[M - \text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}]^+$, que somente é possível se o ataque eletrofílico ocorrer nesta parte da molécula.

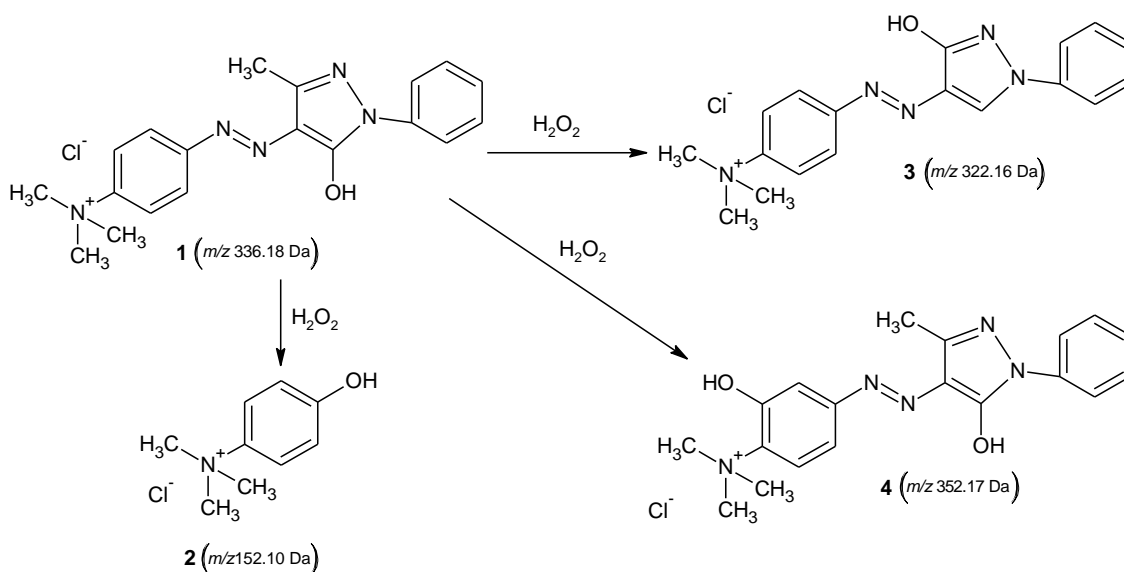
A Tabela 10 compila os principais tempos de retenção dos cromatogramas obtidos correspondentes, os valores de m/z e as estruturas dos principais produtos formados.

Tabela 10. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Amarelo básico 57.

Substância MM (Da)	t_R (min)	Íon protonado observado	Produto iônico em MS/MS (m/z – estrutura)	Estrutura proposta
		Primeira ordem MS (m/z – estrutura)		
Corante inicial 1 [*] MM = 371,80	10,89	336,10 – [M] ⁺	Possui mesmo perfil de dissociação do padrão analítico	
Produto 2 ^{**} MM = 187,60	3,36	152,10 – [M] ⁺	137 – [M – CH ₃] ⁺ 136 – [M – O] ⁺	
Produto 3 ^{**} MM = 357,83	9,49 e 16,26	322,10 – [M] ⁺	307 – [M – CH ₃] ⁺ 278 – [M – NH ₂ CO] ⁺ 263 – [M – N(CH ₃) ₃] ⁺ 158 – [M – C ₉ H ₁₄ N ₃] ⁺ 187 – [M – C ₉ H ₁₃ N] ⁺	
Produto 4 ^{**} MM = 387,86	10,69	352,10 – [M] ⁺	335,2 – [M – NH ₃] ⁺ 166,1 – [M – C ₁₀ H ₈ N ₃ O] ⁺ 151,1 – [M – C ₁₀ H ₇ N ₂ O] ⁺ 135,1 – [M – C ₁₁ H ₁₃ N ₄ O] ⁺ 121,1 – [M – C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂] ⁺	

^{*} A amostra apresenta o mesmo espectro de massas do padrão. ^{**} Produtos de degradação formados a partir da reação com H₂O₂. MM = Massa molar, Da = Daltons. t_R = tempo de retenção,

De acordo com os produtos formados e identificados por LC-MS-MS é possível observar que a amostra do corante Amarelo básico 57 apresenta um contaminante em pequena quantidade na sua fórmula comercial e após tratamento com H_2O_2 promove a formação de pelo menos 3 produtos principais conforme mostrado na Tabela 10. O esquema 1 resume os principais produtos gerados durante o mecanismo de oxidação pelo peróxido de hidrogênio.



Esquema 1: Degradação do Amarelo básico 57 em solução aquosa de H_2O_2 .

A formação dos produtos de degradação apresentados no Esquema 1 pode ser proposta via mecanismo de simultâneos ataques eletrofílicos por radicais hidroxila que são espécies reativas comumente produzidas pela reação de decomposição do H_2O_2 .

4.8.2.2. Vermelho básico 76

Os cromatogramas LC-MS-MS obtidos para o corante Vermelho básico 76 apresentam um pico com tempo de retenção em 9,91 min, cujo espectro de massas é apresentado na Figura 42. Observa-se que o espectro apresenta os mesmos perfis do padrão analítico ($m/z = 336$) e pelo alto grau de similaridade podemos inferir de forma inequívoca se tratar do corante Vermelho básico 76.

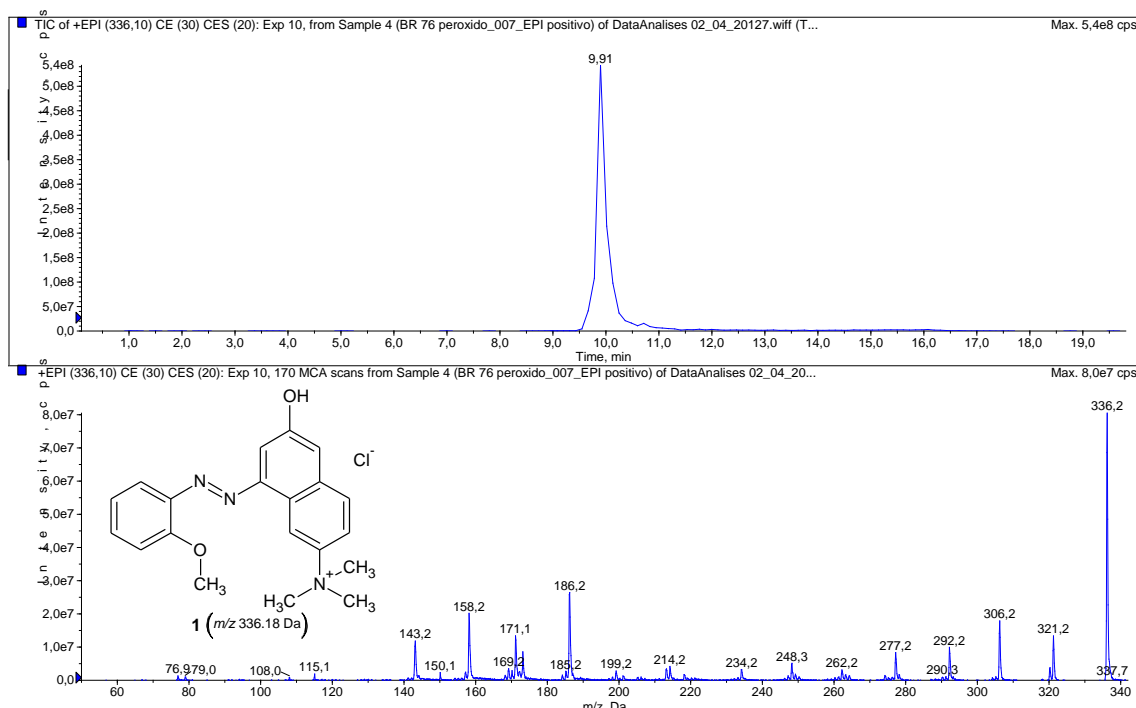
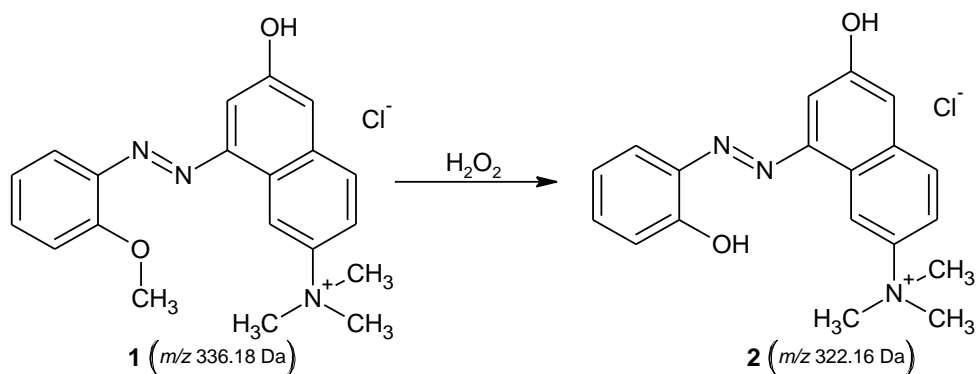


Figura 42. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do corante Vermelho básico 76.

O produto gerado após reação do corante Vermelho básico 76 com H_2O_2 apresenta apenas um único produto de degradação, conforme detectado por LC-ESI-MS/MS com $m/z = 332$ Da além do pico do corante original. Observa-se apenas a perda do grupo $-CH_3$ durante o processo, conforme mostra o Esquema 2. Estes resultados indicam que o corante apresenta pouca descoloração em virtude da manutenção do grupo azo.



Esquema 2. Rota de degradação proposta para o Vermelho básico 76 em solução aquosa de H_2O_2 .

As Figuras 43 – 44 referem-se aos cromatogramas e espectros de massas do produto de degradação e do corante Vermelho básico 76. A interpretação dos espectros está contida na Tabela 11 e parte dela na Figura 43.

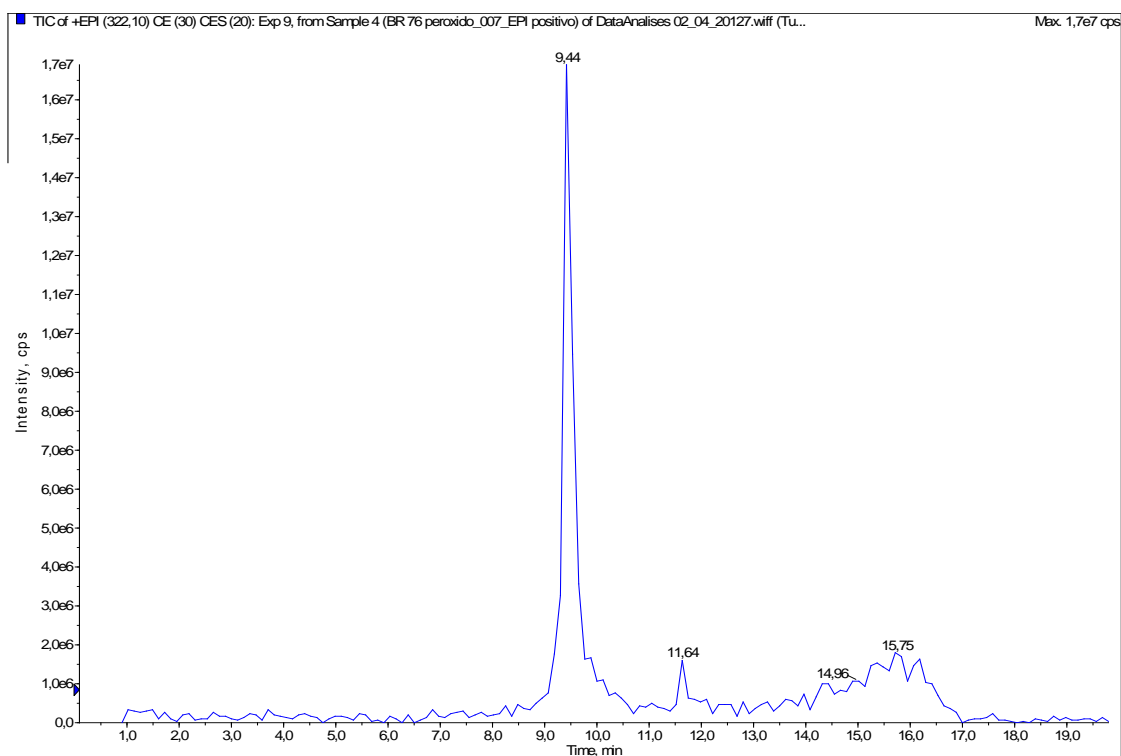


Figura 43. Cromatograma (LC–ESI–MS) monitorado em EMS (*Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan*). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da.

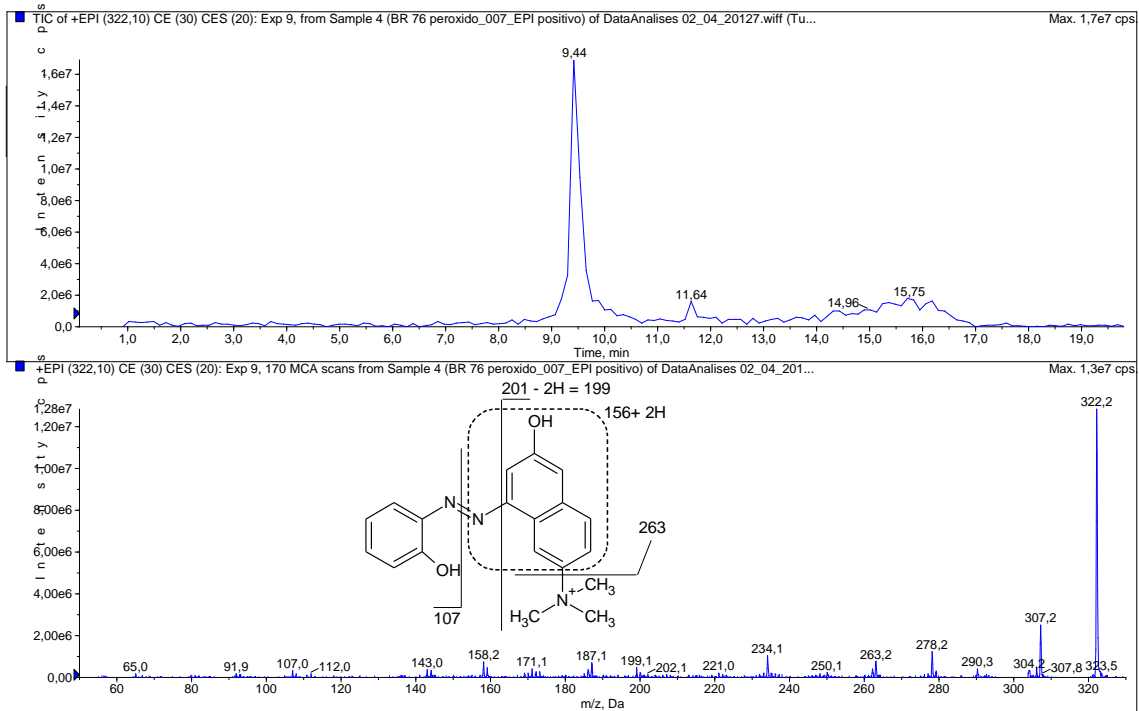


Figura 44. LC-ESI-MS/MS referente ao produto de degradação 1.

Tabela 11. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Vermelho básico 76.

Substância	t_R (min)	Íon protonado observado Primeira ordem MS (m/z – estrutura)	Produto iônico em MS/MS (m/z – estrutura)	Estrutura proposta
Corante inicial 1*	9,94	336,20 – [M] ⁺	Possui mesmo perfil de dissociação do padrão analítico	
Produto 2** MM = 357,84	9,91	322,2 – [M] ⁺	307 – [M – CH ₃] ⁺ 290 – [M – O ₂] ⁺ 278 – [M – CO – O] ⁺ 263 – [M – N(CH ₃) ₃] ⁺ 158 – [M – C ₁₀ H ₈ NO] ⁺ 187 – [M – C ₇ H ₇ N ₂ O] ⁺	

A amostra apresenta o mesmo espectro de massas do padrão. ** Produtos de degradação formados a partir da reação com H₂O₂. MM = Massa molar, Da = Daltons. t_R = tempo de retenção,

4.8.2.3. Marrom básico 16

Os cromatogramas LC-MS-MS obtidos para o corante Marrom básico 16 apresentam um pico com tempo de retenção em 9,50 min, cujo espectro de massas é apresentado na Figura 45. Observa-se que o espectro apresenta os mesmos perfis do padrão analítico ($m/z = 321,1$) e pelo alto grau de similaridade podemos inferir de forma inequívoca se tratar do corante Marrom básico 16.

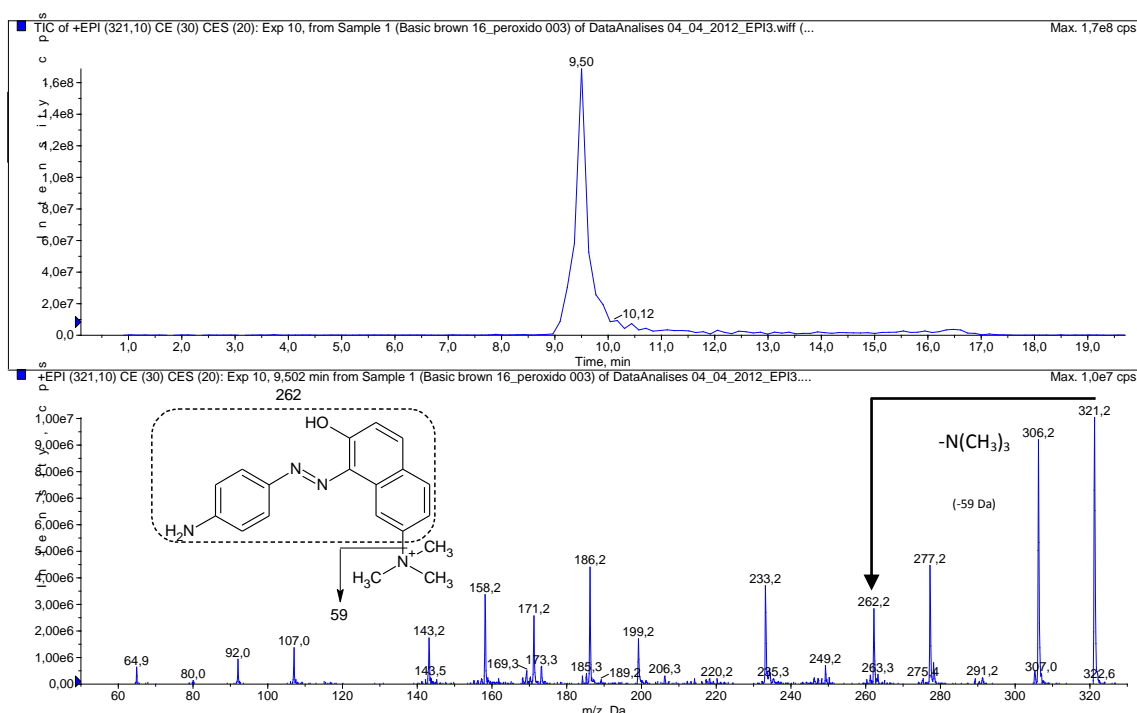
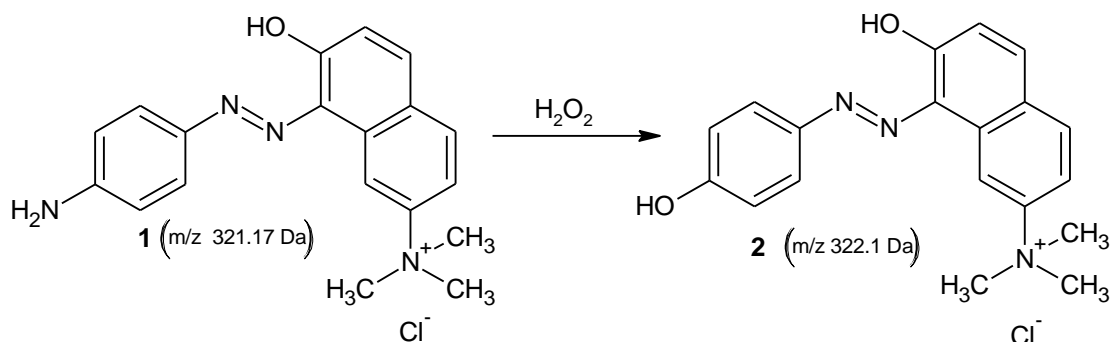


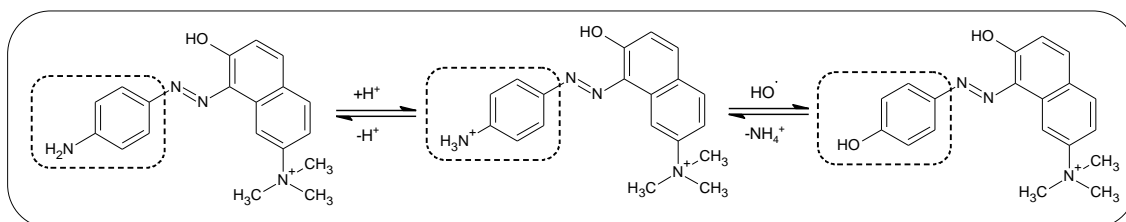
Figura 45. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do corante Marrom básico 16.

As Figuras 45 e 47 apresentam os espectros de LC-ESI-MS/MS do produto da reação de oxidação do corante Marrom básico 16 pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. É possível observar tanto pelos picos observados quanto pela coloração final do corante que o grupo cromóforo não sofreu nenhum tipo de ataque eletrofílico. O Esquema 3 apresenta uma provável rota de degradação do corante Marrom básico 16 pela oxidação com peróxido. O mecanismo de reação (Esquema 4) envolve a formação da substância 2, após ataque do radical $\cdot\text{OH}$ ao grupo NH_2 ligado ao anel aromático do corante, formando no final do processo uma ligação

entre a hidroxila e o anel aromático. Este comportamento é confirmado por Huang e colaboradores (2012).



Esquema 3. Rota de degradação proposta para o Marrom básico 16 em solução aquosa de H_2O_2 .



Esquema 4. Proposta do mecanismo de reação de degradação para o Marrom básico 16 em solução aquosa de H_2O_2 .

Os dados de espectrometria de massas são apresentados a seguir e os mesmos corroboram a proposta de degradação discutida acima. Ou seja, os dados obtidos em LC-ESI-MS (Figura 46) são consistentes com um perfil cromatográfico envolvendo apenas um produto de degradação. Podemos verificar pelas Figuras 45 e 47 que o corante e o produto de degradação coeluem o que denota que ambos possuem grande similaridade estrutural.

Por outro lado, os espectros de massas apresentam perfis muito semelhantes, com diferenças nos valores de m/z de 1 Da para cada produto iônico. Tendo em vista o mecanismo de degradação e de reação que fora discutido anteriormente, a proposta de identificação do produto de degradação se baseou principalmente na perda neutra de m/z 59 $[\text{N}(\text{CH}_3)_3]$ que foi comum tanto a molécula do corante (m/z 321,2) quanto ao produto de degradação (m/z 322,2). Ou seja, como houve a substituição do grupo $-\text{NH}_2$ (16 Da) pelo $-\text{OH}$ (17 Da), conseqüentemente a todos os valores dos fragmentos do espectro do produto de degradação foram acrescidos em 1 Da e através dos produtos de dissociação com

m/z 262,2 e 263,2. Isto leva a proposta de uma provável estrutura do produto formado confirmada pela comparação dos dados nas Figuras 45 e 47.

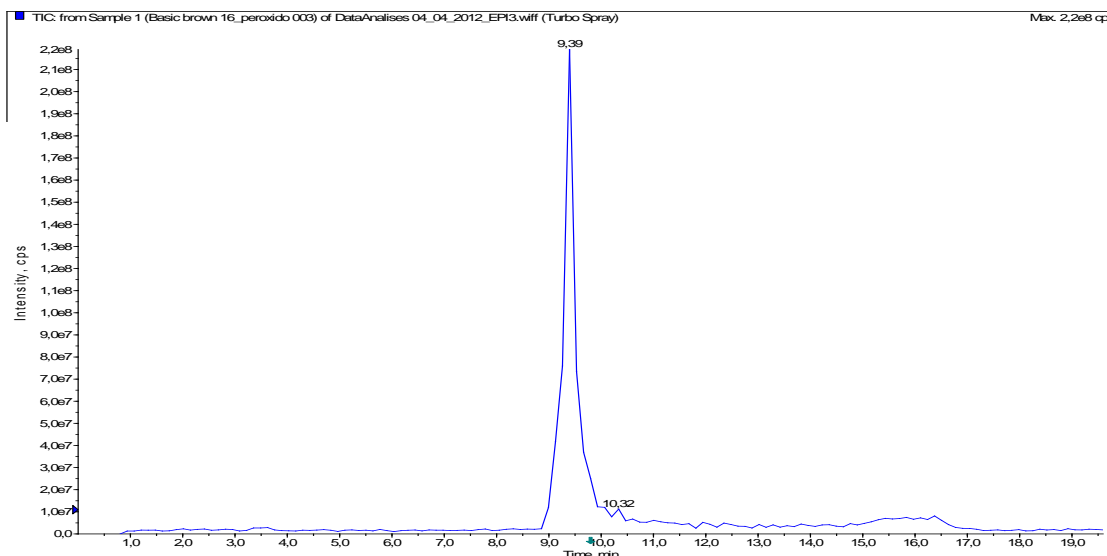


Figura 46. Cromatograma (LC-ESI-MS) monitorado em EMS (*Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan*). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da.

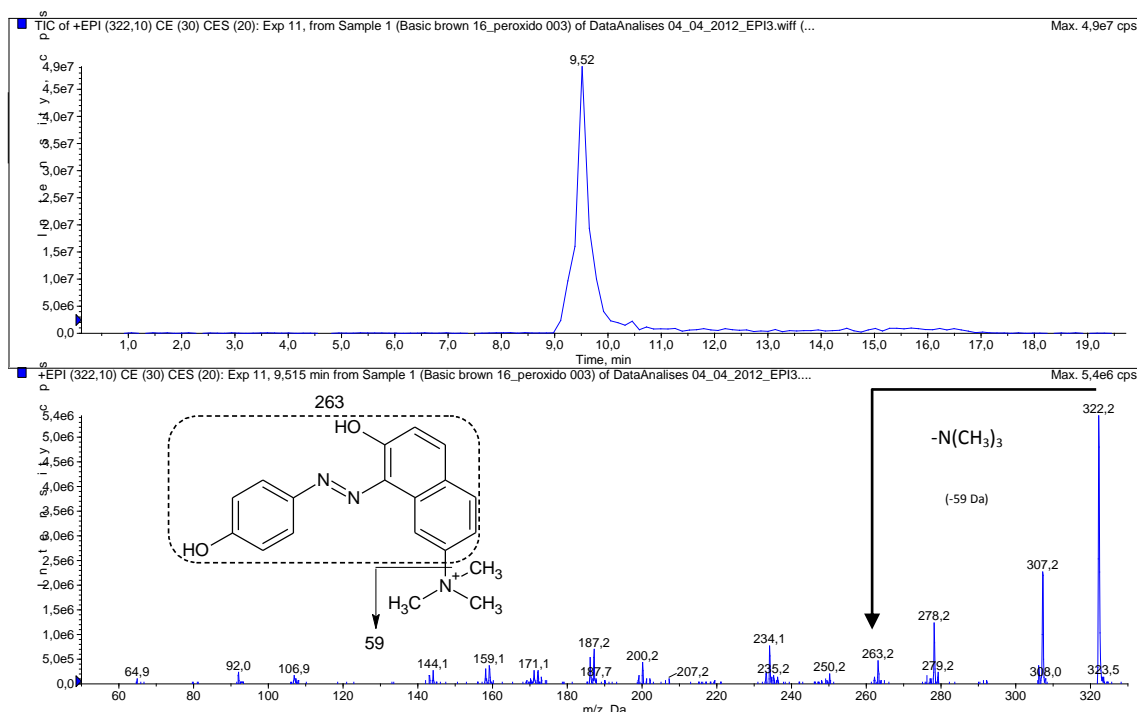
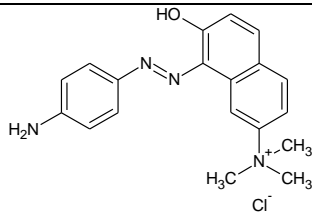
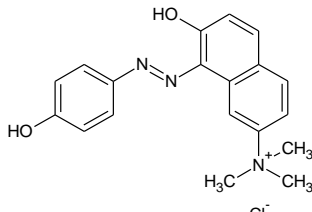


Figura 47. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação.

A Tabela 12 compila os tempos de retenção e produtos formados.

Tabela 12. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Marrom básico 16.

Substância MM (Da)	t_R (min)	Íon protonado observado	Produto iônico em MS/MS (m/z – estrutura)	Estrutura proposta
		Primeira ordem MS (m/z – estrutura)		
Corante inicial 1 [*] MM = 356,84	9,52	321,17 – [M] ⁺	Possui mesmo perfil de dissociação do padrão analítico	
Produto 2 ^{**} MM = 357,84	9,50	322,1 – [M] ⁺	307 – [M – CH ₃] ⁺ 290 – [M – O ₂] ⁺ 278 – [M – CO – O] ⁺ 263 – [M – N(CH ₃) ₃] ⁺ 234 – [M – N(CH ₃) ₃ – COH] ⁺ 158 – [M – C ₁₀ H ₈ NO] ⁺ 187 – [M – C ₇ H ₇ N ₂ O] ⁺ 107 – [M – C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O] ⁺	

^{*} A amostra apresenta o mesmo espectro de massas do padrão. ^{**} Produtos de degradação formados a partir da reação com H₂O₂. MM = Massa molar, Da = Daltons. t_R = tempo de retenção,

4.8.2.4. Azul básico 99

A amostra do corante Azul básico 99 foi submetida a análise em LC-ESI-MS (Figura 48). O cromatograma correspondente demonstra picos com baixa resolução cromatográfica ao contrário da maioria dos outros corantes estudados com picos nos seguintes tempos de retenção: 6,85, 7,23, 8,11, 9,23 e 16,04 min. De acordo com o

respectivo espectro de massas, observa-se que o pico principal em 8,11 min corresponde ao corante original, com $m/z = 415,2$ Da, enquanto que os outros picos são atribuídos a isômeros de posição e impurezas da amostra, conforme diagnosticado previamente.

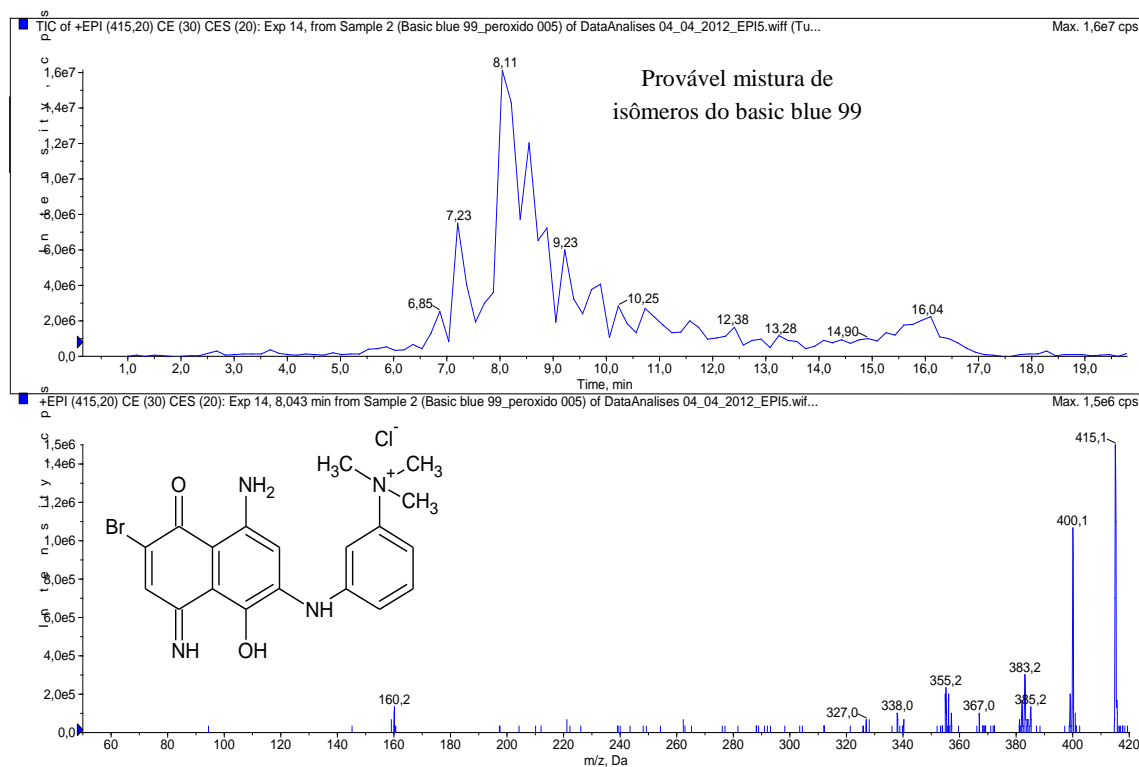


Figura 48. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas Azul básico 99.

Tendo em vista que tivemos baixa remoção da cor, a degradação do corante Azul básico 99 sob tratamento com peróxido de hidrogênio apresenta cromatogramas com picos em 3,33; 7,08; 7,96; 9,08 e 13,46 min, cujo cromatograma e respectivo espectro de massas são mostrados na Figura 49 e 50. De acordo com os estudos de LC-ESI-MS/MS observa-se a ocorrência de alguns produtos o que nos leva a uma provável rota de degradação apresentados nos Esquemas 5 e 6, respectivamente.

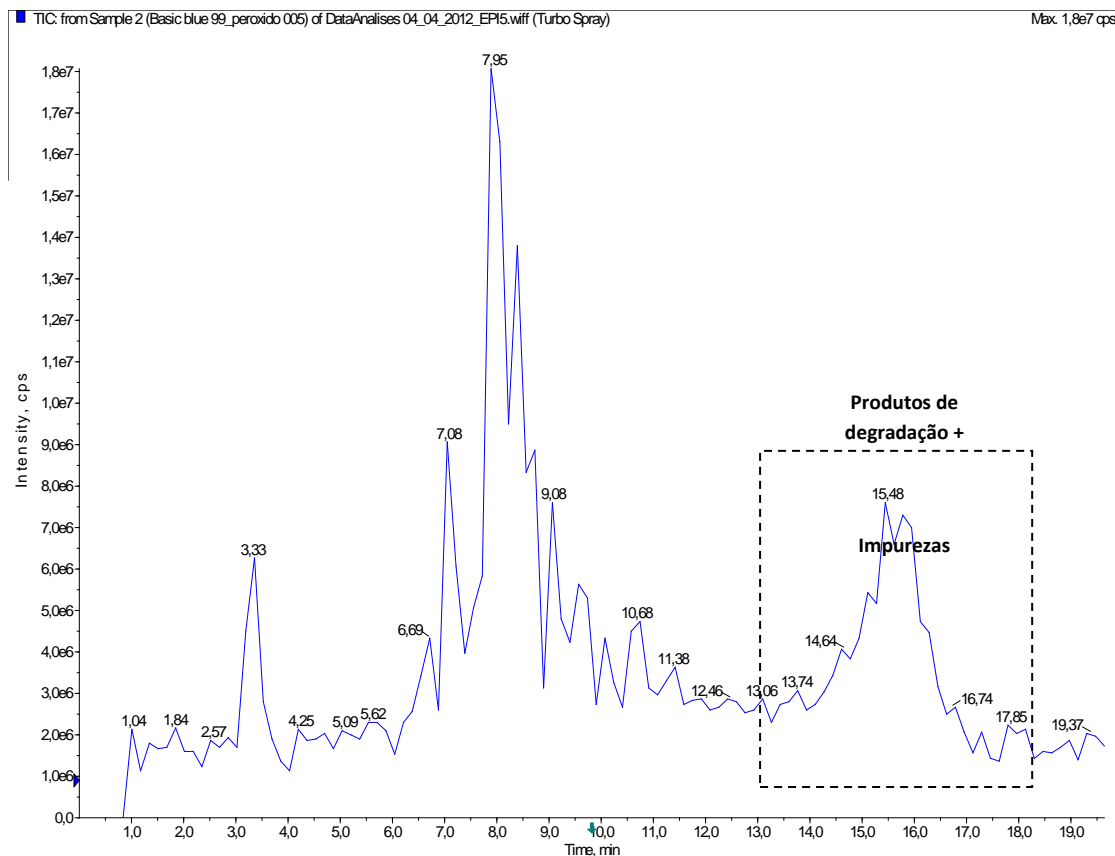
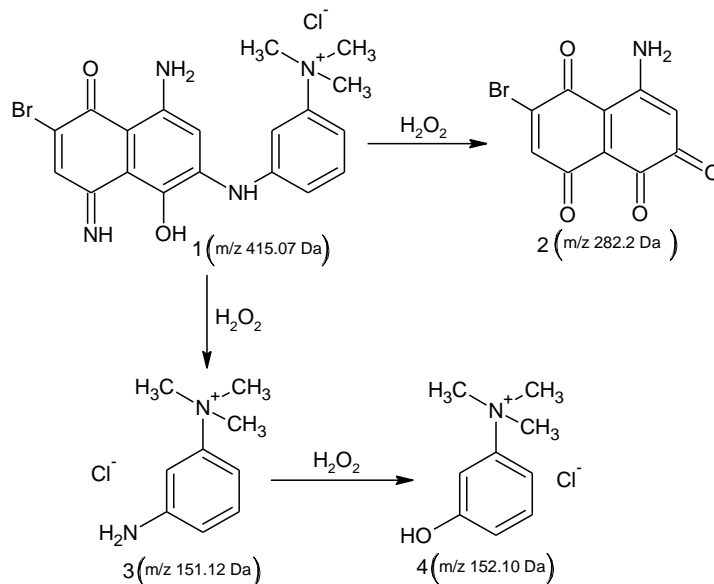


Figura 49. Cromatograma (LC-ESI-MS) monitorado em EMS (*Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan*). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da.



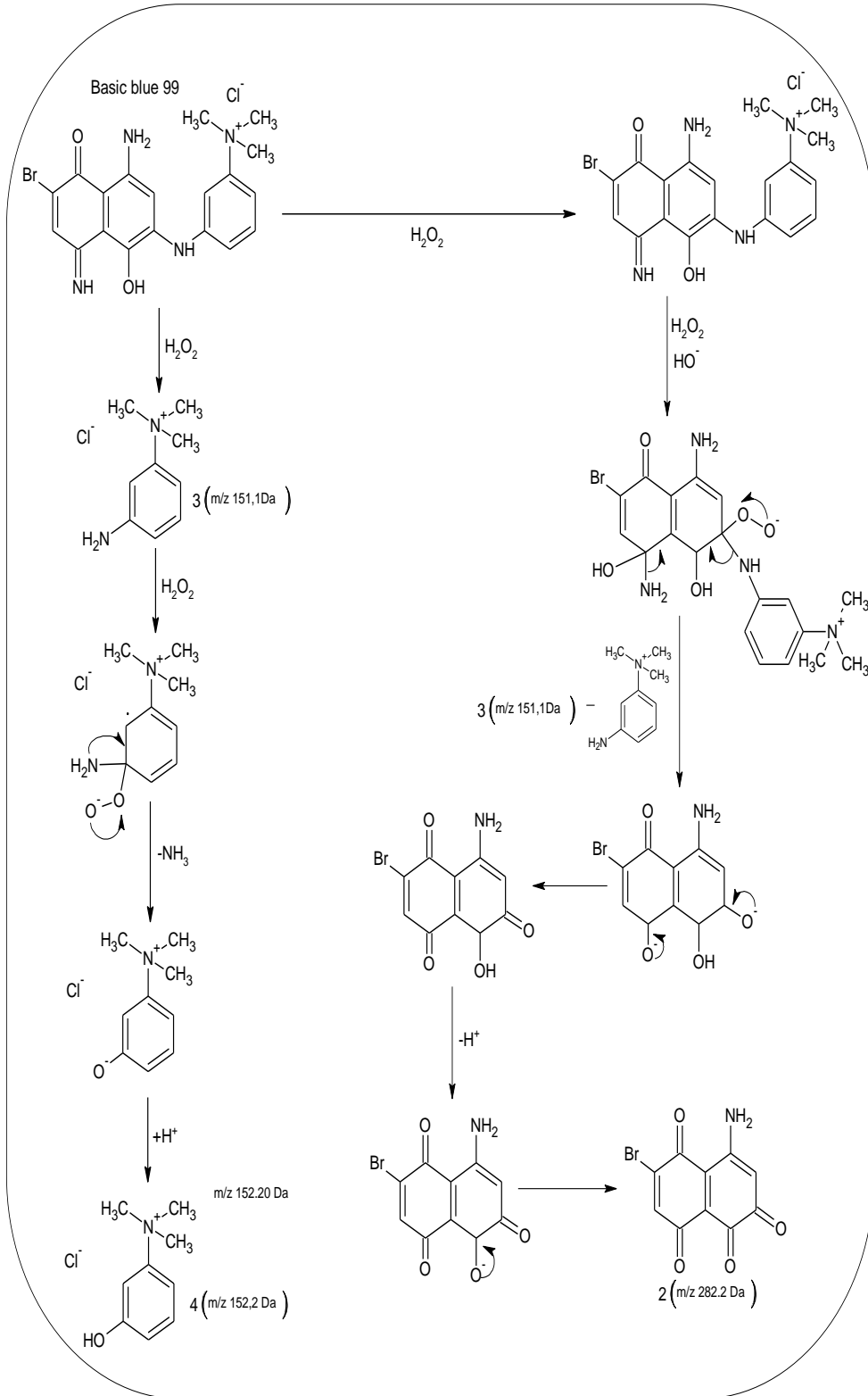
Esquema 5. Rota de degradação proposta para o Azul básico 99 em solução aquosa de H_2O_2 .

O mecanismo de reação (Esquema 6) exhibe o provável efeito do peróxido de hidrogênio sobre os produtos de degradação formados e baseia-se nos sucessivos ataques eletrofílicos realizados por radicais hidroxila e hidroperóxidos. A formação do produto de degradação 2 ocorre pelo ataque dos radicais hidroxilas ao carbono do grupo antraquinona na posição do anel aromático ligado a amina secundária. O ataque eletrofílico leva a clivagem da ligação N-C. À partir desse estágio há a formação do produto de degradação 3 (m/z 151,1).

A formação do produto de degradação 4 se dá a partir da molécula 3 que também sofre ataque eletrofílico que por meio das transferências de elétrons do grupo $-NH_2$ para o anel aromático resulta na perda de NH_3 e conseqüentemente ao fim da reação ocorre a estabilização do anel com a incorporação do grupo OH gerando o produto de degradação 4.

Os dados de LC-ESI-MS/MS usados como base para formulação das hipóteses discutidas no texto acima são apresentados a seguir.

A amostra do corante Azul básico 99 que foi submetida ao processo de degradação com H_2O_2 teve seu perfil inicial traçado por análise em LC-ESI-MS (Figura 49). O cromatograma correspondente demonstra picos com baixa resolução cromatográfica ao contrário da maioria dos outros corantes estudados. O Azul básico 99 possui o inconveniente de ser um corante de baixa pureza e dados apresentados pelo próprio fabricante indicam que pode haver um número significativo de prováveis isômeros de posição. Deste modo, a baixa resolução cromatográfica observada na Figura 48 pode ser atribuída ao grande número de isômeros e impurezas, tendo em vista que tivemos baixa remoção da cor. Adicionalmente observa-se que a maior parte dos constituintes apresentados na região de tempo de retenção entre 6 a 10 minutos são moléculas originalmente presentes como contaminantes no próprio padrão adquirido.



Esquema 6. Proposta do mecanismo de reação de degradação para o Azul básico 99 em solução aquosa de H_2O_2 [64].

Após a aquisição dos dados em *Full Scan* realizamos os estudos em LC-ESI-MS/MS (Figuras 50 – 52), os estudos dos produtos de dissociação nos permitiam propor a formação dos produtos de degradação. Os fragmentos descritos para todos os produtos de degradação estão contidos na Tabela 13.

Na Figura 50 obtivemos o espectro de massas em MS/MS do pico cromatográfico com tempo de retenção de 3,30 minutos, neste caso o íon precursor m/z 151,1 foi dissociado (CID) fornecendo os seguintes fragmentos: m/z 136 $[M - CH_3]^+$, 135 $[M - NH_2]^+$ e 93 $[M - N(CH_3)_3 + H]^+$.

Na Figura 51 obtivemos o espectro de massas e MS/MS do pico cromatográfico com tempo de retenção de 3,39 minutos correspondente ao produto de degradação 4. O íon precursor m/z 152,2 foi dissociado (CID) fornecendo os seguintes fragmentos: m/z 136 $[M - CH_3]^+$ e 94 $[M - N(CH_3)_3 + H]^+$.

A Figura 52 apresenta o cromatograma e o espectro em MS/MS do produto de degradação 2. O íon precursor m/z 282,2 forneceu os seguintes íons produtos via (CID): m/z 134 $[M - C_7H_2NO_3]^+$, m/z 208/210 $[M - 3H - C_3HO_2]^+$ os dois íons possuem uma razão entre M: M+2 com intensidades relativas de 1:1 o que confirma que a molécula possui um átomo de bromo. A proposta para o íon de m/z 69 $[M - C_7H_3BrNO_2]^+$ é razoável tendo em vista o fato de tal espécie possuir baixa intensidade no espectro.

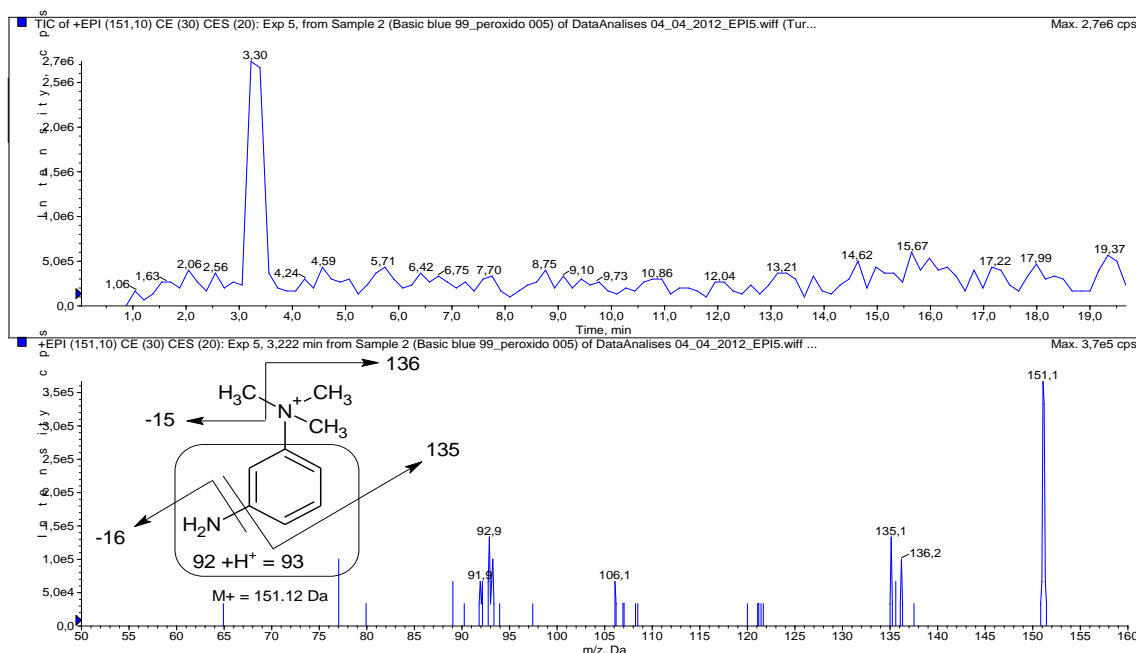


Figura 50. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação 3.

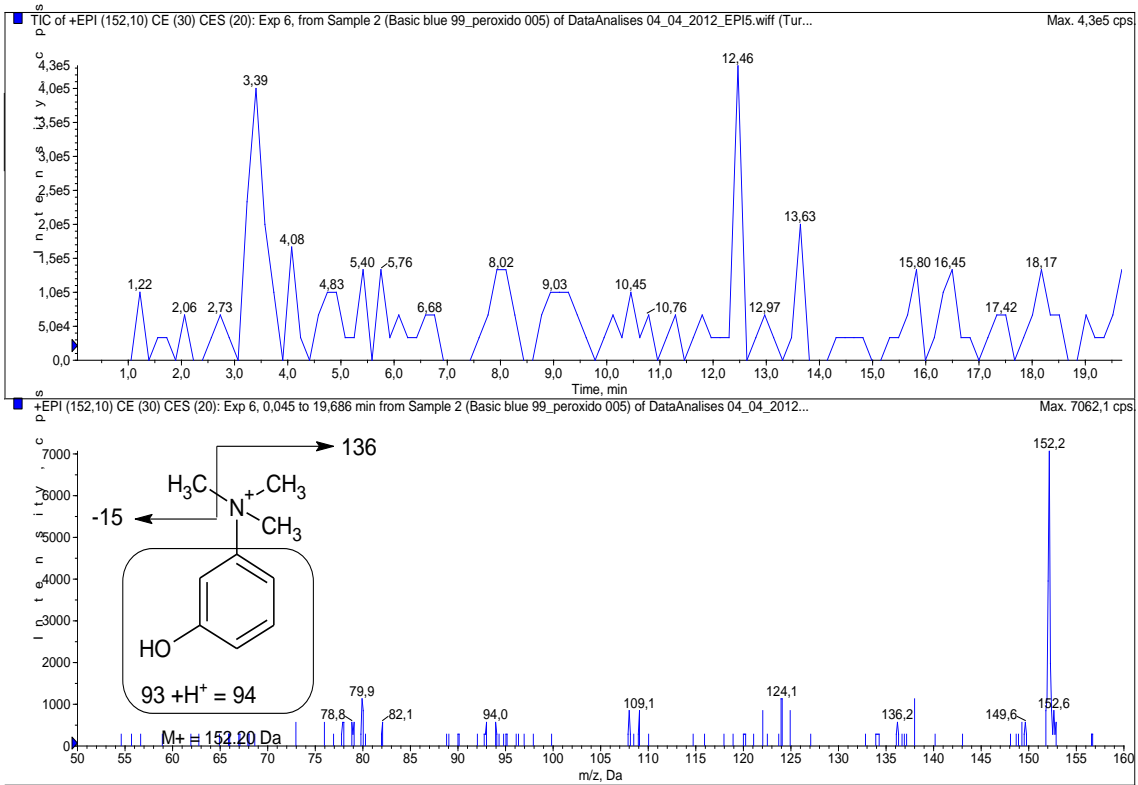


Figura 51. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação 4.

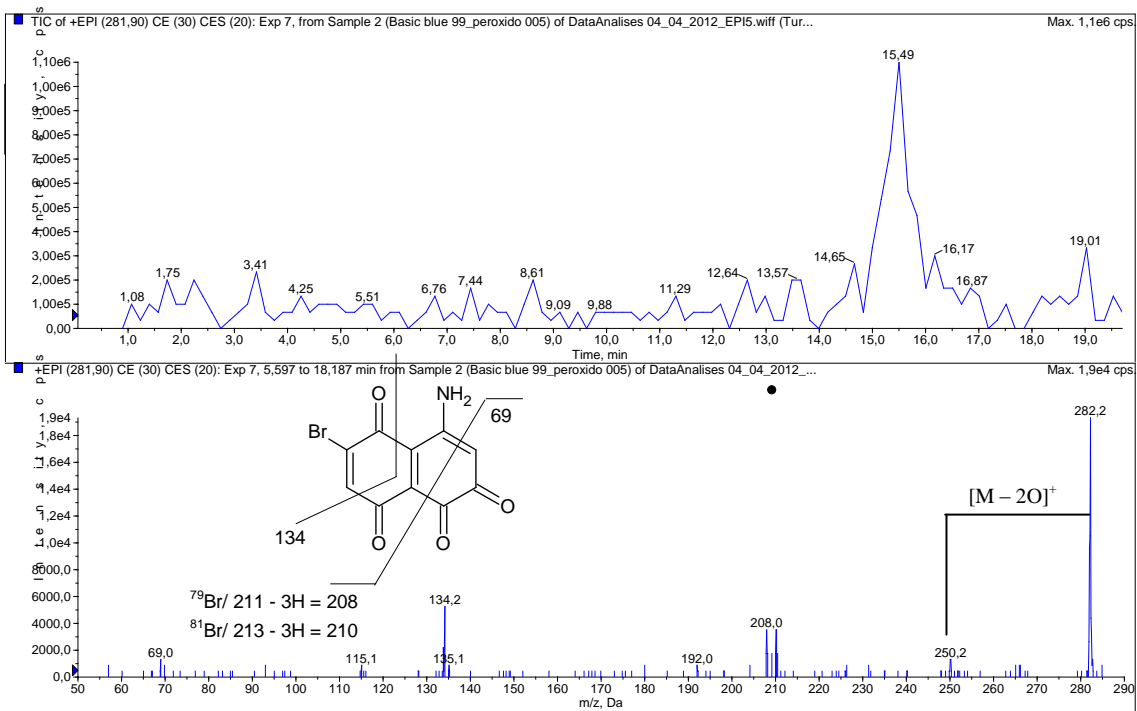
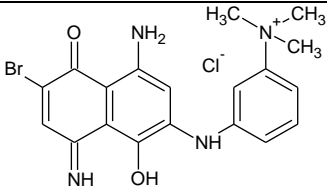
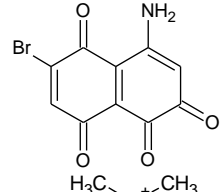
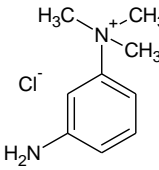
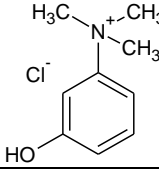


Figura 52. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do produto de degradação 2.

Tabela 13. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Azul básico 99.

Substância MM (Da)	t_R (min)	Íon protonado observado Primeira ordem MS (m/z – estrutura)	Produto iônico em MS/MS (m/z – estrutura)	Estrutura proposta
Corante inicial 1* MM = 451,74	8,11	415,2 – [M] ⁺	Possui mesmo perfil de dissociação do padrão analítico	
Produto 2** MM = 281,04	15,49	282,2 – [M+H] ⁺	134 [M – C ₇ H ₂ NO ₃] ⁺ , 208/210 [M – 3H – C ₃ HO ₂] ⁺ 69 [M – C ₇ H ₃ BrNO ₂] ⁺	
Produto 3** MM = 151,1	3,30	151,1 – [M] ⁺	136 [M – CH ₃] ⁺ , 135 [M – NH ₂] ⁺ 93 [M – N(CH ₃) ₃ + H] ⁺	
Produto 4** MM = 152,1	3,39	152,1 – [M] ⁺	136 [M – CH ₃] ⁺ 94 [M – N(CH ₃) ₃ + H] ⁺	

* A amostra apresenta o mesmo espectro de massas do padrão. ** Produtos de degradação formados a partir da reação com H₂O₂. MM = Massa molar, Da = Daltons. t_R = tempo de retenção,

4.8.2.5. Violeta ácido 43

O Violeta ácido 43 foi o corante que apresentou a pior resposta em termos de detectabilidade no sistema LC-ESI-MS/MS (Figura 53). A análise foi realizada nas polaridades positiva e negativa, para que se pudesse tentar identificar o máximo de produtos de degradação. A ausência de picos cromatográficos intensos mostra que há problema de sensibilidade no sistema utilizado para este corante. No entanto, a existência de espectros com fragmentos na ordem de 10⁴ e 10⁵ cps nos permitiu identificar alguns produtos de degradação mesmo estando em níveis bastante reduzidos. Do mesmo modo, o espectro obtido com $m/z=451,74$ confirma a estrutura química prevista para o corante Violeta ácido 43, como mostrado na Tabela 14.

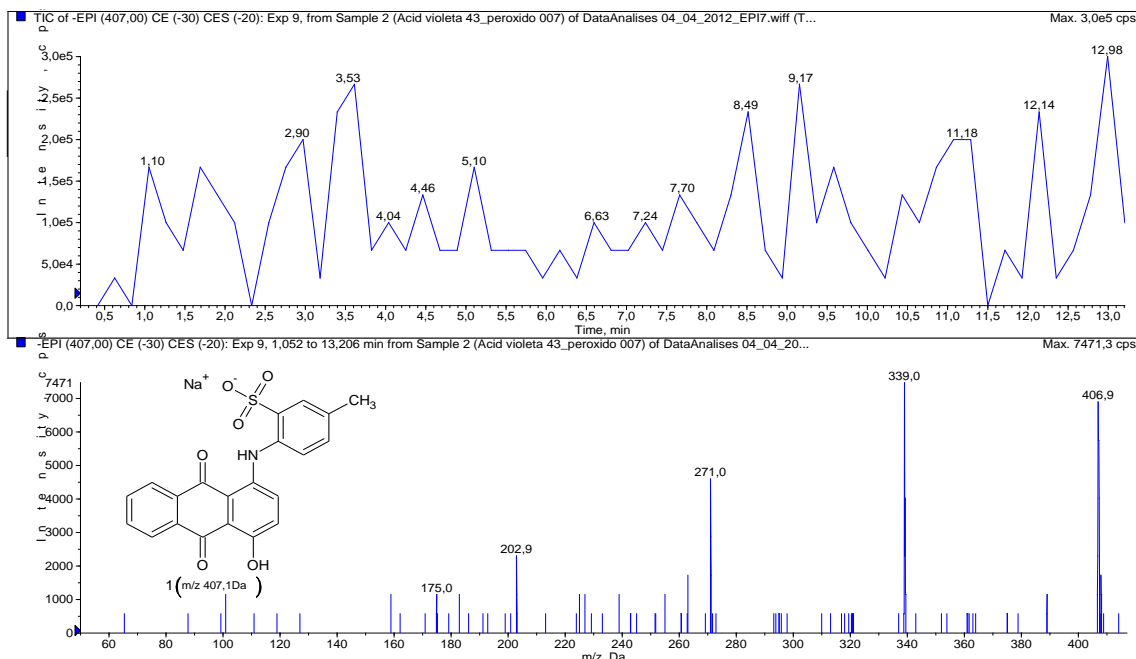
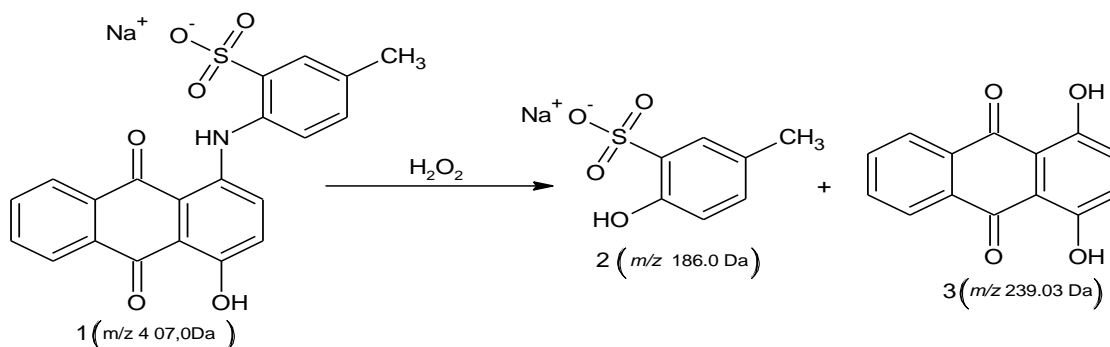


Figura 53. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro de massas do corante Violeta ácido 43.

A Figura 53 apresenta o espectro de massas do corante Violeta ácido 43 que possui mesmo padrão de fragmentação do padrão analítico. Considerando a fraca descoloração do corante sob ação de H_2O_2 podemos supor que os produtos de degradação formados estão em baixa concentração, sendo, portanto, uma amostra de difícil interpretação.

A análise dos espectros de massas obtidos após tratamento da amostra sugere uma provável rota de degradação do corante Violeta ácido 43 que está representada no Esquema 7. Os mecanismos de reação que regem a formação dos produtos de degradação 2 e 3 são baseados em ataques eletrofílicos do peróxido de hidrogênio ao corante de forma semelhante a observada para o corante Azul básico 99.



Esquema 7. Rota de degradação proposta para o Violeta ácido 43 em solução aquosa de H_2O_2 .

Os dados apresentados nas Figuras 55 – 56 demonstram os resultados das propostas de elucidação dos produtos de degradação por LC-ESI-MS/MS. Na Figura 54 temos os dados de *Full Scan* que já demonstra um perfil cromatográfico pobre em produtos de degradação.

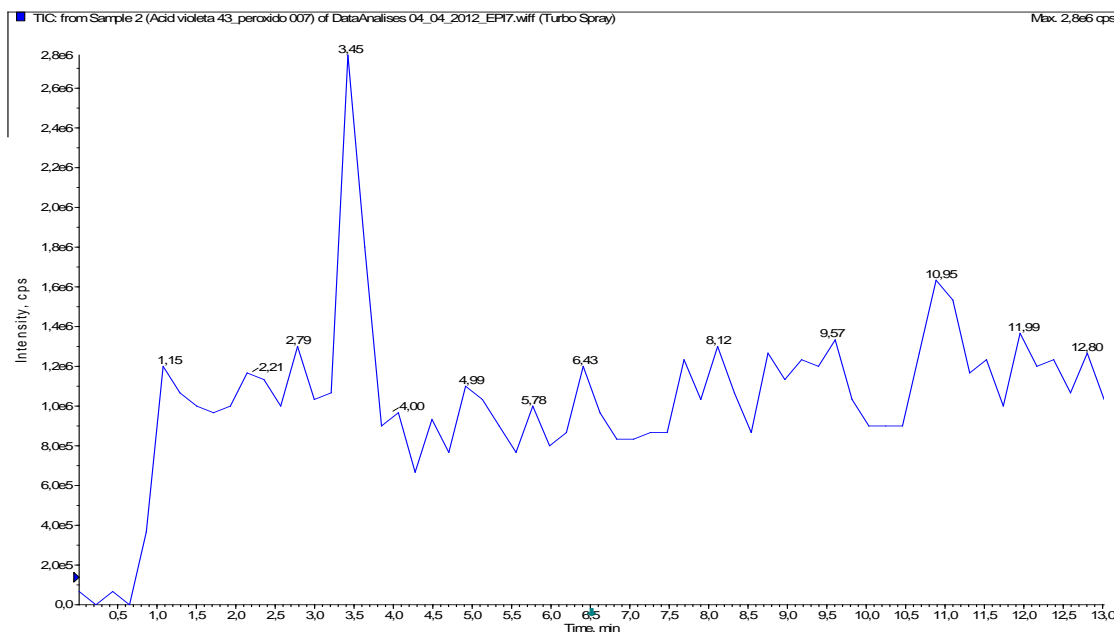


Figura 54. Cromatograma (LC-ESI-MS) monitorado em EMS (*Enhanced Mass Spectrometry – Full Scan*). Intervalo de aquisição de massas – m/z 50 a 600 Da.

Na Figura 55 temos o íon precursor de m/z 239,0 sofrendo dissociação com perda neutra de m/z 18 Da (H_2O) o que comprova a presença de hidroxila na molécula e perdas de 44 Da correspondente a perda neutra de CO_2 .

Na Figura 56 o íon precursor de m/z 186 também apresentou perdas neutras de m/z 18 Da (H_2O) e 28 Da (CO). Também verificamos a presença do anion m/z 80 (SO_3).

De acordo com os fragmentos apresentados podemos afirmar que as propostas são consistentes com as estruturas apresentadas. A Tabela 14 apresenta os fragmentos e estruturas discutidas neste texto.

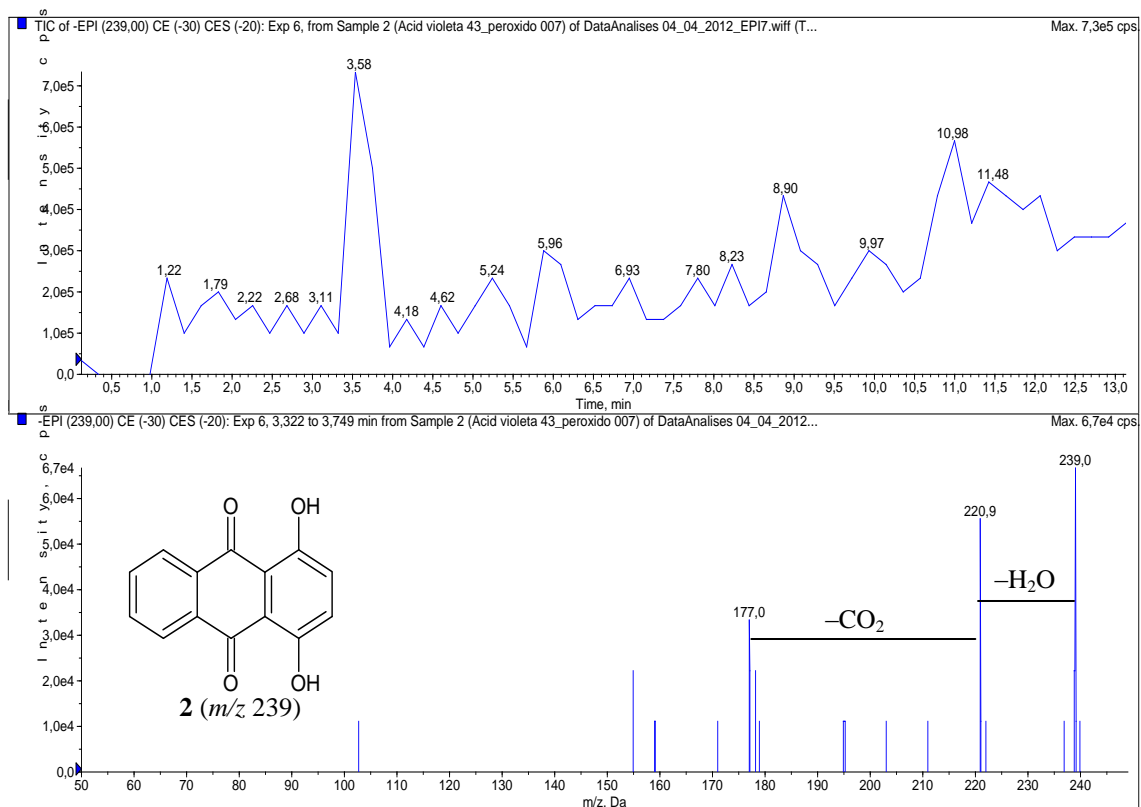


Figura 55. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro do produto de degradação 2.

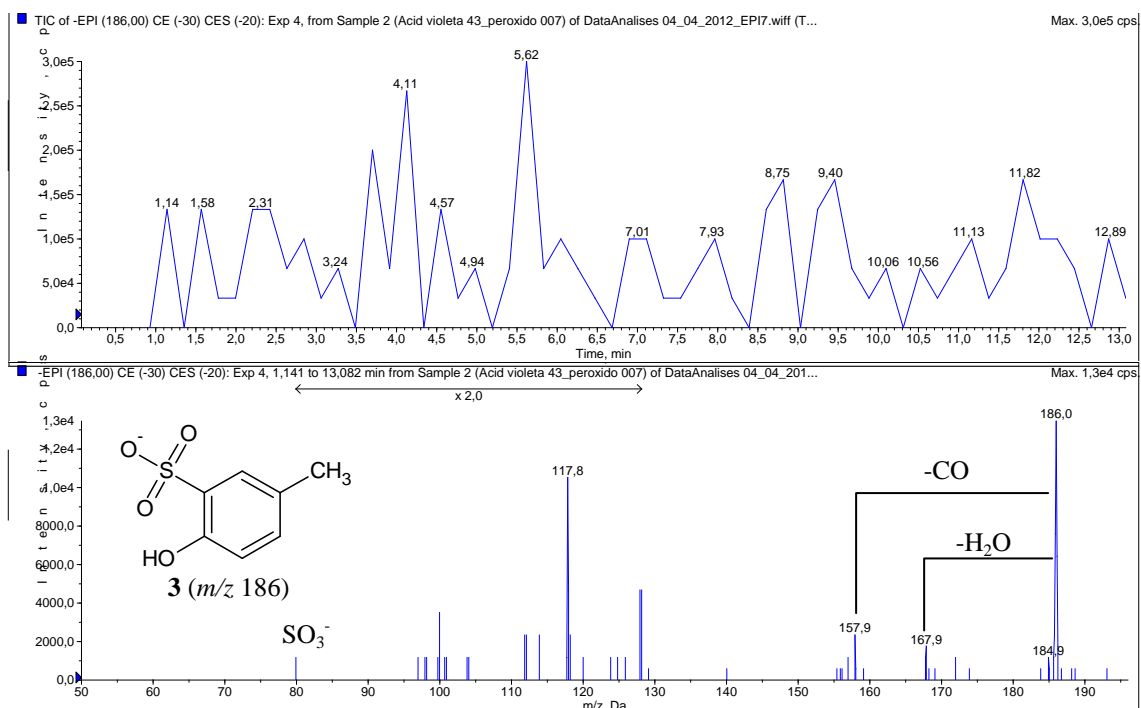
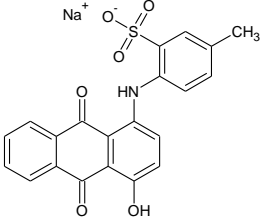
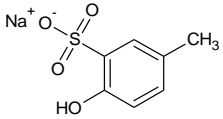
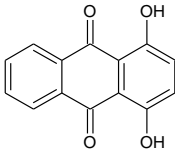


Figura 56. LC-ESI-MS/MS referente ao cromatograma e ao espectro do produto de degradação 3.

Tabela 14. Massa molecular (MM), tempos de retenção (t_R), íons produto e estruturas propostas para os produtos de degradação do corante Violeta ácido 43.

Substância MM (Da)	t_R (min)	Íon protonado observado Primeira ordem MS (m/z – estrutura)	Produto iônico em MS/MS (m/z – estrutura)	Estrutura proposta
Corante inicial 1* MM = 451,74	-	407,0 – [M – Na] ⁻	Possui mesmo perfil de dissociação do padrão analítico	
Produto 2** MM = 281,04	-	186,0 – [M – Na] ⁻	167,9 [M – H ₂ O] ⁻ , 157,9 [M – CO] ⁻ 80 [SO ₃] ⁻	
Produto 3** MM = 151,1	3,58	239,0 – [M – H] ⁻	220,9 [M – H ₂ O] ⁻ , 177,0 [M – CO ₂] ⁻	

* A amostra apresenta o mesmo espectro de massas do padrão. ** Produtos de degradação formados a partir da reação com H₂O₂. MM = Massa molar, Da = Daltons. t_R = tempo de retenção,

4.8.3. Oxidação dos corantes de tintura de cabelo pela ação de hipoclorito de sódio.

Considerando-se que resíduos do corante atingindo estações de tratamento de água, podem sofrer alterações com hipoclorito de sódio, devido à cloração das águas de captação investigou-se a seguir as reações de oxidação dos corantes presentes na formulação comercial na presença de hipoclorito de sódio (2,0% m/v). O produto de reação foi monitorado após 24 horas de reação com hipoclorito e os cromatogramas são mostrados na Figura 57.

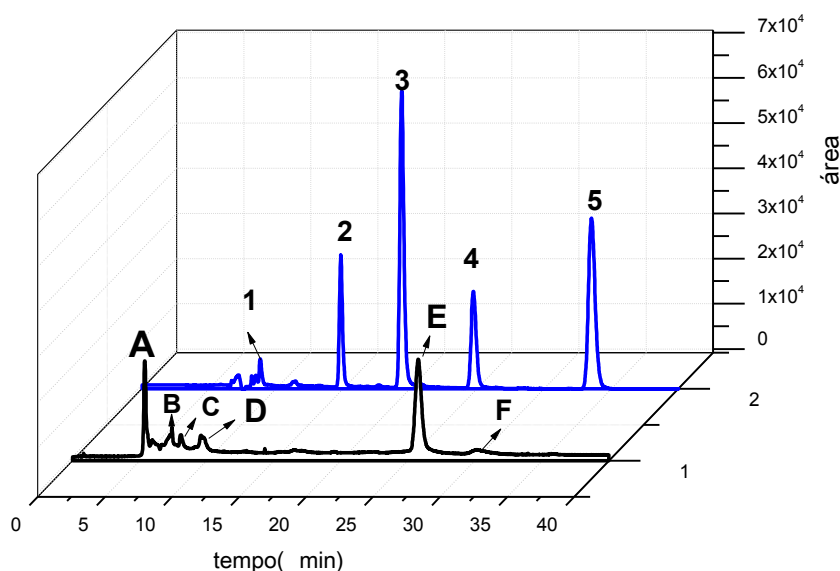


Figura 57. Cromatogramas CLAE/DAD obtidos para a mistura dos padrões dos corantes (curva 2) e após reação com 2,00 mL de hipoclorito de sódio $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ durante 24 horas (curva 1), a partir da extração 50:50 ACN/ água e otimização da fase móvel 35:65 ACN/água com líquido iônico ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BF}_4\text{N}_2$) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. vazão = $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. $T = 30^\circ\text{C}$. $\lambda = 413 \text{ nm}$.

A Figura 57 indica que os cromatogramas obtidos para a amostra da tintura comercial com hipoclorito de sódio apresenta pelo menos 6 picos em $t_r = 5,18 \text{ min}$, $t_r = 7,08 \text{ min}$, $t_r = 7,51 \text{ min}$, $t_r = 8,14 \text{ min}$, $t_r = 25,34 \text{ min}$ e $t_r = 30,48 \text{ min}$. A Figura 58 mostra os espectros na região do UV-Vis corresponde a cada corante antes e após adição de hipoclorito de sódio $0,35 \text{ mol L}^{-1}$.

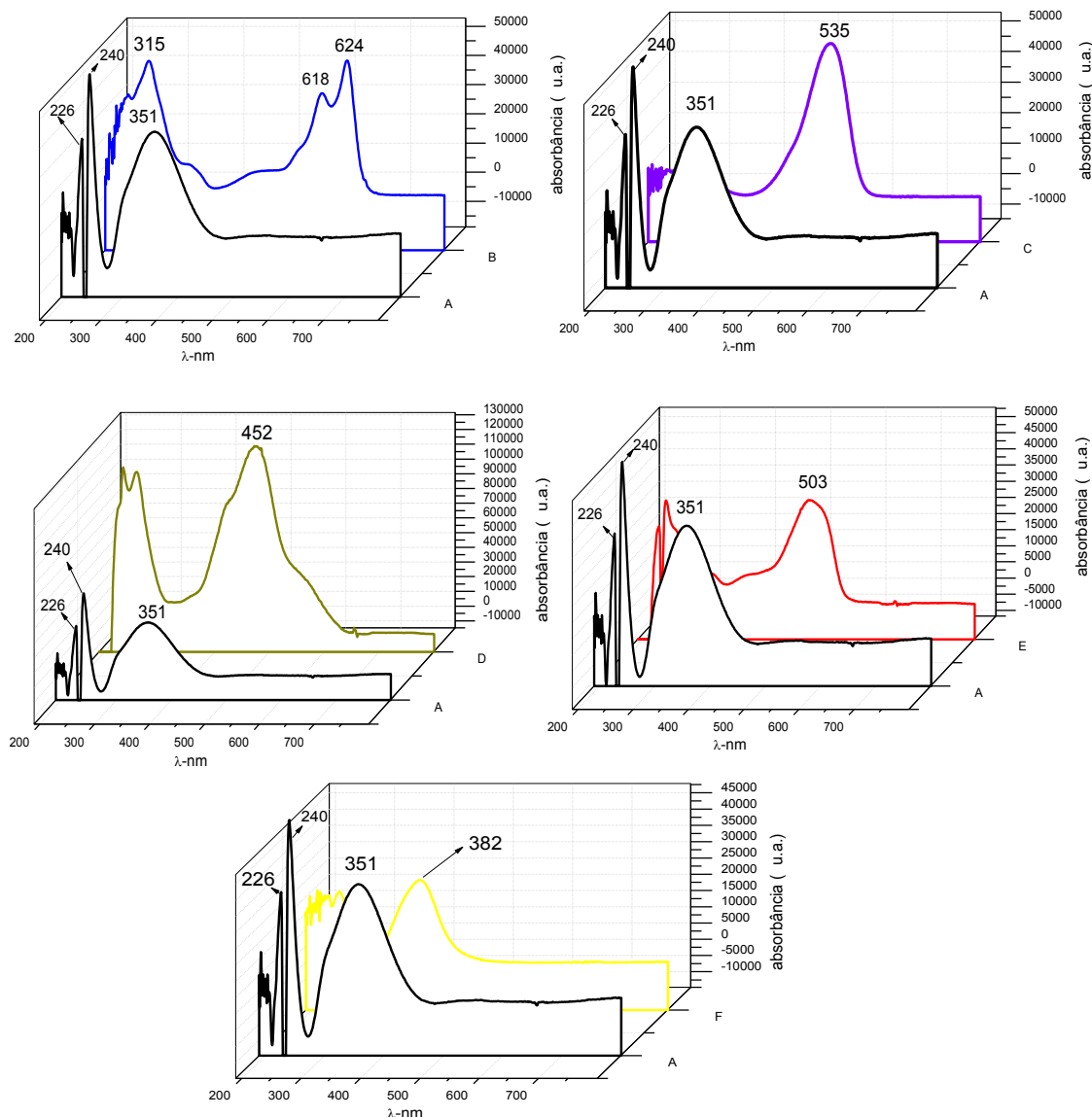


Figura 58. Espectros de absorvância na região do UV-Vis obtidos no modo CLAE-DAD para a mistura dos padrões dos corantes Azul básico 99 (B), Violeta ácido 43 (C), Marrom básico 16 (D), Vermelho básico 76 (E) e Amarelo básico 57 (F) e com adição de 2,00 mL de hipoclorito de sódio 0,35 mol L⁻¹ (A), após 24 horas de reação.

Os espectros apresentados na Figura 58 indicam que sob cloração novos produtos são formados, porém não adequadamente identificados por CLAE/DAD ou espectrofotometria no UV-Vis. Isto indica que todos os corantes foram oxidados gerando subprodutos e rápida descoloração. Isto ocorre provavelmente devido à ação do cloro que é um agente oxidante quebrando as ligações dos anéis aromáticos dos corantes e produzindo outras estruturas que podem ser ou não nocivas ao meio ambiente, as quais deverão ser melhor identificados posteriormente por espectroscopia de massas.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que a adição do líquido iônico tetrafluoroborato 1-butil-3-metilimidazólio (BMIm-BF₄) à fase móvel de 35:65 ACN/água é uma excelente estratégia para separação dos corantes usados em tintura de cabelo Azul básico 99, Violeta ácido 43, Marrom básico 16, Vermelho básico 76 e Amarelo básico 57 em coluna C18 por CLAE/DAD. Curvas de calibração podem ser construídas na região de $2,0 \times 10^{-7}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de cada corante com limites de detecção e quantificação entre 10^{-7} a 10^{-6} mol L⁻¹, sugerindo que o método apresenta sensibilidade compatível com o requerido para sua análise em formulação comercial e efluentes de salão de beleza. Amostras de água de estação de tratamento contaminadas propositalmente com os 5 corantes de interesse apresentaram ótimos níveis de recuperação sugerindo que o método poderia ser adotado para monitoramento da sua ocorrência em águas.

O método proposto permitiu a análise dos corantes de tintura de cabelo em amostras comerciais de tintura para cabelo (Arianor) após etapa de extração prévia em colunas pré-empacotadas Strata-X. A análise cromatográfica dos corantes na amostra de tintura comercial Arianor HF 65 indicou a ocorrência de cada corante na formulação em níveis de: 48,0% ± 1,0 do corante Vermelho básico 76, 19,0% ± 1,0 do Azul básico 99, 7,0% ± 1,0 do Amarelo básico 57, 4,0% ± 2,0 do Violeta ácido 43 e 2,0% ± 1,0 do corante Marrom básico 16.

Amostras do efluente de salão de beleza foram coletadas e analisadas segundo o método proposto usando simulação da tintura comercial usando instruções de uso do fabricante. Amostras coletadas após o uso da tintura de cabelo e lavagem dos cabelos durante 5 dias indicaram que os corantes de interesse são liberados gradualmente do cabelo durante as lavagens sucessivas e diminuem de concentração. Os corantes Violeta ácido 43 e Amarelo básico 57 não foram diagnosticados nas amostras sugerindo que podem sofrer degradações após a tintura pela ação de intempéries como a ação do sol e de outros agentes externos.

Os corantes foram ainda submetidos a reações com peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio e os produtos obtidos após oxidação indicaram a perda de coloração para as reações com hipoclorito de sódio e ligeira modificação estrutural quando submetidos à reação com peróxido de hidrogênio conforme diagnosticado por espectroscopia de massas. As análises feitas por espectroscopia de massas na

reação de oxidação de peróxido de hidrogênio com os padrões dos corantes indicou que realmente foram oxidados a outros produtos, porém não houve perda do grupo cromóforo.

Referências

- 1 BOUILLON, C.; WILKINSON, J. **The science of hair care**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 727 p.
- 2 ANDRISANO, V.; GOTTI, R.; ROVER, P.; CAVRINI, V. Analysis of semipermanent hair dyes by HPLC with on-line post-column photochemical derivatisation. **Chromatographia**, v. 44, p. 431-437, 1997.
- 3 AKYUZ, M.; ATA, S. Determination of aromatic amines in hair dye and henna samples by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 68-80, 2008.
- 4 GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W.; GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 203-210, 2004.
- 5 LADEMANN, J.; RICHTER, H.; JACOBI, U.; PATZELT, A.; HUEBER-BECKER, F.; RIBAUD, C.; BENECH-KIEFFER, F.; DUFOUR, E. K.; STERRY, W.; SCHAEFER, H.; LECLAIRE, J.; TOUTAIN, H.; NOHYNEK, G. J. Human percutaneous absorption of a direct hair dye comparing *in vitro* and *in vivo* results: implications for safety assessment and animal testing. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2214-2223, 2008.
- 6 NOHYNEK, G. J.; FAUTZ, R.; KIEFFER, F. B.; TOUTAIN, H. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 517-543, 2004.
- 7 YAMAUCHI, C.; OKAZAKIO, W. Application of an enzymatic method for identifying hair treatments chikara. **Journal of Health Science**, v. 53, n. 3, p. 708-714, 2007.
- 8 FREDERIQUE, H.; GERHARD, J. N.; WIM, J. A. M.; FLORENCE, B. Human systemic exposure to a [14C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dye and correlation with *in vitro* percutaneous absorption in human or pig skin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 8, p. 1227-1236, 2004.
- 9 KIRKLAND, D. J.; HENDERSON, L.; MARZIN, D.; MUELLER, L.; PARRY, J. M.; SPEIT, G.; TWEATS, D. J.; WILLIAMS, G. M. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 588, p. 88-105, 2005.
- 10 PINHEIRO, H. M.; TOURAND, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, n. 2, p. 121-139, 2004.
- 11 GAYLOR, D. W.; GOLD, L. S. Quick estimate of the regulatory safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 57-63, 1995.

- 12 KALOPISSIS, G. Opinion on p- phenylenediamine. In: ZYIAK, C. **The science of hair care**. 5th ed. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 287-308.
- 13 LYNCH, B. S.; DANIELS, J.; NESTMANN, E.; WILSON, R.; MUNRO, I.; SHARMA, R.; GRABARZ, R.; DREASSLER, W. What does the clinician want to know from the toxicologist. **The Toxicologist**, v. 42, n. 1S, p. 225-240, 1998.
- 14 LYNCH, B. S.; DELZELL, E. S.; BECHREL, D. H. Toxicology review and risk assessment of resorcinol: thyroid effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 198-210, 2002.
- 15 ZAHM, S. H.; WEISENBURGUER, D. D.; BABBITT, P. A. Use of hair coloring products and the risk of lymphoma, multiple myeloma, and chronic lymphocytic leukemia. **American Journal of Public Health**, v. 82, p. 990-997, 1992.
- 16 TAKKOUCHE, B.; ETMINAN, M.; MONTES-MARTINEZ, A. Personal use of hair dyes and risk of cancer: a meta-analysis. **Journal of America Medical Association**, v. 293, p. 2516-2525, 2005.
- 17 GAGO-DOMINGUEZ, M.; CASTELAO, J. E.; YUAN, J. M.; YU, M. C.; ROSS, R. K. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 91, p. 575-579, 2001.
- 18 KOGEVINAS, M.; FERNANDEZ, F.; GARCIA-CLOSAS, M.; TARDON, A.; GARCIA-CLOSAS, R.; SERRA, C.; CARRATO, A.; CASTANHO-VLINYALS, G.; YEAGER, M.; CHANNOCK, S. J.; LLORETA, J.; ROTHMAN, N.; REAL, F. X.; DOSEMECI, M.; MALATS, N.; SILVERMAN, D. Hair dye use is not associated with risk for bladder cancer: evidence from a case-control study in Spain. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 1448-1454, 2006.
- 19 KELSH, M. A.; ALEXANDER, D. D.; KALMES, R. M.; BUZER, P. A. Personal use of hair dyes and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiologic data. **Cancer Causes Control**, v. 19, p. 549-558, 2008.
- 20 GAGO-DOMINGUEZ, M.; BELL, D. A.; WATSON, M. A.; YUAN, J. M.; CASTELAO, J. E.; HEIN, D. W.; CHAN, K. K.; COEZEE, G. A.; ROSS, R. K.; YU, M. C. Permanent hair dyes and bladder cancer: risk modification by cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferases 1 and 2. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 483-489, 2003.
- 21 AMES, B. N.; KAMMEN, H. O.; YAMAZAKI, A. E. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 72, p. 2423-2427, 1975.
- 22 HOFER, H.; BONNATOWICZ, N.; REINDE, E. Analysis of human chromosomes after repeated hair dyeing. **Food and Chemical Toxicology**, v. 21, p. 785-789, 1983.

- 23 TACHON, P.; COTOVIO, J.; DOSSOU, K. G.; PRUNIERAS, M. Alternative method for checking toxicity of hair dyes. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 8, p. 265-273, 1986.
- 24 BOLT, H. M.; GOLKA, K. The debate on carcinogenicity of permanent hair dyes: new insights. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, p. 521-536, 2007.
- 25 ZHOU, J.; XU, H.; WAN, G. H.; DUAN, C. F.; CUI, H. Enhancing and inhibiting effects of aromatic compounds on luminol–dimethylsulfoxide OH–chemiluminescence and determination of intermediates in oxidative hair dyes by HPLC with chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 64, p. 467-477, 2004.
- 26 ROJANAPO, W.; KUPRADINUN, P.; TEPSUWAN, A. Carcinogenicity of an oxidation product of p-phenylenediamine. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 1902-1997, 1986.
- 27 SEARLE, C. E.; JONES, E. L. Effects of repeated applications of two semipermanent hair dyes to the skin of A and DBA_f mice. **British Journal of Cancer**, v. 36, p. 467-478, 1977.
- 28 SMYTH, R. B.; McKEOWN, G. G. The analysis of arylamines and phenols in oxidation-type hair dyes by paper chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 16, p. 454-459, 1964.
- 29 SINHA, A. K.; VERMA, S. C.; SHARMA, U. K. Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 15-20, 2007.
- 30 DOWLE, C. J.; MALYAN, A. P. Separation of the ortho, meta, and para isomers of aminophenol by high performance liquid chromatography. **Analyst**, v.115, p.105-107, 1990.
- 31 MARIANI, E.; NEUHOFF, C.; VILLA, C. Application of high-performance liquid chromatography in the analysis of direct dyes in semipermanent hair colouring cosmetics. **International Journal Cosmetic Science**, v. 19, p. 51-63, 1997.
- 32 MEYER, A.; BLOMEKE, B.; FISCHER, K. Determination of p-phenylenediamine and its metabolites MAPPD and DAPPD in biological samples using HPLC-DAD and amperometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 1627-1633, 2009.
- 33 NARITA, M.; MURAKAMI, K.; KAUFFMANN, J. M. Determination of dye precursors in hair coloring products by liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 588, p. 316-320, 2007.
- 34 VINEIS, P.; PIRASTU, R. Aromatic amines and cancer. **Cancer Causes Control**, v. 8, p. 346-355, 1997.

- 35 SCHETTGEN, T.; HEINRICH, K.; KRAUS, T.; GUBE, M. Determination of 2,5-toluylenediamine (2,5-TDA) and aromatic amines in urine after personal application of hair dyes: kinetics and doses. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 127-133, 2011.
- 36 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to man**: some aromatic amines and related nitro compounds-hair dyes, coloring agents and miscellaneous industrial chemicals. Lyon, 1978. p. 16.
- 37 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man**: overall evaluation of carcinogenicity: an update of IARC monographs. Lyon, 1987. p. 1-42.
- 38 COOK, L. S.; MALONE, K. E.; DALING, J. R.; VOIGT, L. F.; WEISS, N. S. Hair product use and risk of breast cancer in young women. **Cancer Causes Control**, v. 10, p. 551-559, 1999.
- 39 FUJITA, Y.; YAMAMOTO, N.; NAKAYAMA, M.; KAMBARA, K.; MITSO, N.; MATSUNMOTO, H. Forensic chemical study on human hair 3: identification of oxidative dyes and presumption of the brands from remaining components on human hair. **Eisei Kagaku**, v. 35, p. 444-453, 1989.
- 40 TANADA, N.; KAEGURA, M.; HARA, K.; HIEDA, Y.; TAKAMOTO, M.; KASHIMURA, S. Identification of human hair stained with oxidation hair dyes by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **Forensic Science International**, v. 52, p. 5-11, 1991.
- 41 TANADA, N.; KAEGURA, M.; HARA, K.; HIEDA, Y.; TAKAMOTO, M.; KASHIMURA, S. Demonstration of oxidation dyes on human hair. **Forensic Science International**, v. 64, p. 1-8, 1994.
- 42 DI GIOIA, M. L.; LEGGIO, A.; LE PERA, A.; LIGUORI, A.; NAPOLI, A.; PERRI, F.; SICILIANO, C. Determination by gas chromatography/mass spectrometry of *p*-phenylenediamine in hair dyes after conversion to an imine derivative. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 143-148, 2005.
- 43 AKYÜZ, M.; ATA, S. Determination of aromatic amines in hair dye and henna samples by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 68-80, 2008.
- 44 GERHARD, J. N.; DANIEL, D.; ALEXIA, G.; PIERRE, A. M.; HERVE, T.; JACQUES, L. Under the skin: biotransformation of para-aminophenol and para-phenylenediamine in reconstructed human epidermis and human hepatocytes. **Toxicology Letters**, v. 158, p. 196-212, 2005.
- 45 GERHARD, J. N.; NOHYNEK, R.; FLORENCE, F.; HERVE, T. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food Chemical Toxicology**, v. 42, p. 517-743, 2004.
- 46 TIMERBAEV, A. R. Recent trends in CE of inorganic ions: from individual to multiple elemental species analysis. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3420-3435, 2007.

- 47 XU, Q.; YIN, X. Y.; WU, S. Y.; WANG, M.; WEN, Z. Y.; GU, Z. Z. Determination of phthalate esters in water samples using Nylon6 nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. **Microchimica Acta**, v. 168, p. 267-275, 2010.
- 48 MALAYPPAN, B.; PALANIMASY, A.; JEVAN, R. G. J.; GANGA, R. β -Cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines. **Analytica Chimica Acta**, v. 509, p. 39-45, 2004.
- 49 YANG, J.; WANG, S.; LU, Z.; YANG, J.; LOU, S. Converter slag-coal cinder columns for the removal of phosphorous and other pollutants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 331-337, 2009.
- 50 NIEMAN, T. A. Analytical chemiluminescence in flowing streams: FIA and HPLC. In: BAEYENS, W. R. G.; KEUKELEIRE, D.; KORKIDIS, K. (Ed.). **Luminescence technique in chemical and biochemical analysis**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 523-565.
- 51 CUI, H.; HE, C.; ZHAO, G. Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 171-179, 1999.
- 52 GOLDSTEIN, S.; KOPF, A. A.; FEINLAND, R. Analysis of oxidation dyes by thin layer and gas chromatography. **Proceedings on the Joiat Conference on Cosmetic Sciences**. 5th ed. Washington, DC: Toilet Goods, 1968. p. 19-38.
- 53 CHOUDHARY, G. Gas-liquid chromatography determination of toxic diamines in permanent hair dyes. **Journal of Chromatography A**, v. 193, p. 277-284, 1980.
- 54 SCARPIA, C.; NINCI, F.; CENTINI, M. High-performance liquid chromatography determination of direct and temporary dyes in natural hair colorings. **Journal of Chromatography A**, v. 796, p. 319-325, 1998.
- 55 TURESKY, R. J.; FREEMAN, J. P.; HOLLAND, R. D.; NESTORICK, D. M.; MILLER, D. W.; RATNASINGHE, D. L.; KADLUBAR, F. F. Identification of aminobiphenyl derivatives in commercial hair dyes. **Chemical Research of Toxicology**, v. 16, p. 1162-1173, 2003.
- 56 LIN, C. E.; CHEN, Y. T.; WANG, T. Z. Separation of benzenediamines, benzenediols and aminophenols in oxidative hair dyes by micellar electrokinetic chromatography using cationic surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 241-252, 1999.
- 57 FANALI, S. Host-guest complexation in capillary isotachopheresis – II. Determination of aminophenol and diamminobenzene isomers in permanent hair colorants by using capillary isotachopheresis. **Journal of Chromatography A**, v. 470, p. 123-129, 1989.

- 58 SAINTHORANT, C.; MORIN, P. H.; DREUX, M.; BAUDRY, A.; GOETZ, N. Separation of phenylenediamine, phenol and aminophenol derivatives by micellar electrokinetic chromatography comparison of the role of anionic and cationic surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 717, p. 167-179, 1995.
- 59 WANG, L. H.; TSAI, S. J. Simultaneous determination of oxidative hair dye p-phenylenediamine and its metabolites in human and rabbit biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 312, p. 201-207, 2003.
- 60 DONG, S. Q.; ZHANG, S.; CHENG, X.; HE, P. G.; WANG, Q. J.; FANG, Y. Z. Simultaneous determination of sugars and ascorbic acid by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a carbon paste electrode modified with polyethylene glycol and Cu(2)O. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 327-333, 2007.
- 61 VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.
- 62 HARRIS, C. D. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- 63 HOLCAPEK, M.; JIRÁSKO, R.; LÍSA, M. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3908-3921, 2010.
- 64 SAQUIB, M.; MUNEER, M. Semiconductor mediated photocatalysed degradation of an anthraquinone dye, Remazol Brilliant Blue R under sunlight and artificial light source. **Dyes and Pigments**, v. 53, p. 237-249, 2002.