

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE INGREDIENTES COSMÉTICOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS

Amparo Salvador, Alberto Chisvert, Juan L. Benedé, Pablo Miralles, José Grau
Departamento de Química Analítica, Universitat de València

1. Introducción

Las técnicas de microextracción se han consolidado en el campo de la Química Analítica y actualmente desempeñan un papel fundamental en la determinación de compuestos a nivel de trazas. Por un lado, permiten la preconcentración de los analitos, disminuyendo así los límites de detección y posibilitando la determinación a los niveles requeridos, y por otro lado, permiten la separación de compuestos interferentes y que podrían comprometer la calidad de la determinación. Estos objetivos también pueden alcanzarse con las técnicas de extracción convencionales, sin embargo, las técnicas de microextracción presentan interesantes ventajas respecto a ellas, tales como la facilidad en el manejo y la reducción del consumo de disolventes, y por tanto de generación de residuos, al mismo tiempo que factores de preconcentración muy elevados. Todo ello ha dado lugar a que, desde la década de los 90 cuando aparecieron las primeras técnicas de microextracción hasta nuestros días, se hayan producido interesantes avances en este campo, desarrollándose nuevas técnicas y empleándose nuevos materiales, lo que en algunos casos ha sido de forma paralela.

Por otra parte, cabe destacar que la actual demanda social de los productos cosméticos en los países desarrollados ha llevado a la industria cosmética a alcanzar una posición de liderazgo dentro del sector industrial. Si bien los productos cosméticos no tienen las implicaciones sanitarias propias de los productos farmacéuticos, no debe obviarse que su uso es diario o muy frecuente. Es por ello que es necesario que este tipo de productos esté sometido a un control de la calidad y de la seguridad, y en este aspecto la Química Analítica y por ende las técnicas de microextracción juegan un papel fundamental, posibilitando la determinación de compuestos contaminantes, de degradación o de reacción que podrían encontrarse a nivel de trazas. Además, los ingredientes cosméticos pueden absorberse percutáneamente y penetrar en el cuerpo humano donde son metabolizados, bioacumulados y/o excretados, pudiendo provocar efectos nocivos para la salud incluso al nivel de trazas al que se encuentran. También existen evidencias de que los residuos de ingredientes cosméticos que llegan al medio acuático pueden afectar a la fauna y a la flora a pesar de encontrarse a nivel de trazas. En este sentido el **Grupo de Investigación para el Control Analítico de los Productos Cosméticos (GICAPC)** de la Universidad de Valencia centra su investigación en este campo, tal y como se ha comentado anteriormente [1].

En este artículo se describen las principales aportaciones del GICAPC relacionadas con el desarrollo de metodologías analíticas basadas en técnicas de microextracción para la determinación de ingredientes cosméticos en: i) productos cosméticos, ii) fluidos biológicos y iii) muestras de origen medioambiental.

2. Productos cosméticos

En este contexto, el GICAPC ha publicado diversos estudios en los que se emplean técnicas de microextracción en fase líquida.

En primer lugar se abordó la determinación de atranol y cloroatranol, dos compuestos potencialmente alergénicos que se encuentran en el extracto de ciertos musgos empleados como materia prima en la fabricación de perfumes, y cuyo contenido máximo permitido se encuentra restringido en el Reglamento (CE) No. 1223/2009 sobre productos cosméticos. Dado su interés, se desarrolló un método analítico para la determinación simultánea de atranol y cloroatranol a nivel de trazas en perfumes, empleando la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [2].

Siguiendo con el estudio de sustancias cuyos niveles máximos se encuentran restringidos, se desarrolló una metodología analítica para la determinación de bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), un conservante comúnmente utilizado en los productos cosméticos que puede actuar como agente nitrosante y dar lugar a la formación de nitrosaminas. Se empleó una semi-microextracción por emulsificación asistida por agitación con vórtex (VAEsME) seguida de cromatografía de líquidos con detección UV/Vis (LC-UV/Vis) [3]. Esta técnica de extracción se propuso como una forma sencilla de combinar la preparación de la muestra y la extracción del analito en una sola etapa, facilitando la labor del operador y reduciendo tanto el tiempo como el coste del análisis.

En un posterior estudio, el GICAPC abordó el desarrollo de una metodología para la determinación de los llamados conservantes alternativos, esto es, compuestos no catalogados como conservantes según el Reglamento 1223/2009 pero que tienen dicha función y que la industria cosmética puede emplear sin ninguna restricción incluso indicando en la etiqueta 'sin conservantes' como estrategia publicitaria. De este modo se pudo llevar a cabo por primera vez la determinación de alcohol fenético, metilpropanodiol, fenilpropanol, caprilil glicol y etilhexilglicerina realizando una reacción de derivatización que permitiera introducir grupos cromóforos en los

compuestos de interés seguida de una semi-microextracción líquido-líquido asistida por agitación vórtex (VALLsME) y LC-UV/Vis [4].

Por otro lado, resaltar que las nitrosaminas son una familia de compuestos que presentan actividad mutagénica, teratogénica y carcinogénica, por lo que su presencia en los productos cosméticos está prohibida. Sin embargo, la combinación de agentes nitrosantes, como por ejemplo el bronopol anteriormente mencionado, con aminos puede dar lugar a su formación. En este sentido, se propuso un procedimiento analítico para la determinación de trazas de N-nitrosodietanolamina (NDELA), la nitrosamina más comúnmente detectada en los productos cosméticos, empleando microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) en fase reversa (RP-DLLME) seguida de LC-UV/Vis con derivatización post-columna [5]. La RP-DLLME constituye una técnica de microextracción útil para la preconcentración y purificación de analitos polares presentes a nivel de trazas en matrices orgánicas, como son las muestras cosméticas.

De forma similar se aplicó la RP-DLLME a la determinación de trazas de formaldehído. El formaldehído es un conservante tradicionalmente utilizado en la industria cosmética cuyo contenido máximo se encuentra restringido según el mencionado Reglamento 1223/2009, pero actualmente no se emplea como tal dado que se ha evidenciado que presenta una alta incidencia de dermatitis de contacto y no presenta un buen reclamo publicitario de cara al consumidor. No obstante, se emplean otros conservantes que actúan liberando formaldehído lentamente. En este sentido, se desarrolló una metodología analítica para la determinación de trazas de formaldehído en productos cosméticos que contenían alguno de los conocidos como conservantes donadores de formaldehído [6].

Finalmente, aprovechando el potencial de la RP-DLLME para la extracción de compuestos polares en el pretratamiento de muestras cosméticas, y dado que se ha constatado que los productos cosméticos pueden contener otras nitrosaminas además de NDELA, se ha profundizado en este campo y se ha desarrollado un método analítico para la determinación de trazas de seis nitrosaminas polares (N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosoetilmetilamina (NMEA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosopirrolidina (NPYR), N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosomorfolina (NMOR)) además de NDELA. En este caso se ha empleado la RP-DLLME asistida por agitación con vórtex (VA-RP-DLLME) seguida de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) [7].

3. Fluidos biológicos

En lo que a la determinación de ingredientes cosméticos en fluidos biológicos se refiere, cabe destacar dos aportaciones del GICAPC a estudios *in vivo* sobre permeabilidad cutánea de dos ingredientes cosméticos. Uno de ellos es la 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (HMB),

un filtro UV conocido como benzofenona-3, ampliamente utilizado en los productos cosméticos. Mediante el empleo de DLLME seguida de LC-MS se ha podido desarrollar una metodología analítica para su determinación en suero sanguíneo tras la aplicación tópica de cremas solares [8]. Además, se ha posibilitado la determinación de sus metabolitos, 2,4-dihydroxibenzona (DHB) y 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (DHMB), y así la posibilidad de estudiar su cinética de absorción cutánea y transformación.

Actualmente se está llevando a cabo la determinación de trifenilfosfato, un retardante de llama ampliamente empleado en los esmaltes de uñas. Su determinación tiene especial interés ya que se ha demostrado que se comporta como disruptor endocrino. El método se está aplicando a muestras de orina de usuarios de este tipo de productos cosméticos, y también considera la determinación de su metabolito principal, el difenilfosfato. Para ello se emplea una novedosa técnica de microextracción denominada microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME) y desarrollada por el GICAPC (véase más abajo) seguida de LC-MS. En este último trabajo también se estudian diferentes estrategias de síntesis del material composite de naturaleza magnética empleado como sorbente para conseguir una máxima magnetización en el menor tiempo de síntesis posible [9].

4. Muestras de origen medioambiental

En lo que respecta al desarrollo de métodos analíticos para la determinación de ingredientes cosméticos en el medio ambiente, son varias las técnicas de microextracción que se han empleado con este propósito, siendo algunas de ellas desarrolladas por el propio GICAPC.

Aprovechando el gran potencial de la DLLME nuestro grupo ha propuesto el uso de esta técnica para la determinación de benzofenonas hidroxiladas empleadas como filtros UV [10], y más tarde se aplicó a la determinación de una serie más amplia de filtros UV [11] en muestras de agua de diferente naturaleza. Resaltar que en este último caso se llevó a cabo por primera vez una estrategia que posibilitó la determinación del contenido total de filtros UV, esto es, tanto el presente en la fracción soluble como el de la fracción de la materia particulada, es decir, aquella adherida a las partículas en suspensión. De este modo, el método propuesto es útil para la vigilancia medioambiental ya que se determina el contenido total. De no ser así, los resultados podrían estar sesgados, como ocurre en la mayoría de los artículos publicados en los que suele obviarse la fracción de la materia particulada. Prosiguiendo con esta línea, más tarde se llevó a cabo la determinación de filtros UV en muestras de arena de playa mediante lixiviación de los compuestos empleando agitación por vórtex, seguida de DLLME [12]. La técnica de DLLME también se aplicó a la determinación de almizcles sintéticos empleados en la industria del perfume [13] y que, al igual que los filtros UV, presentan un gran impacto ecológico.

Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado y presentado una nueva estrategia de microextracción basada en la formación *in situ* de la fase de extracción mediante la asociación de dos contraiones cargados opuestamente, formándose un agregado supramolecular como medio de extracción de compuestos orgánicos en disoluciones acuosas. En esta nueva técnica de microextracción, que hemos denominado *microextracción sobre agregado formado in situ (iSAME)* [14], el agregado formado conteniendo los analitos se recoge en forma de una fina película en la superficie de un papel de filtro común por simple filtración a vacío. A continuación, debido a la baja estabilidad de los agregados surfactantes en disolventes orgánicos, la fase extractante se disuelve en un pequeño volumen de disolvente, de modo que los analitos son liberados cuantitativamente y se lleva a cabo su determinación directa mediante un sistema cromatográfico. Como demostración analítica de esta nueva técnica se determinaron ocho filtros UV orgánicos en muestras de agua de diferente naturaleza.

Con el fin de contribuir al desarrollo de nuevas estrategias analíticas, nuestro grupo de investigación ha desarrollado otras dos nuevas técnicas de microextracción basadas en la dispersión de materiales magnéticos recubriendo barras agitadoras. La primera de ellas, a la que denominamos *microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME)* [15], combina los principios y ventajas de la extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE) y la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE). Esta técnica consiste en el uso de una barra agitadora de neodimio recubierta inicialmente con el material magnético. A baja velocidad de agitación el material se mantiene retenido en el imán y la extracción se lleva a cabo de manera similar a la realizada por SBSE, mientras que a mayor velocidad el material se dispersa en la disolución acuosa tal como ocurre en DSPE. En este último caso, una vez se detiene la agitación, el fuerte campo magnético del imán permite recuperar el material magnético dispersado, sin necesidad de un campo magnético externo. A continuación, puede llevarse a cabo la desorción líquida o la desorción térmica de los analitos. Esta técnica se ha aplicado satisfactoriamente en la determinación de filtros UV orgánicos de naturaleza lipofílica en muestras de agua de origen medioambiental, empleando nanopartículas magnéticas (MNPs) de hierro y cobalto recubiertas de ácido oléico como material sorbente ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@$ ácido oleico) [15,16]. Posteriormente, también se ha demostrado la versatilidad de la técnica, aplicándola a la determinación de filtros UV de naturaleza hidrofílica [17], empleando en este caso un composite magnético formado por la combinación de nanopartículas de hierro y cobalto recubiertas de sílice combinadas con el polímero nylon ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@$ SiO₂-nylon 6). Igualmente se ha aplicado con éxito a otro tipo de matrices, como arena de playa, demostrando así su aplicabilidad en muestras sólidas [18]. De manera similar a esta técnica, hemos optado por emplear líquidos iónicos magnéticos (MILs) como fase de

extracción, en lugar de MNPs. Dado que en este caso la fase extractante es de naturaleza líquida, hemos denominado a esta técnica *microextracción líquido dispersiva sobre barra agitadora (SBDLME)* [19]. En cuanto a las aplicaciones de la SBDLME, se ha demostrado su utilidad analítica y versatilidad en la determinación de filtros UV de naturaleza lipofílica [19] y en la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos [20] en muestras de agua de origen medioambiental.

Bibliografía

- [1] GIR: Grupo de Investigación para el Control Analítico de los Productos Cosméticos (GICAPC), Universidad de Valencia, *Actualidad Analítica*, 61 (2018) 46-47
- [2] M. López-Nogueroles, A. Chisvert, A. Salvador, *Anal. Chim. Acta* 826 (2014) 28-34.
- [3] P. Miralles, R. Bellver, A. Chisvert, A. Salvador, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 1929-1934.
- [4] P. Miralles, I. Vrovaki, A. Chisvert, A. Salvador, *Talanta* 154 (2016) 1-6.
- [5] A. Chisvert, J.L. Benedé, M. Peiró, I. Pedrón, A. Salvador, *Talanta* 166 (2017) 81-86.
- [6] P. Miralles, A. Chisvert, M.J. Alonso, S. Hernandorena, A. Salvador, (2018) en prensa.
- [7] P. Miralles, A. Chisvert, A. Salvador, (2018) en proceso de revisión por pares.
- [8] I. Tarazona, A. Chisvert, A. Salvador, *Talanta* 116 (2013) 388-395.
- [9] J. Grau, J.L. Benedé, A. Chisvert, J. Serrano, A. Salvador, en realización.
- [10] I. Tarazona, A. Chisvert, Z. León, A. Salvador, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4771-4778.
- [11] J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, D. Sánchez-Quiles, A. Tovar-Sánchez, *Anal. Chim. Acta* 812 (2014) 50-58.
- [12] I. Tarazona, A. Chisvert, A. Salvador, *Anal. Methods* 6 (2014) 7772-7780.
- [13] M. López-Nogueroles, A. Chisvert, A. Salvador, A. Carretero, *Talanta* 85 (2011) 1990-1995.
- [14] J.L. Benedé, D.L. Giokas, A. Chisvert, A. Salvador, *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 63-71.
- [15] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25-33.
- [16] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, *Talanta* 147 (2016) 246-252.
- [17] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, *Anal. Chim. Acta* 926 (2016) 63-71.
- [18] J.L. Benedé, C. Moyano, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, en proceso de revisión por pares.
- [19] A. Chisvert, J.L. Benedé, J.L. Anderson, S.A. Pierson, A. Salvador, *Anal. Chim. Acta* 983 (2017) 130-140.
- [20] J.L. Benedé, J.L. Anderson, A. Chisvert, *Talanta* 176 (2018) 253-261.