

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE INTERÉS
RELACIONADAS CON LA EFICACIA Y LA SEGURIDAD DE LOS
PRODUCTOS COSMÉTICOS**

Memoria presentada por Pablo Antonio Miralles Ibarra
para la obtención del título de Doctor

Programa de Doctorado: 3154 Química

Septiembre 2019

Directores:
Amparo Salvador Carreño
Alberto Chisvert Sanía

La Dra. Amparo Salvador Carreño y el Dr. Alberto Chisvert Sanía, ambos Catedráticos de Universidad pertenecientes al Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral presentada por Pablo Antonio Miralles Ibarra, con el título ***“Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de sustancias de interés relacionadas con la eficacia y la seguridad de los productos cosméticos”***.

CERTIFICAN,

Que la citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universitat de València y que han dirigido y supervisado los distintos aspectos del presente trabajo, así como su redacción.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 24 de septiembre de 2019.

Dra. Amparo Salvador Carreño

Dr. Alberto Chisvert Sanía

AGRADECIMIENTOS

Aunque estas líneas sean las primeras en leerse, con ellas concluyo la redacción de mi Tesis Doctoral y no me queda más que agradecer por ello a todas las personas que lo han hecho posible.

En primer lugar, a Amparo y a Alberto, mis directores, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar con vosotros todos estos años y por haberme guiado desde el primer momento en el camino científico y profesional que me ha llevado hasta aquí.

A Marina, a Isuha y, especialmente, a JuanLu, gracias por haberme recibido en el Laboratorio 11 con los brazos abiertos y por haberme enseñado mucho del día a día en el grupo de investigación. Por supuesto, también a Pepe, a Lori, a Víctor, a Cristian, a Laura y al resto de compañeros del GICAPC, gracias por los buenos momentos que hemos compartido.

A Raquel, a Ilianna, a María José, a Aylén y a Iris, gracias por vuestra ayuda en el laboratorio y por haber contribuido con vuestro trabajo a la realización de esta Tesis Doctoral.

Al resto de compañeros y a todo el personal del Departamento de Química Analítica, especialmente a Javier, gracias por facilitar y hacer posible mi trabajo.

A mis padres y a mi hermana, gracias por hacerme ser quien soy.

A Sonia, gracias por estar a mi lado desde el principio y por seguir apoyándome cada día.

Finalmente, gracias al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la ayuda predoctoral concedida.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN	5
Capítulo 1. Sobre los productos cosméticos	7
1.1. Definición y marco legal	9
1.2. Ingredientes cosméticos. Sustancias prohibidas y restringidas	11
1.2.1. <i>Ingredientes activos</i>	13
1.2.2. <i>Conservantes</i>	14
1.2.3. <i>Sustancias prohibidas</i>	18
1.3. Análisis de los productos cosméticos	21
1.3.1. <i>Características deseables de un método analítico para el análisis de productos cosméticos</i>	22
1.3.2. <i>Métodos analíticos de referencia</i>	23
1.3.3. <i>Métodos en la bibliografía analítica</i>	29
1.3.4. <i>Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de las sustancias objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral</i>	30
Capítulo 2. Técnicas de (micro)extracción empleadas en la presente Tesis Doctoral	37
2.1. Consideraciones iniciales	39
2.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva	41
2.3. Semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice.....	43
2.4. Microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora	47
Bibliografía	51
SECCIÓN II. RESUMEN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES	73
Capítulo 3. Determinación de hidroxitirosol y tirosol mediante lixiviación o semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice y cromatografía de líquidos para el control analítico de los productos cosméticos basados en extractos procedentes de la oliva	75

<i>Anexo 3.1. Protocolo de elaboración de la formulación cosmética empleada en este capítulo</i>	91
Capítulo 4. Determinación de bronopol en productos cosméticos mediante semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice y cromatografía de líquidos	95
<i>Anexo 4.1. Protocolo de elaboración de la formulación cosmética empleada en este capítulo</i>	107
Capítulo 5. Determinación de formaldehído libre en productos cosméticos que contienen conservantes dadores de formaldehído mediante microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa y cromatografía de líquidos con derivatización post-columna.....	111
Capítulo 6. Determinación de hidroxietoxifenil butanona en productos cosméticos mediante lixiviación asistida por ultrasonidos y cromatografía de líquidos	125
<i>Anexo 6.1. Protocolo de elaboración de la formulación cosmética empleada en este capítulo</i>	135
Capítulo 7. Determinación de conservantes alternativos en productos cosméticos mediante derivatización seguida de semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice y cromatografía de líquidos.....	139
Capítulo 8. Determinación de disruptores endocrinos fenólicos en productos cosméticos y materias primas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas	155
Capítulo 9. Determinación de nitrosaminas en productos cosméticos mediante microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa asistida por vórtice y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas	167
Capítulo 10. Determinación de nitrosaminas en productos cosméticos mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem	181
CONCLUSIONES FINALES	207
LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS	213

ANEXO. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN LA TESIS DOCTORAL..... 219

Determination of hydroxytyrosol and tirosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts

Vortex-assisted emulsification semimicroextraction for the analytical control of restricted ingredients in cosmetic products: determination of bronopol by liquid chromatography

Determination of free formaldehyde in cosmetics containing formaldehyde-releasing preservatives by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with post-column derivatization

A green and rapid analytical method for the determination of hydroxyethoxyphenyl butanone in cosmetic products by liquid chromatography

Determination of alternative preservatives in cosmetic products by chromophoric derivatization followed by vortex-assisted liquid-liquid semimicroextraction and liquid chromatography

Determination of phenolic endocrine disruptors in cosmetics by high-performance liquid chromatography mass spectrometry

Determination of N-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with mass spectrometry

Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-metal organic framework composite: determination of N-nitrosamines in cosmetic products

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado y validado nuevos métodos analíticos para la determinación de sustancias de interés en el sector cosmético, con el fin de contribuir al estudio de la eficacia y la seguridad de los productos cosméticos, dentro del marco del Proyecto de Investigación CTQ2015-70301R titulado “*Avances en la seguridad de los productos cosméticos: nuevos métodos analíticos para la detección de sustancias peligrosas y el estudio de permeabilidad cutánea de ingredientes*”. En este sentido, se han propuesto nuevas metodologías que contribuyan a cubrir las necesidades y expectativas del vigente *Reglamento Europeo (CE) n.º 1223/2009 sobre los productos cosméticos* en relación al control analítico de ingredientes cosméticos, especialmente aquellos prohibidos y restringidos.

La Tesis Doctoral se ha estructurado en diez capítulos agrupados en dos secciones:

La Sección I, que consta de los *Capítulos 1 y 2*, corresponde a la **Introducción**, en la que se describen algunos conceptos fundamentales sobre los productos cosméticos y su legislación, así como las principales metodologías analíticas utilizadas para su control.

- En el *Capítulo 1*, dedicado a los productos cosméticos, se exponen brevemente el marco legal y los antecedentes más relevantes sobre las sustancias objeto de estudio, así como consideraciones sobre el control analítico de los productos cosméticos en base a su eficacia, seguridad y calidad y concretamente sobre la determinación de las sustancias objeto de estudio.
- En el *Capítulo 2* se describen las principales técnicas de (micro)extracción empleadas en la presente Tesis Doctoral.

La Sección II, que consta de los *Capítulos 3 a 10*, corresponde al **Resumen de los resultados experimentales** obtenidos durante el desarrollo de la Tesis Doctoral.

- En el *Capítulo 3* se describe un método analítico para la determinación de hidroxitirosol y tirosol, dos ingredientes activos con propiedades antioxidantes, en extractos procedentes de la oliva y en productos cosméticos fabricados a partir de ellos.
- En el *Capítulo 4* se describe una estrategia para la preparación rápida de muestras cosméticas basada en una semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice, aplicándose a la

determinación de bronopol en productos cosméticos, un conservante de uso restringido en este tipo de productos.

- En el *Capítulo 5* se describe un método analítico para la determinación de formaldehído libre en productos cosméticos que contienen conservantes dadores de formaldehído, empleando microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa como estrategia de preconcentración.
- En el *Capítulo 6* se describe un método analítico para la determinación de hidroxietoxifenil butanona en productos cosméticos, un conservante alternativo (no regulado) sobre el que existe publicado un informe relativo a su seguridad.
- En el *Capítulo 7* se describe un método analítico para la determinación de cinco conservantes alternativos en productos cosméticos, basado en una derivatización y una semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice.
- En el *Capítulo 8* se describe un método analítico para la determinación de cuatro disruptores endocrinos de la familia de los alquilfenoles, dos de ellos prohibidos, en productos cosméticos y materias primas.
- En el *Capítulo 9* se describe un método analítico para la determinación de siete nitrosaminas, compuestos altamente cancerígenos, en productos cosméticos, basado en microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa asistida por vórtice.
- En el *Capítulo 10* se describe un método analítico basado en la técnica de microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora, propuesta por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, y se aplica a la determinación de ocho nitrosaminas en productos cosméticos.

Por último, se presentan las **Conclusiones finales** de esta Tesis Doctoral y, como **Anexo**, se incluyen las publicaciones científicas a las que ha dado lugar.

SECCIÓN I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

SOBRE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS

1.1. DEFINICIÓN Y MARCO LEGAL

Según el actual **Reglamento (CE) n.º 1223/2009 sobre los productos cosméticos** [1] (en adelante, Reglamento Europeo), un producto cosmético es *“toda aquella sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales”*. Atendiendo a esta definición, entre los productos cosméticos se incluyen:

- cremas, emulsiones, lociones, geles y aceites para la piel;
- mascarillas de belleza;
- maquillajes de fondo (líquidos, pastas, polvos), polvos de maquillaje;
- polvos para aplicar después del baño, polvos para la higiene corporal;
- jabones de tocador, jabones desodorantes;
- perfumes, aguas de tocador y agua de colonia;
- preparados para baño y ducha (sales, espumas, aceites, geles);
- depilatorios;
- desodorantes y antitranspirantes;
- productos para el cabello: colorantes, productos para la ondulación, alisado y fijación, productos para marcado, limpieza (lociones, polvos, champús), mantenimiento (lociones, cremas, aceites) y peinado (lociones, lacas, brillantinas);
- productos para el afeitado (jabones, espumas, lociones);
- maquillaje y productos para desmaquillar;
- productos destinados a aplicarse en los labios;
- productos para cuidados bucales y dentales;
- productos para el cuidado y maquillaje de las uñas;
- productos de higiene íntima externa;
- productos para el sol, para el bronceado sin sol;
- productos para el blanqueo de la piel; y
- productos antiarrugas, entre otros.

El Reglamento Europeo se publicó en 2009 y, tras una moratoria de cuatro años, entró en vigor el 11 de julio de 2013, sustituyendo a la anterior *Directiva 76/768/CEE* de 1976 en materia de productos cosméticos [2] que había sido modificada de forma sustancial en numerosas ocasiones entre

1979 y 2012. Así pues, el Reglamento Europeo pasó a constituir el marco legal armonizado de aplicación en todos los Estados miembros de la Unión Europea, estableciendo normas claras y detalladas con el objetivo de simplificar los procedimientos, racionalizar la terminología y reforzar el marco regulador de los productos cosméticos, como el control en el mercado, con el fin de garantizar la seguridad de los consumidores. De hecho, una de las normas fundamentales que se establecen en el Reglamento Europeo es que los productos cosméticos disponibles en el mercado deben ser seguros para la salud humana en las condiciones de utilización normales o razonablemente previsibles, teniendo en cuenta su presentación, etiquetado, instrucciones de uso y eliminación, y cualquier otra indicación o información proporcionada por el fabricante.

Por este motivo, el Reglamento Europeo incluye una serie de prohibiciones y restricciones respecto al uso de las sustancias que pueden formar parte de la composición de un producto cosmético, dependiendo del tipo de producto y su forma de aplicación. En este sentido, los productos cosméticos se pueden clasificar en grupos con diferentes consideraciones de seguridad:

- producto que se aclara: aquel destinado a ser eliminado tras su aplicación en la piel, el pelo o las mucosas;
- producto que no se aclara: aquel destinado a permanecer en contacto prolongado con la piel, el pelo o las mucosas;
- producto para el pelo: aquel destinado a aplicarse en el cabello o en el vello facial, con la excepción de las pestañas;
- producto para la piel: aquel destinado a aplicarse en la piel;
- producto labial: aquel destinado a aplicarse en los labios;
- producto facial: aquel destinado a aplicarse en la piel de la cara;
- producto para las uñas: aquel destinado a aplicarse en las uñas;
- producto bucal: aquel destinado a aplicarse en los dientes o en las mucosas bucales;
- producto aplicado en las mucosas: aquel destinado a aplicarse en las mucosas bucales, en el borde de los ojos, o de los órganos genitales externos;
- producto para los ojos: aquel destinado a aplicarse cerca de los ojos; y
- producto de uso profesional: la aplicación y la utilización del mismo se lleva a cabo por personas en el ejercicio de su actividad profesional.

La Comisión Europea, en su *Decisión 2008/721/CE* de 2008 [3], actualizó y mejoró la estructura y los procedimientos de trabajo de un conjunto de comités científicos y expertos en el ámbito de la seguridad de los consumidores, la salud pública y el medio ambiente previamente establecidos. Entre estos comités, el **Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (CCSC)** [4] *“emitirá dictámenes sobre cuestiones relativas a todos los tipos de riesgo para la salud y la seguridad (en particular riesgos químicos, biológicos, mecánicos y de otro tipo) de productos de consumo no alimentarios (por ejemplo, productos cosméticos y sus ingredientes, juguetes, productos textiles, productos de confección, productos para el cuidado personal y productos domésticos, como por ejemplo los detergentes, etc.) y servicios (por ejemplo, tatuajes, bronceado artificial, etc.)”*. De esta forma, el CCSC deberá evaluar e informar sobre los riesgos asociados al uso de ciertas sustancias en los productos cosméticos y, en consecuencia, el Reglamento Europeo podrá ser modificado por la Comisión Europea para velar por un alto nivel de seguridad para los consumidores, introduciendo nuevas prohibiciones, restricciones, enmiendas y correcciones en caso necesario.

1.2. INGREDIENTES COSMÉTICOS. SUSTANCIAS PROHIBIDAS Y RESTRINGIDAS

El Reglamento Europeo define los ingredientes cosméticos como *“cualquier sustancia o mezcla que se utiliza intencionalmente en el producto cosmético durante el proceso de fabricación”*, pero no se consideran ingredientes las impurezas contenidas en las materias primas utilizadas ni las sustancias técnicas subsidiarias utilizadas durante la fabricación que no se encuentren en el producto acabado. Así, los productos cosméticos presentan generalmente formulaciones complejas compuestas por una variedad de ingredientes que desempeñan diferentes funciones, incluyendo ingredientes activos, excipientes o vehículos y aditivos, para cumplir con el efecto deseado y para que su aplicación no suponga un riesgo para la salud de los consumidores.

El denominado **Inventario de Ingredientes Cosméticos** [5,6] incluye un extenso listado de sustancias utilizadas como ingredientes cosméticos y recoge su información más relevante, por ejemplo, la nomenclatura INCI (del inglés, *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) que se emplea

como nombre común a efectos de etiquetado, el número CAS (del inglés, *Chemical Abstracts Service*), las restricciones aplicables y la función habitual que desempeñan en los productos cosméticos, entre otros. Sin embargo, merece la pena destacar que este listado tiene un carácter indicativo y no constituye una lista de sustancias autorizadas para su uso en productos cosméticos; del mismo modo, la no aparición de una determinada sustancia no implica que no pueda ser utilizada como ingrediente, siempre y cuando no se establezca lo contrario en el Reglamento Europeo.

Por otra parte, el Reglamento Europeo establece ciertas prohibiciones y restricciones al uso de determinadas sustancias como ingredientes cosméticos para garantizar la seguridad de los consumidores. Estas sustancias se presentan en el Reglamento Europeo en una serie de listados, en forma de *Anexos*, de modo que hasta la fecha:

- El *Anexo II* incluye una lista con 1379 sustancias prohibidas en los productos cosméticos.
- El *Anexo III* incluye una lista con 297 sustancias que no podrán contener los productos cosméticos salvo que se cumplan las restricciones de uso establecidas en cada caso atendiendo al tipo de producto, partes del cuerpo donde se aplica, concentración máxima en el producto preparado para el uso, otras restricciones, condiciones de empleo y advertencias.
- El *Anexo IV* incluye una lista con los 153 colorantes admitidos en los productos cosméticos y establece las restricciones de uso aplicables en cada caso.
- El *Anexo V* incluye una lista con los 57 conservantes admitidos en los productos cosméticos y establece las restricciones de uso aplicables en cada caso.
- El *Anexo VI* incluye una lista con los 28 filtros ultravioleta admitidos en los productos cosméticos y establece las restricciones de uso aplicables en cada caso.

Por tanto, solo existen listados de ingredientes autorizados para colorantes (*Anexo IV*), conservantes (*Anexo V*) y filtros ultravioleta (*Anexo VI*), no pudiéndose utilizar con la finalidad de colorear, conservar o proteger de la radiación solar, respectivamente, otras sustancias no incluidas en estos listados. Además, las sustancias incluidas en dichos listados deben utilizarse

bajo las restricciones de uso allí establecidas. En lo que se refiere al resto de ingredientes, podrán utilizarse todos aquellos que no estén incluidos en el listado de sustancias prohibidas (*Anexo II*), teniendo en cuenta únicamente que los ingredientes restringidos (*Anexo III*) deben cumplir con las restricciones establecidas. Cabe destacar que estas listas no son definitivas, sino que pueden ser actualizadas por la Comisión Europea en caso necesario como respuesta a la información proporcionada por el CCSC en relación a nuevos avances técnicos y/o a nuevas consideraciones acerca del efecto de una determinada sustancia sobre la seguridad de los productos cosméticos.

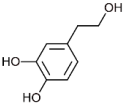
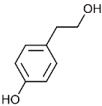
1.2.1. Ingredientes activos

Según el Comité de Expertos en Productos Cosméticos del Consejo de Europa, los ingredientes activos son *“aquellas sustancias empleadas en los productos cosméticos con el objetivo de conferir a éste propiedades cosméticas específicas. Algunos de estos ingredientes activos pueden presentar efectos farmacológicos y/o toxicidad bajo ciertas condiciones de uso”* [7]. En esta definición se incluyen las sustancias encargadas de realizar la función para la cual el producto cosmético ha sido diseñado, en analogía con los principios activos de los productos farmacéuticos. Además, en los últimos años han ganado popularidad los productos cosméticos basados en ingredientes activos naturales, como los obtenidos a partir de extractos vegetales. Aunque algunas sustancias procedentes de las plantas están prohibidas por el Reglamento Europeo, el número de productos naturales no regulados que pueden utilizarse como ingredientes cosméticos es realmente inmenso.

En relación al objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, un ejemplo de ingredientes activos naturales procedentes de extractos vegetales son el hidroxitiroso (2-(3,4-dihidroxifenil)etanol) y el tiroso (2-(4-hidroxifenil)etanol), cuya información más relevante se muestra en la *Tabla 1.1*. Estos compuestos fenólicos, presentes en las raíces, tallos y hojas del olivo (*Olea europaea*), en sus frutos (las olivas) y, por tanto, en el aceite de oliva [8-11], presentan actividad antimicrobiana [12,13], antiinflamatoria [14] e incluso hay estudios que los relacionan con la prevención del cáncer [15], pero especialmente son conocidos por su actividad antioxidante [16,17]. Por este motivo se incorporan como ingredientes activos en productos cosméticos mediante el uso de diferentes extractos procedentes de la oliva. Además, según el Inventario de Ingredientes Cosméticos, el

hidroxitirosol presenta funciones de blanqueante y acondicionador de la piel. Estos compuestos no están incluidos en ningún listado del Reglamento Europeo y son las sustancias objeto de estudio del Capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral.

Tabla 1.1. Información sobre los compuestos estudiados en el *Capítulo 3*.

Nombre	Estructura química	Número CAS	M_r (g mol ⁻¹)	pK _a ^a	log K _{o/w} ^a
Hidroxitirosol		10597-60-1	154.16	9.72	0.12
Tirosol		501-94-0	138.16	10.17	0.85

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

1.2.2. Conservantes

El Reglamento Europeo define los conservantes como “*las sustancias cuya finalidad exclusiva o principal sea inhibir el desarrollo de microorganismos en el producto cosmético*”. Por tanto, su función es prevenir la aparición de microorganismos que puedan alterar las propiedades y características del producto cosmético antes de la fecha de duración mínima o sin haberse cumplido el plazo de uso después de la apertura, es decir, el lapso de tiempo durante el cual el producto cosmético debe ser seguro y seguir cumpliendo su función inicial [18,19]. Como se ha indicado anteriormente, el *Anexo V* del Reglamento Europeo contiene un listado con 57 conservantes actualmente autorizados para su uso en productos cosméticos, estableciéndose ciertas restricciones, como la concentración máxima permitida dependiendo del tipo de producto y su aplicación.

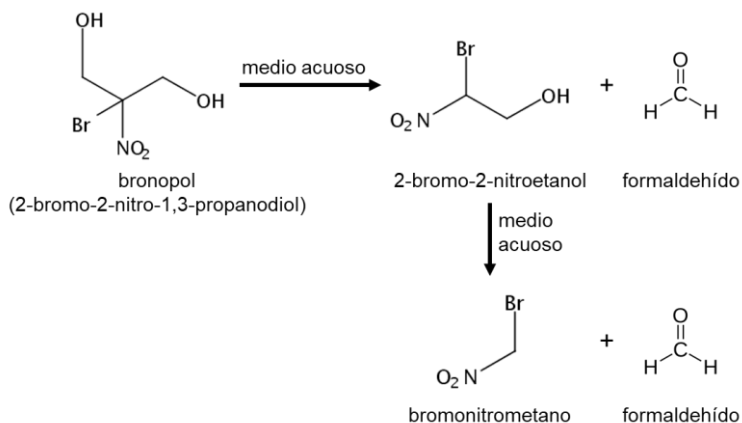
En los Capítulos 4 y 5 de la presente Tesis Doctoral se estudian dos conservantes autorizados incluidos en el *Anexo V* del Reglamento Europeo, bronopol y formaldehído, respectivamente, cuya información se recoge en la *Tabla 1.2*.

Tabla 1.2. Información sobre los compuestos estudiados en los *Capítulos 4 y 5*.

Nombre	Estructura química	Número CAS	M_r (g mol ⁻¹)	pK _a ^a	log K _{o/w} ^a
Bronopol		52-51-7	199.99	12.02	1.15
Formaldehído		50-00-0	30.03	13.27	0.35

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

El bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) es un conservante muy empleado en los productos cosméticos por su gran efectividad antimicrobiana [20,21], especialmente tras la prohibición en 2014 de algunos parabenos por la Comisión Europea [22]. Sin embargo, el bronopol puede descomponerse en medio acuoso, bajo ciertas condiciones, liberando formaldehído y otras sustancias en sucesivas reacciones de descomposición [23-25] (ver *Figura 1.1*) que pueden reaccionar con aminas secundarias para formar nitrosaminas, que son una conocida familia de compuestos prohibidos por su carácter cancerígeno [26]. Por ello, el Reglamento Europeo establece para el bronopol una concentración máxima permitida del 0.1 % en el producto cosmético acabado, y se indica que debe evitarse la formación de nitrosaminas, por lo que es necesario llevar a cabo su control analítico en los productos cosméticos.

**Figura 1.1.** Productos de la descomposición del bronopol.

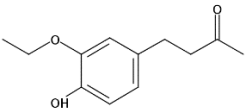
Por otro lado, el formaldehído es un conservante que se ha empleado tradicionalmente en los productos cosméticos durante muchos años. Éste se encuentra regulado por el Reglamento Europeo (*Anexo V*) con una concentración máxima autorizada del 0.1 % de formaldehído libre en productos bucales y del 0.2 % para el resto de productos. Además, no está permitido su uso en aerosol y todos los productos acabados que contengan formaldehído o conservantes que liberen formaldehído deberán indicar en su etiqueta que “contiene formaldehído” siempre que la concentración de formaldehído en el producto acabado supere el 0.05 %. Sin embargo, el formaldehído como tal ya no se utiliza habitualmente en los cosméticos [27], ya que se ha observado una alta incidencia de dermatitis de contacto asociada a su uso [28-30]. Por este motivo, los fabricantes prefieren utilizar otros conservantes, denominados dadores de formaldehído, que actúan liberando formaldehído lentamente en el producto cosmético por hidrólisis (*Figura 1.1*), como son quaternium-15, imidazolidinil urea, diazolidinil urea, DMDM hidantoína y bronopol, entre otros, aunque lo cierto es que éstos también han sido relacionados con dermatitis de contacto [27-30]. En este sentido, la determinación de formaldehído libre en productos cosméticos que contienen conservantes dadores de formaldehído es necesaria para garantizar la seguridad de los consumidores y el cumplimiento de la legislación vigente.

Durante los últimos años, la industria cosmética está continuamente buscando nuevas sustancias que puedan ejercer la función conservante de una manera efectiva y segura. De hecho, ciertos ingredientes con alguna otra función manifiesta pueden actuar también como conservantes, evitando adicionar alguno de los conservantes listados en el *Anexo V* del Reglamento Europeo, dando lugar a lo que la industria denomina productos cosméticos “libres de conservantes” o “auto-conservantes”. Estas sustancias se conocen como *conservantes alternativos* y hasta el momento no se encuentran incluidas en el *Anexo V* del Reglamento Europeo y, por tanto, su uso no está regulado [31-33].

En el Capítulo 6 de la presente Tesis Doctoral se estudia un conservante alternativo, la hidroxietoxifenil butanona (HEPB, del inglés *hydroxyethoxyphenyl butanone*), cuya información más relevante se muestra en la *Tabla 1.3*. Según el mencionado Inventario de Ingredientes Cosméticos, la HEPB se emplea como acondicionador de la piel y recientemente se ha añadido su función como conservante. En efecto, en base a las conclusiones

de un informe emitido por el CCSC en 2017 [34], la HEPB podría emplearse como conservante en productos cosméticos en concentraciones inferiores al 0.7 %, debido a su posible toxicidad por exposición repetida o prolongada [34]. En consecuencia, es de esperar que próximamente se incluya en el *Anexo V* del Reglamento Europeo, con el objetivo de restringir su concentración máxima autorizada.

Tabla 1.3. Información sobre el compuesto estudiado en el *Capítulo 6*.

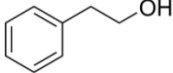
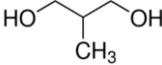
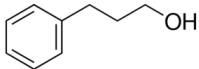
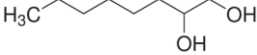
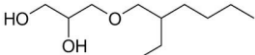
Nombre ^a	Estructura química	Número CAS	M _r (g mol ⁻¹)	pK _a ^b	log K _{o/w} ^b
HEPB		569646-79-3	208.25	10.19	1.68

^a HEPB: Hidroxietoxifenil butanona.

^b Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs)* V11.02 (©1994-2019 ACD/Labs).

En el Capítulo 7 de la presente Tesis Doctoral se estudian una serie de conservantes alternativos recogidos en el Inventario de Ingredientes Cosméticos, cuya información más relevante se muestra en la *Tabla 1.4*. Así, el alcohol fenético (2-feniletanol, PA, del inglés *phenethyl alcohol*) se utiliza como enmascarante; el metilpropanodiol (2-metil-1,3-propanodiol, MP, del inglés *methylpropanediol*), como disolvente; el fenilpropanol (3-fenilpropanol, PP, del inglés *phenylpropanol*), como enmascarante, perfumante y disolvente; el caprilil glicol (1,2-octanodiol, CG, del inglés *caprylyl glycol*), como emoliente, acondicionador capilar, humectante y acondicionador de la piel; y la etilhexilglicerina (3-[(2-etilhexil)oxi]-1,2-propanodiol, EG, del inglés *ethylhexylglycerin*), como desodorante y acondicionador de la piel. Sin embargo, todos ellos presentan una importante actividad antimicrobiana [35-44] y su uso como conservantes en la industria cosmética está muy extendido, siendo objeto de varias patentes [37,45-48]. A pesar de ello, estos compuestos todavía no se encuentran regulados por el Reglamento Europeo.

Tabla 1.4. Información sobre los compuestos estudiados en el *Capítulo 7*.

Nombre ^a	Estructura química	Número CAS	M _r (g mol ⁻¹)	pK _a ^b	log K _{o/w} ^b
PA		60-12-8	122.16	15.17	1.50
MP		2163-42-0	90.12	14.51	-0.74
PP		122-97-4	136.19	15.04	1.78
CG		1117-86-8	146.23	14.60	1.54
EG		70445-33-9	204.31	13.67	2.47

^a PA: alcohol fenetílico; MP: metilpropanodiol; PP: fenilpropanol; CG: caprilil glicol; EG: etilhexilglicerina.

^b Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

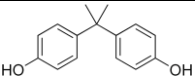
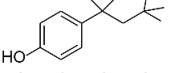
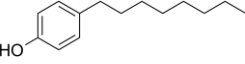
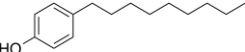
1.2.3. Sustancias prohibidas

Las sustancias prohibidas son aquellas que no pueden contener los productos cosméticos y, como se ha indicado anteriormente, se encuentran recogidas en el *Anexo II* del Reglamento Europeo, que incluye actualmente 1379 entradas. Sin embargo, tal como se establece en el *Artículo 17* de dicho reglamento, se permite la presencia fortuita de pequeñas cantidades (trazas) de una sustancia prohibida, procedente de impurezas de ingredientes naturales o sintéticos, del proceso de fabricación, del almacenamiento o de la migración desde el embalaje, que sea técnicamente inevitable en las buenas prácticas de fabricación, siempre y cuando el producto cosmético resultante sea seguro en las condiciones normales de uso.

En el *Capítulo 8* de la presente Tesis Doctoral se estudian algunas de estas sustancias: bisfenol A (BPA, del inglés *bisphenol A*), octilfenol (OP, del inglés *octylphenol*), t-octilfenol (t-OP) y nonilfenol (NP, del inglés *nonylphenol*), cuya información más relevante se muestra en la *Tabla 1.5*. Estos compuestos son conocidos por presentar actividad como disruptores endocrinos. En este sentido, el BPA es responsable de toxicidad aguda y crónica [49,50] debido a sus propiedades estrogénicas [51-54]. Además, también se ha relacionado con hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares, asma e insomnio [55-57]. Del mismo modo, también se ha

descrito la actividad como disruptores endocrinos estrogénicos de t-OP, OP y NP [58-60]. En cuanto a la manera en la que estas sustancias pueden llegar a los productos cosméticos, el BPA se utiliza habitualmente como intermedio en la fabricación industrial de diferentes tipos de plásticos, resinas y polímeros, por lo que puede ser liberado a los productos cosméticos y otros productos de consumo mediante migración desde los envases [61-64]. Por otro lado, los alquilfenoles (como OP, t-OP y NP) pueden producirse y liberarse como productos de degradación de los etoxilatos de alquilfenol [65,66], también conocidos como alquilfenoles etoxilados, empleados como surfactantes no iónicos en una gran variedad de aplicaciones. Por este motivo, estos compuestos se encuentran muy extendidos en el medio ambiente [67-69]. Consecuentemente, BPA y NP están incluidos en el *Anexo II* del Reglamento Europeo. Sin embargo, aunque sus efectos sobre la salud humana son igualmente perjudiciales, OP y t-OP todavía no están prohibidos en los productos cosméticos, aunque podrían ser incluidos en dicho listado próximamente.

Tabla 1.5. Información sobre los compuestos estudiados en el *Capítulo 8*.

Nombre	Estructura química	Número CAS	M_r (g mol^{-1})	pK_a^a	$\log K_{o/w}^a$
Bisfenol A		80-05-7	228.29	10.29	3.64
t-Octilfenol		140-66-9	206.32	10.15	5.18
Octilfenol		1806-26-4	206.32	10.15	5.63
Nonilfenol		104-40-5	220.35	10.15	6.14

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

Finalmente, en los Capítulos 9 y 10 de la presente Tesis Doctoral, se estudia otra familia de sustancias prohibidas, las nitrosaminas, conocidas por sus efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos [70,71]. La presencia de nitrosaminas en los productos cosméticos se prohibió en 1992 [72], aunque diversos estudios llevados a cabo entre 1977 y la actualidad han puesto de manifiesto que su presencia a nivel de trazas en los cosméticos es un problema persistente [73-76]. Cabe destacar que estas sustancias prohibidas no se añaden intencionadamente al producto cosmético, sino que pueden

formarse fácilmente por la reacción entre una amina secundaria [77] y un agente nitrosante, como nitrito u óxidos de nitrógeno [71,78] (Figura 1.2).

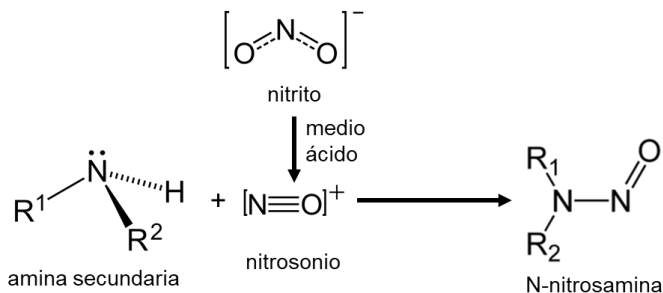


Figura 1.2. Formación de nitrosaminas a partir de aminas secundarias.

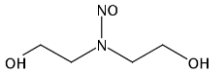

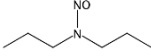
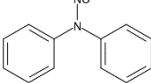




Además, como se ha mencionado anteriormente, algunos conservantes que contienen grupos funcionales nitro en sus estructuras (como el bronopol) pueden también reaccionar con aminas para formar nitrosaminas [26,78]. Por este motivo, el CCSC evaluó el riesgo para la salud asociado a la presencia de nitrosaminas en los cosméticos y concluyó que debería establecerse un límite de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para las nitrosaminas presentes en las materias primas, así como para las que potencialmente pudieran formarse en el producto cosmético acabado [26,70]. En este sentido, la industria cosmética debe controlar las impurezas de las materias primas empleadas y evitar cualquier incompatibilidad entre ingredientes que pudiera conducir a la formación de nitrosaminas para garantizar la seguridad de los consumidores, teniendo en cuenta que la mayor parte de los productos cosméticos se utilizan frecuentemente, algunos de ellos diariamente e incluso varias veces al día [79]. El listado de nitrosaminas estudiadas en la presente Tesis Doctoral, junto con su información más relevante, se muestra en la *Tabla 1.6*.

Tabla 1.6. Información sobre los compuestos estudiados en los *Capítulos 9 y 10*.

Nombre ^a	Estructura química	Número CAS	M _r (g mol ⁻¹)	pK _a ^b	log K _{o/w} ^b
NDBA		924-16-3	158.24	-3.14	2.56
NDEA		55-18-5	102.14	-3.14	0.52

(continúa)

Tabla 1.6. (continuación).

Nombre ^a	Estructura química	Número CAS	M _r (g mol ⁻¹)	pK _a ^b	log K _{o/w} ^b
NDELA		1116-54-7	134.13	13.76	-1.33
NDMA		62-75-9	74.08	-3.63	-0.50
NDPA		621-64-7	130.19	-3.18	1.54
NDPhA		86-30-6	198.22	-5.83	3.13
NMEA		10595-95-6	88.11	-3.39	0.01
NMOR		59-89-2	116.12	-5.72	-0.59
NPIP		100-75-4	114.15	-3.18	0.44
NPYR		930-55-2	100.12	-3.14	-0.09

^a NDPA: N-nitrosodipropilamina; NDEA: N-nitrosodietilamina; NDELA: N-nitrosodietanolamina; NDMA: N-nitrosodimetilamina; NDPA: N-nitrosodipropilamina; NDPhA: N-nitrosodifenilamina; NMEA: N-nitrosoetilmetilamina; NMOR: N-nitrosomorfolina; NPIP: N-nitrosopiperidina; NPYR: N-nitrosopirrolidina.

^b Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

1.3. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS

Considerando las sustancias prohibidas o restringidas que figuran actualmente en el Reglamento Europeo (*Anexos II a VI*) resulta un total de más de 1900 sustancias diferentes. Por ello, es necesario disponer de métodos analíticos que permitan:

- Detectar la posible presencia de sustancias prohibidas (*Anexo II*) y, en su caso, determinar su contenido en el producto cosmético.

- Determinar el contenido de sustancias permitidas con concentración máxima restringida (*Anexos III a VI*) para verificar que no superan los límites establecidos.
- Determinar el contenido de ingredientes cosméticos no regulados, de forma que el producto fabricado se corresponda con la formulación inicialmente diseñada, con el fin de asegurar la calidad y la eficacia esperada de su uso.

A pesar del elevado número de sustancias que deberían ser controladas analíticamente con estos fines, el número de métodos analíticos disponibles es insuficiente. Por este motivo, las industrias cosméticas se encuentran muy a menudo con dificultades a la hora de encontrar y seleccionar los métodos analíticos necesarios para llevar a cabo el control de calidad de los productos que fabrican, teniendo en cuenta el tipo de análisis a realizar y la instrumentación analítica disponible en cada caso. Del mismo modo, las autoridades sanitarias y los laboratorios encargados de realizar los controles de mercado necesitan disponer de métodos analíticos para llevar a cabo su labor, detectando errores, contaminaciones o posibles fraudes.

1.3.1. Características deseables de un método analítico para el análisis de productos cosméticos

Los productos cosméticos se presentan en una gran variedad de formulaciones diferentes, por lo que es necesario que los métodos analíticos sean adecuados para el tipo de producto e ingredientes que se requieran controlar. En este sentido, un método analítico validado debe presentar las denominadas *propiedades analíticas supremas* [80]:

- Exactitud: Concordancia entre el valor promedio obtenido del análisis y el valor que se considera verdadero o de referencia.
- Representatividad: Capacidad de los resultados analíticos para satisfacer las necesidades informativas sobre las propiedades de una muestra o un conjunto de ellas.

También debe cumplir con las denominadas *propiedades analíticas básicas*:

- Repetibilidad o precisión: Concordancia entre los resultados obtenidos en una serie de repeticiones del análisis.
- Sensibilidad: Capacidad para discriminar concentraciones semejantes de analito y poder detectar o determinar pequeñas concentraciones de

analito en la muestra, lo que pone de manifiesto la capacidad del método analítico para obtener resultados en el intervalo de concentración requerido de acuerdo a los límites establecidos.

- Selectividad: Ausencia de errores en los resultados obtenidos por la presencia de posibles interferentes en las condiciones del análisis.
- Robustez: Resistencia al cambio en la respuesta analítica cuando se varían ligeramente las condiciones experimentales en las que se desarrolla el análisis.

Además, debido a que el control analítico de los productos cosméticos requiere el análisis periódico de un elevado número de muestras, los métodos deben presentar una serie de *propiedades analíticas complementarias*. Principalmente:

- Viabilidad: Coste asumible y disponibilidad de la instrumentación analítica necesaria.
- Rapidez: Tiempos cortos en la preparación de las muestras y la obtención de los resultados, con mínima manipulación por parte del operador.
- Inocuidad: Ausencia de riesgo tanto para el operador como para el medio ambiente, con mínima manipulación de reactivos tóxicos y generación de residuos, en el marco de la denominada *Química Analítica Ecológica* [81,82].
- Responsabilidad social: transparencia, comportamiento ético, sostenibilidad y reflexión sobre el impacto de las actividades analíticas y sus resultados sobre la calidad de vida de los ciudadanos y el medio ambiente [83-85].

1.3.2. Métodos analíticos de referencia

El Reglamento Europeo establece que *“para que las restricciones relativas a las sustancias se apliquen y controlen uniformemente, conviene que el muestreo y el análisis se efectúen de modo reproducible y normalizado”*. A este respecto se indica que *“se presumirá que existe fiabilidad y reproducibilidad cuando el método usado se ajuste a las normas armonizadas pertinentes”*. En este sentido, una **norma armonizada**, tal como se recoge en el Reglamento Europeo, es una *“norma adoptada por uno de los organismos europeos de normalización enumerados en el anexo I de la Directiva 98/34/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de junio de 1998, por la que se establece un procedimiento de información en materia de las normas y*

reglamentaciones técnicas y de las reglas relativas a los servicios de la sociedad de la información, sobre la base de una solicitud presentada por la Comisión, de conformidad con el artículo 6 de dicha Directiva” y “cuyas referencias hayan sido publicadas en el Diario Oficial de la Unión Europea”.

Por tanto, se consideran normas armonizadas:

- las normas adoptadas por los organismos que figuran en el citado *anexo I* de la *Directiva 98/34/CE* [86], y
- cuyas referencias hayan sido publicadas en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Sin embargo, es interesante destacar que no existe actualmente ningún método analítico en materia de productos cosméticos que reúna ambos requisitos para poder considerarse como norma armonizada.

Cabe indicar que el principal organismo normalizador que se reconoce oficialmente en dicha *Directiva 98/34/CE* es el **Comité Europeo de Normalización** (CEN) [87], encargado de la estandarización en todos los campos a excepción del electrotécnico (CENELEC) y las telecomunicaciones (ETSI). Por tanto, la labor del CEN es estudiar y aprobar, en caso favorable, métodos analíticos para su posterior publicación como normas armonizadas. El CEN está formado por representantes de cada uno de los Estados miembros de la Unión Europea, que son los correspondientes organismos nacionales de normalización. En el caso de España, actúa como representante la **Asociación Española de Normalización** (UNE) [88] y es responsabilidad de los organismos nacionales de normalización implementar las normas europeas como normas nacionales.

Las normas elaboradas por CEN se denominan “normas EN” y se llevan a cabo en el seno de los Comités Técnicos (TC, del inglés *Technical Committees*) de CEN. El comité técnico europeo *CEN/TC 392 Cosmetics* consta de varios Grupos de Trabajo (WG, del inglés *Working Groups*), siendo el *CEN/TC 392/WG 1 Analytical Methods* el encargado del estudio y aprobación de los métodos analíticos para productos cosméticos. Hasta la fecha, este grupo de trabajo ha elaborado seis normas EN, que se enumeran en la *Tabla 1.7*.

Tabla 1.7. Normas EN elaboradas por *CEN/TC 392/WG 1* [87].

EN 16342:2013	Quantitative determination of zinc pyrithione, piroctone olamine and climbazole in surfactant containing cosmetic anti-dandruff products.
EN 16343:2013	Determination of 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (IPBC) in cosmetic preparations, LC-MS methods.
EN 16344:2013	Screening for UV-filters in cosmetic products and quantitative determination of 10 UV-filters by HPLC.
EN 16521:2014	GC/MS method for the identification and assay of 12 phthalates in cosmetic samples ready for analytical injection.
EN 16956:2017	HPLC/UV method for the identification and assay of hydroquinone, ethers of hydroquinone and corticosteroids in skin whitening cosmetic products.
EN 17156:2018	LC/UV method for the identification and quantitative determination in cosmetic products of the 22 organic UV filters in use in the EU.

También relacionado con el análisis de productos cosméticos, el comité técnico europeo *CEN/TC 347 Methods for analysis of allergens* elaboró una norma para la determinación de alérgenos (*Tabla 1.8*).

Tabla 1.8. Norma EN elaborada por *CEN/TC 347* sobre productos cosméticos [87].

EN 16274:2012	Quantification of suspected fragrance allergens in consumer products. Step 1: GC analysis of ready-to-inject sample.
----------------------	--

Por otro lado, la red europea de Laboratorios Oficiales de Control de Cosméticos (OCCLs, del inglés *Official Cosmetics Control Laboratories*), que colabora con la **Dirección Europea de Calidad del Medicamento y la Asistencia Sanitaria** (EDQM, del inglés *European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare*) [89], también ha elaborado dos normas con métodos de análisis para el control de productos cosméticos (*Tabla 1.9*).

Tabla 1.9. Normas elaboradas por *EDQM-OCCLs* [89].

–	High performance liquid chromatography method for the determination of free formaldehyde in cosmetic products using 2,4-DNPH for derivatisation.
–	High performance liquid chromatography method for the determination of hydrogen peroxide present in or released by tooth whitening or bleaching products.

Además de la normalización europea, la estandarización internacional se lleva a cabo por la **Organización Internacional de Normalización** (ISO, del inglés *International Organization for Standardization*) [90]. Las normas elaboradas por ISO se denominan “normas ISO”, siendo el comité técnico internacional *ISO/TC 217 Cosmetics*, y más concretamente su grupo de trabajo *ISO/TC 217/WG 3 Analytical Methods*, el encargado del estudio y aprobación de los métodos analíticos para productos cosméticos. Hasta la fecha, este comité técnico ha elaborado cinco normas ISO, que se enumeran en la *Tabla 1.10*.

Tabla 1.10. Normas ISO elaboradas por *ISO/TC 217* [90].

ISO 10130:2009	Nitrosamines: Detection and determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics by HPLC, post-column photolysis and derivatization.
ISO/TR 14735:2013	Nitrosamines: Technical guidance document for minimizing and determining N-nitrosamines in cosmetics.
ISO 15819:2014	Nitrosamines: Detection and determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics by HPLC-MS-MS.
ISO/TR 17276:2014	Analytical approach for screening and quantification methods for heavy metals in cosmetics.
ISO/TR 18818:2017	Detection and quantitative determination of Diethanolamine (DEA) by GC/MS.

Finalmente, las normas elaboradas por UNE se denominan “normas UNE” (que también es acrónimo de “Una Norma Española”) y se llevan a cabo por los Comités Técnicos de Normalización (CTN) de UNE. Las normas relativas a los productos cosméticos son responsabilidad del comité técnico *CTN 84 Aceites esenciales y productos cosméticos*, que consta de dos subcomités: *SC*

1 Aceites esenciales y SC 2 Productos cosméticos. El subcomité *CTN 84/SC 2* se compone de varios Grupos de Trabajo (GT), siendo el grupo de trabajo *GT 14 Métodos Analíticos* el encargado de la propuesta, estudio y aprobación de los métodos analíticos en materia de productos cosméticos. Este comité está vinculado a los comités técnicos internacionales *CEN/TC 392* e *ISO/TC 217*, con objeto de adoptar e implementar las normas europeas e internacionales sobre cosméticos al ámbito nacional. El comité técnico español *CTN 84/SC 2 Productos cosméticos* cuenta con otras normas publicadas sobre métodos analíticos, aunque en su gran mayoría hacen referencia a materias primas y muy pocas a productos cosméticos acabados.

En relación a la adopción de métodos analíticos como normas armonizadas para el análisis de cosméticos, existe un documento elaborado conjuntamente por la red de OCCLs, CEN y el *Institute for Reference Materials and Measurements* del *Joint Research Center* (IRMM-JRC) [91] que recoge una serie de pautas para seleccionar y validar métodos analíticos para el análisis de cosméticos y recomendaciones sobre las etapas a seguir para su normalización, en caso favorable. Cabe destacar que una parte importante de la validación consiste en llevar a cabo ensayos inter-laboratorio entre laboratorios de diferentes estados miembros, para garantizar la aplicabilidad del método para los ingredientes y muestras objeto de estudio.

Con anterioridad a la publicación y entrada en vigor del actual Reglamento Europeo se contaba con una serie de métodos de análisis “oficiales” correspondientes a siete Directivas publicadas por la Comisión Europea entre 1980 y 1996. Estos métodos se encuentran recopilados en la publicación denominada “*Cosmetics legislation. Cosmetic products. Methods of analysis*” [92]. Actualmente no se emplea la palabra “oficiales” para referirse a ellos, ya que deberían someterse a revisión y aprobación para poder recibir la denominación actual de normas armonizadas. Además, una gran parte de estos métodos se encuentran obsoletos desde el punto de vista analítico, tanto por la preparación de las muestras como por las técnicas analíticas empleadas. En la *Tabla 1.11* se muestra un resumen de los análisis y muestras a los que se refieren los métodos de dichas Directivas.

Tabla 1.11. Compuestos objeto de estudio en los métodos publicados en las Directivas recopiladas en *“Cosmetics legislation. Cosmetic products. Methods of analysis”* [92].

80/1335/CEE	<ul style="list-style-type: none">– Hidróxidos de sodio y potasio libres en preparados para el alisado del cabello y en disolvente de la cutícula de las uñas.– Acido oxálico y sus sales alcalinas en productos para el cuidado del cabello.– Cloroformo en pastas dentífricas.– Zinc en forma de cloruro, sulfato o 4-hidroxibencenosulfonato.– Acido 4-hidroxibencenosulfónico en aerosoles y lociones faciales.
82/434/CEE	<ul style="list-style-type: none">– Identificación de agentes oxidantes y determinación de peróxido de hidrógeno en productos capilares.– Colorantes de oxidación en tintes capilares: fenilendiaminas, metilfenilendiaminas, diaminofenoles, hidroquinona, α-naftol, pirogalol, resorcinol.– Nitrito en cremas y pastas.– Formaldehído libre.– Resorcinol en champús y lociones capilares.– Metanol.
83/514/CEE	<ul style="list-style-type: none">– Diclorometano y 1,1,1-tricloroetano.– 8-Hidroxiquinoleína y su sulfato.– Amoníaco libre.– Nitrometano en aerosoles.– Ácido tioglicólico en productos para el rizado, alisado capilar y depilatorios.– Hexaclorofeno.– Tosilcloramida sódica (cloramina T).– Fluoruro total en pastas dentífricas.– Compuestos organomercúricos (tiomersal, fenilmercurio y sus sales) en productos para los ojos.– Sulfuros de alcalinos y alcalinotérreos.
85/490/CEE	<ul style="list-style-type: none">– 1-(4-aminobenzoato) de glicerol.– Clorobutanol en productos cosméticos, excepto aerosoles.– Quinina en champús y lociones capilares.– Sulfitos y bisulfitos inorgánicos en productos de base acuosa o alcohólica.– Cloratos de alcalinos en pastas dentífricas y otros productos.– Yodato de sodio en productos que se aclaran.

(continúa)

Tabla 1.11. (continuación).

93/73/CEE	<ul style="list-style-type: none"> – Nitrato de plata en productos de base acuosa. – Sulfuro de selenio en champús anticaspa. – Bario y estroncio solubles en forma de sales o lacas en pigmentos. – Alcohol bencílico. – Zirconio, aluminio y cloro en antiperspirantes sin aerosol. – Hexamidina, dibromohexamidina, dibromopropamidina y clorohexidina.
95/32/CE	<ul style="list-style-type: none"> – Ácido benzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido sórbico, ácido salicílico y ácido propanoico. – Hidroquinona y sus éteres monometílico, monoetilico y monobencílico en productos para aclarar la piel.
96/45/CE	<ul style="list-style-type: none"> – 2-Fenoxietanol, 1-fenoxipropan-2-ol, 4-hidroxibenzoato de metilo, etilo, propilo, butilo y bencilo (parabenos).

Como resumen, cabe destacar que el número de normas EN y normas ISO disponibles para el análisis de los productos cosméticos es claramente insuficiente para cubrir las expectativas del actual Reglamento Europeo. Además, no existe actualmente ningún método analítico validado y adoptado como norma armonizada. Aunque las normas EN han sido adoptadas por un organismo europeo de normalización oficialmente reconocido (CEN), sus referencias no se encuentran publicadas en el *Diario Oficial de la Unión Europea*. Por otro lado, los métodos recogidos en las anteriores Directivas sí fueron publicados en el *Diario Oficial de la Unión Europea*, pero no han sido adoptados por CEN y aunque abarcan una mayor variedad de analitos y muestras, necesitan en su mayoría ser actualizados y modernizados desde el punto de vista analítico.

1.3.3. Métodos en la bibliografía analítica

Debido a la escasez de normas, armonizadas o no, las industrias cosméticas tienen la necesidad de adoptar métodos publicados en la bibliografía analítica para poder llevar a cabo el control de calidad de los productos que fabrican. En este sentido, en la bibliografía analítica existe un gran número de trabajos con metodologías y protocolos validados para el control analítico de los productos cosméticos, por lo que resulta necesario seleccionar en cada caso el método más adecuado teniendo en cuenta: el ingrediente a controlar, el tipo de muestra (matriz) y el nivel de concentración esperado. Una vez que

se ha seleccionado el método más adecuado y se ha adaptado a las condiciones particulares del laboratorio (instrumentación analítica disponible) se debe llevar a cabo una etapa de validación adicional previa a su uso como método de rutina para verificar que los resultados del procedimiento escogido cumplen con las expectativas del estudio [93] y que el método proporciona resultados según las características descritas en la anterior *Sección 1.3.1*.

Los principales métodos analíticos disponibles para el análisis de los productos cosméticos se encuentran recopilados en las dos ediciones del libro multiautor "*Analysis of cosmetic products*" [94,95], editado por la Prof. Amparo Salvador y el Prof. Alberto Chisvert, directores de la presente Tesis Doctoral. En ellos, se revisan con detalle los métodos disponibles ordenados en capítulos según la función de los ingredientes objeto de estudio: filtros ultravioleta, ingredientes para el bronceado y blanqueantes, colorantes, tintes capilares, conservantes, perfumes, surfactantes, etc. Además, se incluyen consideraciones sobre la legislación en materia de productos cosméticos, nanomateriales, ingredientes ecológicos y principales contaminantes.

A continuación, se describen de forma breve los principales antecedentes bibliográficos sobre la determinación de los compuestos de interés considerados en la presente Tesis Doctoral.

1.3.4. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de las sustancias objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral

Respecto a las sustancias objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, en el Capítulo 3 se estudian dos ingredientes activos con actividad antioxidante procedentes de extractos naturales del olivo, el hidroxitirosol y el tirosol. En la bibliografía analítica existen diversos métodos publicados para la caracterización de compuestos fenólicos en hojas de olivo [96], aceite de oliva [97,98], extractos de olivas [99] y alperujo [100,101]. La mayoría de estos métodos proporcionan información cualitativa o semi-cuantitativa, por lo que no resultan apropiados para el control rutinario. Por otra parte, se han publicado un número considerable de métodos para la determinación de hidroxitirosol y tirosol en muestras relacionadas con el olivo, como en ramas y raíces [102], olivas [103] y pulpa de oliva [104], extractos [105] y, sobre todo, en aceite de oliva por cromatografía de líquidos (LC, del inglés *liquid*

chromatography) [106-109], electroforesis capilar [110-113] y voltamperometría [114]. Sin embargo, no existe ningún método publicado para la determinación de estos compuestos en muestras cosméticas, constituyendo el método desarrollado en la presente Tesis Doctoral la primera publicación al respecto.

En relación a los conservantes, aunque el Reglamento Europeo requiere un control analítico continuo de los productos cosméticos para garantizar el cumplimiento de las restricciones establecidas en el *Anexo V*, no existen métodos de referencia para la determinación de la gran mayoría de ellos, ya que únicamente existen dos normas EN [115,116] (y su correspondiente adaptación nacional) y siete métodos en las mencionadas Directivas para el análisis de conservantes [117-121], que no cubren la totalidad de los compuestos listados en el *Anexo V*.

De entre ellas, y pese a las restricciones establecidas por el Reglamento Europeo, no existe ningún método normalizado para controlar la concentración de bronopol en los productos cosméticos, cuya concentración máxima autorizada se encuentra restringida al 0.1 % en el producto acabado independientemente de su naturaleza y función. Por otro lado, en la bibliografía analítica pueden encontrarse propuestas interesantes para su determinación en cosméticos. Estos métodos se basan principalmente en LC con detección mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/Vis) [122-125], electroquímica [126,127] o de espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*) [128,129]. Sin embargo, algunos de estos métodos requieren emplear volúmenes significativos de disolventes orgánicos (de hasta 50 mL de metanol por muestra) y/o largos tiempos en el análisis o en el pretratamiento de las muestras cosméticas. Para evitar estos inconvenientes, en el Capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral se propone una semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME, del inglés *vortex-assisted emulsification semimicroextraction*), que se explicará con detalle en el Capítulo 2, seguida de LC-UV/Vis para el control analítico de bronopol.

Otro conservante de interés, regulado por el Reglamento Europeo, que se estudia en la presente Tesis Doctoral es el formaldehído, cuya concentración máxima autorizada se encuentra restringida al 0.1 % en productos bucales y 0.2 % en el resto de productos. Como se ha indicado anteriormente, en la

Directiva 82/434/CEE [117] se describe un método analítico para la determinación de formaldehído libre en presencia de conservantes dadores de formaldehído, basado en diferentes tratamientos dependiendo la naturaleza de la muestra cosmética. En el caso de matrices lipofílicas (como cremas) se propone una extracción líquido-líquido (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*) convencional con diclorometano y una disolución acuosa de ácido clorhídrico para eliminar parte de la matriz de la muestra. Después, el extracto acuoso que contiene el formaldehído se somete a una extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid-phase extraction*). En el caso de muestras con matrices hidrofílicas (como geles o lociones) se lleva a cabo la SPE directamente y los extractos obtenidos en ambos casos se analizan mediante LC-UV/Vis. Debido a la baja absorción UV/Vis del formaldehído se propone su derivatización post-columna con pentano-2,4-diona en medio acetato amónico para formar la 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, de acuerdo a la reacción de Hantzsch [130] (ver Figura 1.3).

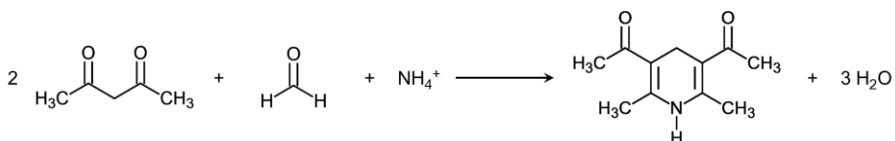


Figura 1.3. Esquema de la reacción de Hantzsch.

Este método analítico requiere el consumo de un volumen elevado de disolventes organoclorados (diclorometano) y el tratamiento de la muestra mediante SPE se centra en la eliminación de interferentes y no en la preconcentración del analito. Por este motivo, resulta interesante el desarrollo de nuevos métodos que mejoren las características analíticas del anterior empleando técnicas de microextracción. Sin embargo, pese al gran impacto que estas técnicas están teniendo actualmente [131-133], son pocos los métodos publicados en la bibliografía analítica para la determinación de formaldehído en cosméticos empleando técnicas de microextracción, como la microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME, del inglés *headspace solid-phase microextraction*) y posterior cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*) propuesta por Rivero y Topiwala [134,135], microextracción en fase sólida (SPME, del inglés *solid-phase microextraction*) con derivatización en fibra seguida de GC propuesta por Martos y Pawliszyn [136] y microextracción con formación de emulsión asistida por ultrasonidos (USAEME, del inglés *ultrasound-assisted emulsification microextraction*) seguida de micro-espectrofotometría UV/Vis

propuesta por Lavilla *et al.* [137]. En el Capítulo 5 de la presente Tesis Doctoral se desarrolla un nuevo método analítico que mejora las características analíticas del método de la *Directiva 82/434/CEE*, empleando una técnica de microextracción, la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa (RP-DLLME, del inglés *reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction*), que se explicará en el próximo Capítulo 2. Posteriormente al trabajo desarrollado en la Tesis Doctoral se han publicado otros métodos analíticos para llevar a cabo esta determinación [138,139].

Respecto a la determinación de conservantes alternativos, cabe resaltar que no existen antecedentes para el control analítico de la HEPB, estudiada en el Capítulo 6 de la presente Tesis Doctoral, en ningún tipo de muestra, incluidos los productos cosméticos, por lo que el método desarrollado es el primero disponible para su determinación.

En cuanto a los cinco conservantes alternativos estudiados en el Capítulo 7, también son escasos los métodos publicados para su determinación. Tan sólo existen en la bibliografía analítica algunos trabajos para la determinación del alcohol fenético en bebidas alcohólicas, como vino [140-142], cerveza [143,144] y licores [145]; y recientemente se ha publicado un método para la determinación de etilhexilglicerina en productos farmacéuticos [146]. En cuanto a las técnicas analíticas empleadas, destaca la GC con detector de ionización en llama (FID, del inglés *flame ionization detector*) [140,144-146] y MS [141,142], y en menor medida LC-UV/Vis [143]. Por tanto, no existen antecedentes bibliográficos sobre la determinación de estos compuestos en productos cosméticos, siendo el trabajo desarrollado en la Tesis Doctoral el primero en abordarla.

En relación al análisis de los disruptores endocrinos (BPA y 4-alkilfenoles) estudiados en el Capítulo 8 de la presente Tesis Doctoral, no existe ninguna norma para su determinación en cosméticos. En la bibliografía analítica se pueden encontrar diversos métodos publicados para su determinación en diferentes tipos de muestras, principalmente en muestras biológicas [147-150] y medioambientales [150-153]. En cuanto al análisis en los productos cosméticos, el BPA es el compuesto más estudiado y existen varios trabajos publicados para su determinación. Principalmente, el método basado en LLE y SPE seguido de LC con detección de fluorescencia (FLD, del inglés *fluorescence detection*) propuesto por Zhu *et al.* [154]; la determinación de

BPA y otros bisfenoles mediante extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE, del inglés *stir bar sorptive extraction*) seguida de GC-MS propuesta por Cacho *et al.* [155]; y, más recientemente, la determinación mediante SPE seguida de LC-MS propuesta por Shaaban *et al.* [156]. Por otro lado, se ha publicado un método para la determinación de NP mediante SBSE seguida de LC-UV/Vis propuesto por Chang *et al.* [157]. Además, existen otros trabajos publicados para el estudio de disruptores endocrinos en cosméticos, incluyendo bisfenoles y alquilfenoles [158,159]. La mayoría de estos métodos requieren etapas complejas de preparación de muestras, con uno o más procedimientos de (micro)extracción, por lo que en el método desarrollado en la presente Tesis Doctoral se ha prestado especial atención a la sencillez y rapidez en cuanto a la preparación de las muestras y su posterior análisis cromatográfico.

Finalmente, respecto a la determinación de nitrosaminas en cosméticos, las normas internacionales *ISO 10130:2009* [160] e *ISO 15819:2014* [161] tratan sobre la determinación de N-nitrosodietanolamina (NDELA) en los productos cosméticos, mediante LC con detección UV/Vis y de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), respectivamente. Esto se debe a que la NDELA es la nitrosamina que más frecuentemente se detecta en las muestras cosméticas [70,77]. Sin embargo, no existen métodos de referencia para la detección y cuantificación de otras nitrosaminas distintas a la NDELA.

En cuanto a los métodos publicados en la bibliografía analítica, la NDELA es igualmente la nitrosamina más estudiada y existe un número significativo de métodos publicados atendiendo a su determinación mediante diferentes técnicas analíticas: principalmente, LC con analizador térmico de energía (TEA, del inglés *thermal energy analyzer*) [73,162,163], absorción UV/Vis [164-167], MS/MS [168-171] y polarografía [172]; GC con detección TEA [75,173,174], MS [165,175], conductividad electrolítica [176] y captura electrónica [177]; y electrocromatografía capilar [178]. Por otro lado, los métodos publicados para el estudio de otras nitrosaminas son menos numerosos y en ellos también se emplean diferentes técnicas, como GC-TEA [179,180], GC-MS [181,182], GC-MS/MS [183], LC-TEA [184,185], LC-UV/Vis [186] y LC-MS/MS [187]. Atendiendo a las técnicas de (micro)extracción para el enriquecimiento de las nitrosaminas, las técnicas en fase sólida son las más empleadas: SPE [75,166,168-170,183], SPE dispersiva (DSPE, del inglés *dispersive solid-phase extraction*) [171,187] y SPME [175,182]; mientras que sólo en algunos trabajos publicados se utilizan técnicas de (micro)extracción

en fase líquida [166,167,169,181]. Por todo ello, en los Capítulos 9 y 10 de la presente Tesis Doctoral se proponen dos métodos analíticos para la determinación de diez nitrosaminas diferentes: en el primero de ellos se emplea la RP-DLLME asistida por vórtice (VA-RP-DLLME, del inglés *vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction*) seguida de LC-MS, mientras que en el segundo método se utiliza la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME, del inglés *stir bar sorptive-dispersive microextraction*) seguida de LC-MS/MS. Estas técnicas de microextracción se tratarán con detalle en el Capítulo 2.

CAPÍTULO 2

TÉCNICAS DE (MICRO)EXTRACCIÓN EMPLEADAS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

2.1. CONSIDERACIONES INICIALES

La preparación de la muestra es una de las etapas fundamentales de cualquier método analítico y se realiza en base a tres objetivos [188]:

- **separar** los analitos de posibles sustancias interferentes presentes en la muestra;
- **concentrar** los analitos, para mejorar los límites de detección y cuantificación del método analítico; y/o
- **acondicionar** las disoluciones de medida de la muestra a los requerimientos de la instrumentación analítica.

En este sentido, las técnicas de (micro)extracción juegan un papel importante, especialmente en la determinación de compuestos a nivel de trazas, ya que permiten la separación y preconcentración de los analitos en una sola etapa.

Tradicionalmente, la **extracción líquido-líquido** (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*) convencional [189], en la que los analitos se transfieren desde un disolvente a otro inmisible por el que tienen mayor afinidad, ha sido muy empleada. Sin embargo, esta técnica aparentemente sencilla presenta una serie de inconvenientes, como el consumo de volúmenes elevados de disolventes orgánicos, frecuentemente tóxicos para el operador y perjudiciales para el medio ambiente. Además, muy a menudo se requiere realizar repeticiones sucesivas del procedimiento para alcanzar rendimientos de extracción satisfactorios, lo que incrementa el tiempo requerido para llevarla a cabo y el consumo de disolventes, además de ocasionar errores por pérdidas de los analitos.

Por otro lado, la **extracción en fase sólida** (SPE, del inglés *solid-phase extraction*), basada en el empleo de un sorbente sólido confinado en el interior de cartuchos o discos de extracción como medio para retener los analitos, ha sido y continúa siendo una técnica muy utilizada. Tras percolar la disolución de la muestra, se lleva a cabo una etapa de limpieza en la que se eliminan posibles sustancias interferentes y posteriormente se eluyen los analitos retenidos mediante el empleo de un disolvente por el que presentan mayor afinidad [189]. A pesar de que se reduce el consumo de disolventes respecto a la LLE, la SPE no está exenta de inconvenientes. Por un lado, el

tiempo necesario para llevar a cabo la extracción es considerable y a menudo se requiere la evaporación del extracto obtenido para preconcentrar los analitos. Además, la posible coelución de sustancias interferentes procedentes de la matriz de la muestra puede causar errores en la determinación. Por otro lado, los sorbentes empleados pueden presentar “efecto memoria”, conduciendo a resultados erróneos. En caso de realizar un único uso de los mismos se encarecería mucho su coste.

Para evitar estos inconvenientes, en las últimas décadas han incrementado su relevancia las denominadas **técnicas de microextracción** [131-133,190], tanto en fase sólida como en fase líquida, que permiten reducir el consumo de disolventes orgánicos y acortar los tiempos de extracción, así como mejorar la selectividad y los factores de preconcentración alcanzados con las técnicas convencionales. Las técnicas de microextracción en fase sólida se basan en la retención de los analitos en un material sorbente que actúa como medio de extracción. En función de las características del sorbente, los analitos pueden quedar retenidos por adsorción (interacción física o química superficial entre el sorbente y los analitos) o por absorción (reparto de los analitos entre el absorbente y la disolución de la muestra). Los analitos retenidos son posteriormente liberados del sorbente de manera selectiva, bien mediante la elución con un pequeño volumen de un disolvente apropiado (desorción líquida) o bien mediante desorción térmica en el puerto de inyección del instrumento analítico seleccionado [132]. Por otra parte, en las técnicas de microextracción en fase líquida la extracción tiene lugar entre la fase dadora, generalmente de naturaleza acuosa, que contiene los analitos y un pequeño volumen de una fase aceptora (extractante) inmisible en agua [191-193]. Debido a la importante disminución del volumen de la fase aceptora, que generalmente consta de unos pocos microlitros, es posible alcanzar elevados factores de preconcentración permitiendo la determinación de compuestos a nivel de trazas.

A continuación, se describirán brevemente las técnicas de (micro)extracción empleadas en la presente Tesis Doctoral.

2.2. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

Con el objetivo de reducir de forma importante el consumo de disolventes orgánicos de la LLE convencional y mejorar significativamente los factores de preconcentración, Rezaee *et al.* [194] propusieron en 2006 la denominada **microextracción líquido-líquido dispersiva** (DLLME, del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*), que consiste en un sistema ternario de disolventes que incluye un disolvente dispersante (disolvente orgánico polar), un disolvente extractante (disolvente orgánico apolar) y una fase dadora de naturaleza acuosa. Cuando una mezcla apropiada de los disolventes dispersante y extractante se inyecta en la fase dadora acuosa se forma una microemulsión por la acción del disolvente dispersante, que permite la dispersión del disolvente extractante en numerosas microgotas de forma que la superficie de contacto entre las fases inmiscibles es infinitamente grande. Tras la extracción, la separación de fases se consigue mediante la rotura de la microemulsión por centrifugación y la fase orgánica, generalmente sedimentada, se recoge para el posterior análisis instrumental. En la *Figura 2.1.* se muestra un esquema general del modo de trabajo de la DLLME.

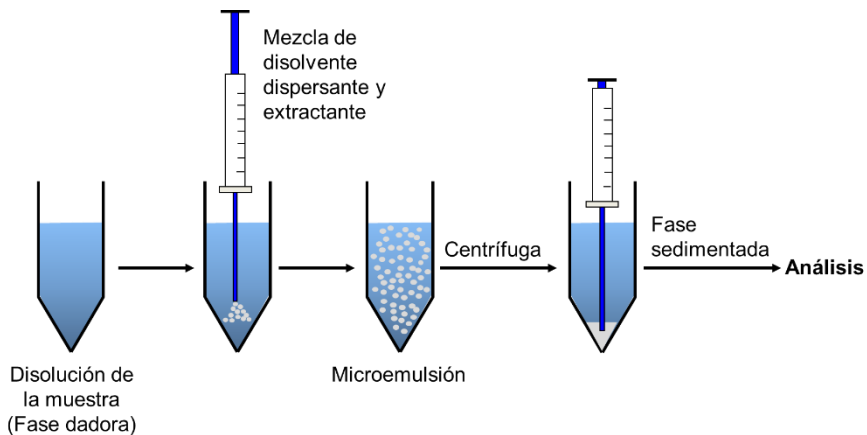


Figura 2.1. Esquema general de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).

La DLLME se ha convertido en una técnica muy popular, utilizándose en numerosas aplicaciones en las que se extraen analitos apolares desde fases acuosas empleando un disolvente orgánico inmiscible en agua como extractante [195-201]. Nótese que para que el extracto resultante quede

sedimentado, facilitando su recogida tras la separación de fases, el disolvente orgánico empleado debe ser más denso que el agua, por lo que la DLLME lleva aparejado un uso extendido de disolventes organoclorados. Sin embargo, también existen aplicaciones en las que se utilizan como extractante disolventes orgánicos menos densos que el agua [202] y, más recientemente, los denominados líquidos iónicos [203-205].

Por otro lado, la DLLME como tal no resulta adecuada para la extracción de compuestos polares que presentan mayor afinidad por la fase acuosa que por los disolventes orgánicos. Para evitar los problemas asociados a la extracción de compuestos polares, Hashemi *et al.* [206] propusieron en el año 2010 una modificación de la DLLME original llamada **DLLME en fase reversa** (RP-DLLME, del inglés *reversed-phase DLLME*), en la que un pequeño volumen de agua (como disolvente extractante) se dispersa en el seno de una fase dadora orgánica que contiene los analitos polares. En primer lugar, se utilizó la RP-DLLME para determinar oleuropeína en extractos de oliva [206] e hidroxitirosol y tirosol en aceites de oliva [106]. Desde entonces, la RP-DLLME se ha utilizado en diversas aplicaciones para la determinación de compuestos polares, por ejemplo: fenoles en aceite de oliva [107,114]; NDELA en productos cosméticos [167]; BPA [207], amigdalina [208], vitamina A y vitamina E [209] en aceites y fenoles en sedimentos marinos [210]. Sin embargo, a pesar de su gran potencial, su uso todavía no está tan extendido como el de la DLLME original.

En la presente Tesis Doctoral, se ha empleado la RP-DLLME en el trabajo presentado en el Capítulo 5 para la determinación de formaldehído y, posteriormente, en el trabajo presentado en el Capítulo 9 para la determinación de nitrosaminas, dado el carácter polar de estos analitos. Cabe resaltar que en este último caso se empleó una modificación de la RP-DLLME en la que la microemulsión se genera por la acción de un agitador en vórtice, en la denominada **RP-DLLME asistida por vórtice** (VA-RP-DLLME, del inglés *vortex-assisted RP-DLLME*), evitando la necesidad de utilizar un disolvente dispersante. Esto permite reducir todavía más el consumo de disolventes orgánicos, evitar la influencia del disolvente dispersante en el equilibrio de reparto de los analitos entre la fase dadora y aceptora, así como evitar la contribución del disolvente dispersante al volumen final de los extractos.

2.3. SEMI-MICROEXTRACCIÓN CON FORMACIÓN DE EMULSIÓN ASISTIDA POR VÓRTICE

Tras popularizarse el empleo de la DLLME, Yiantzi *et al.* [211] propusieron en el año 2010 la **microextracción líquido-líquido asistida por vórtice** (VALLME, del inglés *vortex-assisted liquid-liquid microextraction*) como una nueva técnica de microextracción en la que se consigue la rápida dispersión de una fase extractante en el seno de una fase dadora acuosa mediante agitación en vórtice, produciendo una (micro)emulsión. En dicho trabajo se empleó satisfactoriamente esta nueva técnica para la determinación de OP, NP y BPA en aguas residuales. El procedimiento consistió en la dispersión de un pequeño volumen de 1-octanol como disolvente de extracción en una muestra de agua con la ayuda de un agitador en vórtice, produciendo pequeñas (micro)gotas que promueven la rápida transferencia de los analitos desde la disolución acuosa hacia la fase aceptora. Tras la centrifugación, unos pocos microlitros del extracto sobrenadante fueron recogidos para su análisis por LC-UV/Vis.

Merece la pena destacar que las técnicas de extracción asistidas por ultrasonidos establecieron un precedente importante para las posteriores técnicas asistidas por vórtice [212,213]. En primer lugar, se utilizó la energía de los ultrasonidos en la denominada **microextracción con formación de emulsión asistida por ultrasonidos** (USAEME, del inglés *ultrasound-assisted emulsification microextraction*) para la extracción de diferentes analitos desde muestras sólidas [214] y muestras de agua [215-220], principalmente, pero también en otras aplicaciones posteriores [221,222], incluyendo perfumes y otros productos cosméticos [137,223-227]. Sin embargo, se han descrito algunos inconvenientes del uso de los ultrasonidos frente al uso de la agitación en vórtice para asistir las extracciones líquido-líquido, como la dificultad para aplicar los ultrasonidos de manera uniforme y reproducible [228], así como favorecer la degradación de los analitos y producir radicales libres [229,230].

Algunos autores han renombrado a la VALLME como microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEME, del inglés *vortex-assisted emulsification microextraction*) [231,232], haciendo referencia al proceso de formación de la emulsión que facilita la transferencia de los analitos desde la fase dadora a la aceptora, cuyas principales aplicaciones se

dedican al análisis de aguas y bebidas [231-234]. Además, existe una variante de la técnica que hace uso de surfactantes para facilitar el contacto entre las fases, denominada microextracción líquido-líquido con formación de emulsión mediante surfactantes asistida por vórtice (VSLME, del inglés *vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction*), propuesta en el año 2011 por Yang *et al.* [235] y que también cuenta con diversas aplicaciones en el análisis de aguas [236-240], bebidas y alimentos [235,241-247] y muestras biológicas [248,249]. Por todo ello, se puede decir que la VALLME y sus diferentes variantes se han convertido en técnicas de microextracción muy populares con numerosas y variadas aplicaciones, que se recogen en recientes artículos de revisión [250-255].

En la presente Tesis Doctoral se propone la denominada **semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice** (VAEsME, del inglés *vortex-assisted emulsification semimicroextraction*), que consiste en un sistema ternario de disolventes comprendido por un disolvente orgánico de soporte, un disolvente dispersante y un pequeño volumen de agua como disolvente extractante. En este sistema de disolventes:

- El disolvente orgánico de soporte debe ser inmiscible en agua y menos denso que ella, para facilitar la posterior recolección del extracto acuoso por sedimentación en tubos de punta cónica.
- El disolvente dispersante, generalmente un disolvente orgánico polar, debe ser miscible tanto con el disolvente de soporte como con la fase aceptora acuosa.

La VAEsME está especialmente pensada para la extracción rápida y sencilla de compuestos polares desde matrices cosméticas, de modo que en una primera etapa se dispersa (o se disuelve, según su composición) la muestra cosmética en una mezcla del disolvente de soporte (p. ej., hexano) y el disolvente dispersante (p. ej., etanol) dando lugar a la fase dadora (disolución de la muestra). A continuación, se añade a la mezcla un pequeño volumen de agua como disolvente extractante y mediante la agitación en vórtice se produce una (micro)emulsión de pequeñas gotas de agua dispersas en el seno de la fase dadora, de forma análoga a la DLLME, de modo que la superficie de contacto entre las fases es infinitamente grande. Tras esto, tiene lugar la separación de las fases inmiscibles mediante centrifugación y finalmente se recoge el extracto sedimentado para su análisis instrumental.

En la *Figura 2.2.* se muestra un esquema del procedimiento experimental propuesto.

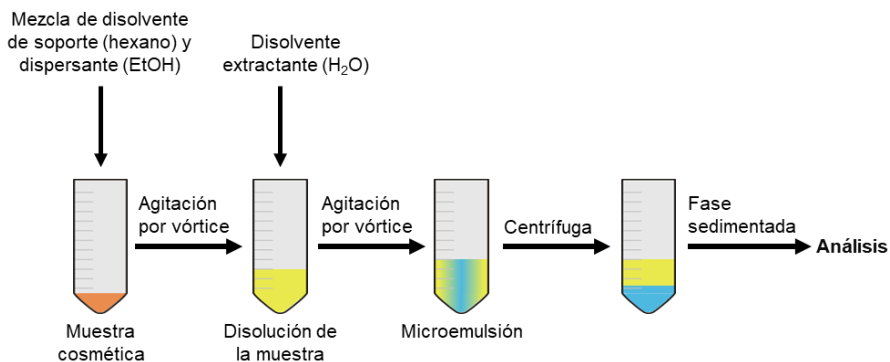


Figura 2.2. Esquema de la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME).

En esta estrategia de extracción, el disolvente dispersante cumple una doble función. Por un lado, facilita la dispersión de la muestra en la fase dadora, especialmente en los cosméticos de tipo emulsión que contienen una parte lipofílica y una parte hidrofílica. Por otro lado, asiste la formación de la (micro)emulsión cuando la mezcla con el disolvente extractante se somete a la agitación en vórtice, aumentando la superficie de contacto entre las fases y permitiendo que la transferencia de los analitos hacia la fase aceptora se produzca en un tiempo muy breve. La principal ventaja de la VAEsME, tal como se propone, es que permite llevar a cabo la preparación de la muestra cosmética, la eliminación de compuestos potencialmente interferentes de la matriz y la extracción de los analitos en un único procedimiento, de forma rápida, sencilla y con una mínima dilución de la muestra, por lo que resulta adecuada para la determinación de compuestos polares en productos cosméticos.

En la presente Tesis Doctoral, esta estrategia de preparación de muestras cosméticas se empleó por primera vez en el trabajo desarrollado en el [Capítulo 3](#) y, al observar su potencial para la preparación rápida y con mínima dilución de las muestras cosméticas, se estudió con mayor detalle durante el trabajo presentado en el [Capítulo 4](#), en el que se redujo el volumen de los disolventes empleados (pasando de 1-2 mL a 0.5-1 mL de cada disolvente) y se adoptó finalmente la denominación propuesta de VAEsME. Atendiendo a

la naturaleza de las fases involucradas se trata de una extracción líquido-líquido en fase reversa, al producirse entre una fase dadora orgánica y una fase aceptora acuosa. Es importante destacar que, aunque el disolvente dispersante forma parte de la fase dadora orgánica en la primera etapa de la VAEsME, al añadir el disolvente extractante se produce un reparto del mismo entre ambas fases, dependiendo de su afinidad. En el caso concreto del etanol, éste pasa casi en su totalidad a formar parte de la fase sedimentada tras la centrifugación.

En el trabajo presentado en el Capítulo 7 se empleó una variación de la VAEsME con dos modificaciones significativas. En primer lugar, no se utilizó disolvente dispersante, al no ser necesario para disolver la muestra cosmética debido al tratamiento previo de derivatización en fase acuosa que se llevó a cabo, como se verá más adelante. Por este motivo, aunque la superficie de contacto entre las fases dadora y aceptora también se vio incrementada por la agitación en vórtice, se prefirió utilizar en este caso el nombre de **semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice** (VALLsME, del inglés *vortex-assisted liquid-liquid semimicroextraction*) para hacer referencia a la ausencia del disolvente dispersante. En segundo lugar, se trata de una extracción líquido-líquido en fase normal, al producirse entre una fase dadora acuosa y una fase aceptora orgánica. Debido a esto, fue necesaria una etapa adicional de evaporación y reconstitución del extracto para hacerlo compatible con la técnica analítica seleccionada. En la *Figura 2.3*. se muestra un esquema del procedimiento experimental propuesto.

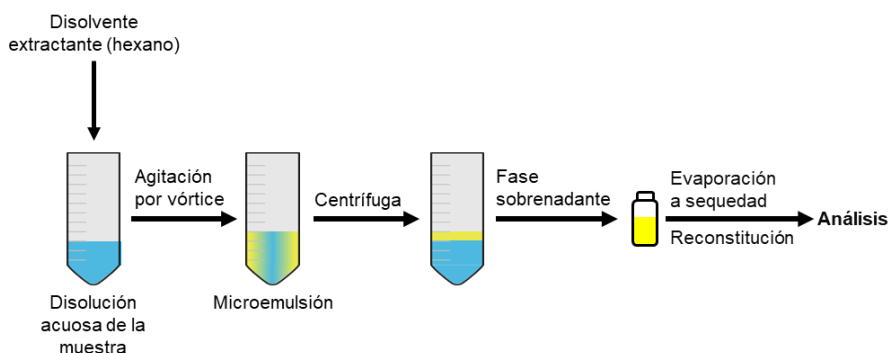


Figura 2.3. Esquema de la semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLsME).

Finalmente cabe destacar que, aunque estas técnicas propuestas suponen una miniaturización considerable frente a la LLE convencional, en los trabajos de la presente Tesis Doctoral se prefirió la denominación de “semi-microextracción” al encontrarse el volumen empleado de disolvente extractante en el intervalo de los mililitros (entre 0.5 y 1.5 mL), a diferencia de las técnicas de microextracción donde lo habitual es emplear volúmenes inferiores a 100 μ L.

2.4. MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA POR SORCIÓN SOBRE BARRA AGITADORA

La **microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora** (SBSDME, del inglés *stir bar sorptive-dispersive microextraction*) es una técnica de microextracción en fase sólida propuesta por primera vez en el año 2014 por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral [256]. Esta técnica, que combina los principios de la extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE, del inglés *stir bar sorptive extraction*) [257] y de la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE, del inglés *dispersive solid-phase extraction*) [258], consiste en una barra agitadora de neodimio recubierta de un material magnético como dispositivo de extracción, de manera que a baja velocidad de agitación, el material magnético permanece sobre la superficie de la barra agitadora de forma similar a la SBSE; mientras que a alta velocidad de agitación, el material magnético se dispersa en el seno de la fase dadora como en DSPE. Tras completarse la extracción y cesar la agitación, el material magnético conteniendo los analitos es atraído de nuevo por la barra agitadora sin necesidad de aplicar un campo magnético externo. Finalmente, los analitos extraídos pueden eluirse en un pequeño volumen de un disolvente apropiado (desorción líquida) previo a su análisis [259] o bien inyectarse directamente en el instrumento analítico mediante desorción térmica [260].

En la *Figura 2.4.* se muestra un esquema general del modo de trabajo de SBSDMI. Hasta la fecha, esta técnica se ha aplicado en el análisis de muestras medioambientales, como aguas [256,259,260] y arena de playa [261], y muy recientemente a muestras biológicas, como orina [262].

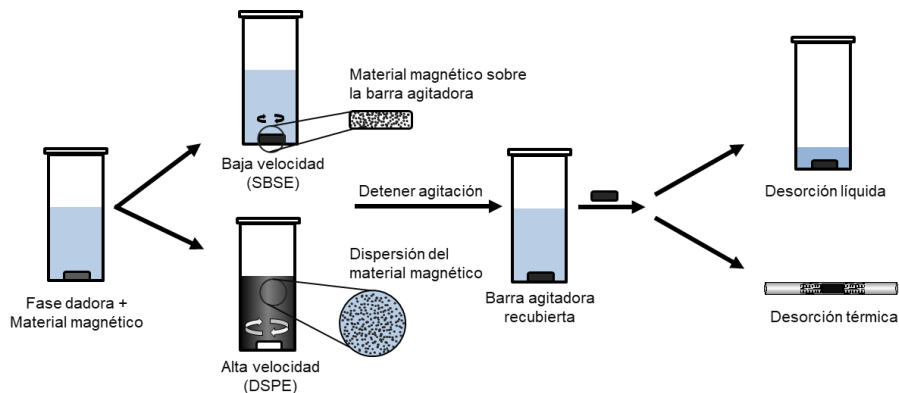


Figura 2.4. Esquema general de la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME).

Atendiendo a los sorbentes empleados, el uso de nanopartículas magnéticas (MNPs, del inglés *magnetic nanoparticles*) o de materiales compuestos (composites), formados por la unión entre MNPs y estructuras poliméricas, han ganado popularidad entre las técnicas de microextracción debido a la facilidad para recuperarlos aplicando campos magnéticos y a la posibilidad de funcionalizarlos según las propiedades de los analitos [263-266].

Recientemente, las redes metalorgánicas (MOFs, del inglés *metal-organic frameworks*) se han popularizado en el campo de las técnicas de microextracción, dado que se tratan de estructuras cristalinas micro o mesoporosas, altamente ordenadas, formadas por la unión entre iones metálicos y ligandos orgánicos mediante enlaces de coordinación que presentan interesantes propiedades para su uso como sorbentes, como una gran área superficial (200-7000 m²/g), resistencia mecánica y estabilidad térmica (300-600 °C), cavidades con porosidad uniforme (0.3-10 nm) y alta capacidad de adsorción [267,268]. Gracias a la versatilidad de los procedimientos disponibles para la síntesis de MOFs, mediante la selección de los iones metálicos y los ligandos orgánicos, existe una amplia variedad de materiales diferentes basados en MOFs. En este sentido, la elección de un determinado material magnético basado en MOFs para su uso como sorbente en SBSDME y otras técnicas de (micro)extracción está condicionado por las propiedades del MOF, ya que la función de las MNPs es únicamente aportar el magnetismo necesario para facilitar la manipulación del material. En relación al análisis de los productos cosméticos, existen dos antecedentes de aplicaciones analíticas que hacen uso de materiales basados en MOFs. El

primero de ellos, publicado por Zhai *et al.* [269] en 2014, hace uso del tereftalato de cromo(III), conocido como MIL-101(Cr), para la microextracción de hormonas mediante DSPE. El segundo trabajo, publicado por Rocío-Bautista *et al.* [270] en 2015, hace uso del trimesato de cobre(II), conocido como HKUST-1, para la microextracción de parabenos mediante VA-DSPE.

En relación a estos materiales, el MOF MIL-101(Cr) fue descrito por primera vez en el año 2005 por Férey *et al.* [271], presentando porosidad uniforme (0.3-3.4 nm), elevada área específica (5900 m²/g), estabilidad térmica hasta 275 °C y estabilidad durante varios meses frente a la exposición al aire, al agua y a disolventes orgánicos, tanto a temperatura ambiente como en condiciones solvotermales. Posteriormente, Bauer *et al.* [272] propusieron la síntesis del aminotereftalato de hierro(III), NH₂-MIL-101(Fe), y Taylor-Pashow *et al.* [273] la del tereftalato de hierro (III), MIL-101(Fe) (Figura 2.5), que requieren temperaturas de síntesis inferiores a las de sus análogos de cromo a la vez que mantienen sus interesantes propiedades.

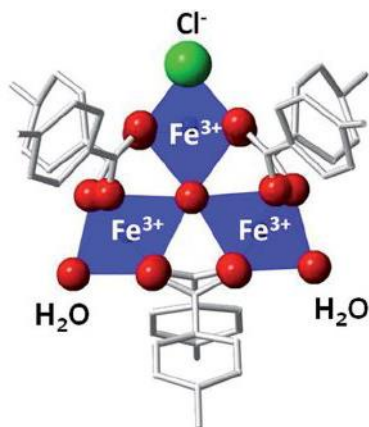


Figura 2.5. Representación de la estructura de MIL-101(Fe) (Entorno de coordinación de Fe(III), azul; O, rojo; Cl, verde; C, líneas blancas; H, omitido) [274].

Por estos motivos, tanto MIL-101(Cr) como MIL-101(Fe) ofrecen un gran potencial para su aplicación como materiales sorbentes en técnicas de microextracción en fase sólida, ya que presentan una estructura cristalina porosa con alta resistencia al aire, al agua y a disolventes orgánicos. En este sentido, su porosidad les otorga una gran área superficial y la presencia de

grupos oxigenados en su superficie hace que sean moderadamente polares, permitiendo la interacción efectiva con analitos orgánicos polares. Además, también es posible la interacción apolar π - π entre los ligandos orgánicos (ácido tereftálico) y analitos menos polares [275,276]. Atendiendo al proceso de síntesis de estos materiales y a su funcionalización con materiales magnéticos, MIL-101(Fe) puede ser sintetizado fácilmente en un proceso solvotermal que permite la fijación *in situ* de MNPs mediante interacción electrostática entre los grupos -OH superficiales y los iones metálicos [276].

En la presente Tesis Doctoral, se empleó SBSDME en el trabajo desarrollado en el Capítulo 10 para la determinación de nitrosaminas en productos cosméticos, expandiendo de este modo la aplicabilidad analítica de esta técnica de microextracción a nuevos tipos de matrices. Además, se sintetizó un nuevo composite magnético conteniendo el MOF MIL-101(Fe) [276] y MNPs de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) [277,278], que se caracterizó y se empleó como sorbente para la microextracción.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Reglamento (CE) n.º 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos.
- [2] Directiva 76/768/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos, y sus posteriores modificaciones.
- [3] Decisión 2008/721/CE de la Comisión, de 5 de agosto de 2008, por la que se crea una estructura consultiva de Comités científicos y expertos en el ámbito de la seguridad de los consumidores, la salud pública y el medio ambiente y se deroga la Decisión 2004/210/CE.
- [4] Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (CCSC), ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety
- [5] Decisión 96/335/CE de la Comisión, de 8 de mayo de 1996, por la que se establece un inventario y una nomenclatura común de ingredientes empleados en los productos cosméticos.
- [6] Decisión 2006/257/CE de la Comisión, de 9 de febrero de 2006, que modifica la Decisión 96/335/CE, por la que se establece un inventario y una nomenclatura común de ingredientes empleados en los productos cosméticos.
- [7] Comité de Expertos en Productos Cosméticos (P-SC-COS), Active ingredients used in cosmetic products: safety survey, Consejo de Europa, Estrasburgo, 2008.
- [8] M. Esti, L. Cinquanta, E. La Notte, Phenolic compounds in different olive varieties, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 32-35.
- [9] M. Brenes, A. García, P. García, J.J. Ríos, A. Garrido, Phenolic compounds in spanish olive oils, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3535-3540.
- [10] S. Silva, L. Gomes, F. Leitao, A.V. Coelho, L.V. Boas, Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves, *Food Sci. Technol. Int.* 12 (2006) 385-395.
- [11] L. Di Donna, F. Mazzotti, R. Salerno, A. Tagarelli, D. Taverna, G. Sindona, Characterization of new phenolic compounds from leaves of *Olea europaea* L. by high resolution-tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3653-3657.
- [12] R. Capasso, A. Evidente, L. Schivo, G. Orru, M.A. Marcialis, G. Cristinzi, Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste-waters, *J. Appl. Bacteriol.* 79 (1995) 393-398.
- [13] G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Ucella, A. Saija, On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 971-974.
- [14] E. Haloui, B. Marzouk, Z. Marzouk, A. Bouraoui, N. Fenina, Hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves: potent anti-inflammatory and analgesic activities, *J. Food Agric. Environ.* 9 (2011) 128-133.
- [15] R.W. Owen, A. Giacosa, W.E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalter, H. Bartsch, The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 1235-1247.
- [16] F. Visioli, A. Poli, C. Galli, Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil, *Med. Res. Rev.* 22 (2002) 65-75.

- [17] M. Pérez-Bonilla, S. Salido, T.A. van Beek, J. Altarejos, Radical-scavenging compounds from olive tree (*Olea europaea* L.) wood, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 144-151.
- [18] S. Polati, F. Gosetti, M.C. Genaro, Preservatives in cosmetics. Analytical methods, en: A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Ámsterdam, 2007, pp. 211-241.
- [19] G. Álvarez-Rivera, M. Llompart, M. Lores, C. García-Jares, Preservatives in cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods, en: A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, 2ª ed., Elsevier, Ámsterdam, 2018, pp. 175-224.
- [20] D.M. Bryce, B. Croshaw, J.E. Hall, V.R. Holland, B. Lessel, The activity and safety of the antimicrobial agent bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol), *J. Soc. Cosmet. Chem.* 29 (1978) 3-24.
- [21] J.A. Shepherd, R.D. Waigh, P. Gilbert, Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol), *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 (1988) 1693-1698.
- [22] Reglamento (UE) n.º 358/2014 de la Comisión, de 9 de abril de 2014, que modifica los Anexos II y V del Reglamento (CE) n.º 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos cosméticos.
- [23] M. Matczuk, N. Obarski, M. Mojski, The impact of various chemical and physical factors on the degradation rate of bronopol, *Int. J. Cosmet. Sci.* 34 (2012) 451-457.
- [24] K. Kajimura, T. Tagami, T. Yamamoto, S. Iwagami, The release of formaldehyde upon decomposition of 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol), *J. Health Sci.* 54 (2008) 488-492.
- [25] N. Cui, X. Zhang, Q. Xie, S. Wang, J. Chen, L. Huang, X. Qiao, X. Li, X. Cai, Toxicity profile of labile preservative bronopol in water: the role of more persistent and toxic transformation products, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 609-615.
- [26] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Opinión SCCS/1458/11, de 27 de marzo de 2012, Opinion on Nitrosamines and Secondary Amines in Cosmetic Products.
- [27] A.C. de Groot, M. Veenstra, Formaldehyde-releasers in cosmetics in the USA and in Europe, *Contact Dermat.* 62 (2010) 221-224.
- [28] A.C. de Groot, M.A. Flyvholm, G. Lensen, T. Menne, P.J. Coenraads, Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Contact allergy to formaldehyde and inventory of formaldehyde-releasers, *Contact Dermat.* 61 (2009) 63-85.
- [29] A.R. Travassos, L. Claes, L. Boey, J. Drieghe, A. Goossens, Non-fragrance allergens in specific cosmetic products, *Contact Dermat.* 65 (2011) 276-285.
- [30] G. Deza, A.M. Giménez-Arnau, Allergic contact dermatitis in preservatives: current standing and future options, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 17 (2017) 263-268.
- [31] S. Papageorgiou, A. Varvaresou, E. Tsirivas, C. Demetzos, New alternatives to cosmetics preservation, *J. Cosmet. Sci.* 61 (2010) 107-123.
- [32] M. Narayanan, P. Sekar, M. Pasupathi, T. Mukhopadhyay, Self-preserving personal care products, *Int. J. Cosmet. Sci.* 39 (2017) 301-309.

- [33] A. Herman, Antimicrobial ingredients as preservative booster and components of self-preserving cosmetic products, *Curr. Microbiol.* (2018) 1-11.
- [34] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Opinión SCCS/1582/16, de 7 de abril de 2017, Opinion on Ethylzingerone - 'Hydroxyethoxyphenyl butanone' (HEPB).
- [35] S. Silver, L. Wendt, Mechanism of action of phenethyl alcohol - breakdown of cellular permeability barrier, *J. Bacteriol.* 93 (1967) 560-566.
- [36] S. Fraud, E.L. Rees, E. Mahenthiralingam, A.D. Russell, J.Y. Maillard, Aromatic alcohols and their effect on Gram-negative bacteria, cocci and mycobacteria, *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2003) 1435-1436.
- [37] I. Slominski, G. Stoll, B. Meyer, W. Schneider, M. Waldmannlaue, B. Mayer, Synergistic antimicrobial mixt. comprises aromatic alcohols and 1,2-or 1,3-di:ol; useful esp. as preservative in cosmetic compsns, Patent EP524548-A1, 1993.
- [38] R.M. Richards, R.J. McBride, M.A. Gunn, Preliminary investigation of the preservative properties of 3-phenylpropanol, *J. Pharm. Pharmacol.* 24 (1972) 158-159.
- [39] J.A. Goodall, J. Lyall, R.J. McBride, J.B. Murray, G. Smith, A comparison of phenylpropanol (0.5-percent) with chloroform (0.25-percent) and an admixture of methyl hydroxybenzoate (0.06-percent) and propyl hydroxybenzoate (0.03-percent) as preservatives in liquid medicines, *J. Clin. Hosp. Pharm.* 5 (1980) 323-327.
- [40] E.Y. Choi, Effect of phenoxyethanol and alkane diol mixture on the antimicrobial activity and antiseptic ability in cosmetics, *Korean J. Aesthet. Cosmetol.* 13 (2015) 213-220.
- [41] W. Johnson, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D. Liebler, J.G. Marks, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Synder, F.A. Andersen, Safety assessment of 1,2-glycols as used in cosmetics, *Int. J. Toxicol.* 31 (2012) 147-168.
- [42] M. Leschke, S. Wüstermann, A reliable alternative to traditional preservative systems, *SÖFW-J.* 132 (2006) 2-4.
- [43] T.A. Gaonkar, I. Geraldo, M. Shintre, S.M. Modak, In vivo efficacy of an alcohol-based surgical hand disinfectant containing a synergistic combination of ethylhexylglycerin and preservatives, *J. Hosp. Infect.* 63 (2006) 412-417.
- [44] W. Beilfuss, M. Leschke, K. Weber, A new concept to boost the preservative efficacy of phenoxyethanol, *SÖFW-J.* 131 (2005) 2-7.
- [45] H. Okamoto, F. Okada, Microbicidal antiseptic, useful in cosmetics, pharmaceuticals and foods, is a synergic mixture of 1,2-alkanediol and tea tree oil, Patent FR2857222-A1, 2005.
- [46] J.J. Merianos, P. Garelick, S.M. Lindstrom, Antimicrobial composition useful in personal care products comprises 1,2-diol selected from 1,2-pentenediol, 1,2-hexanediol or 1,2-octanediol, phenoxyethanol and co-biocide, Patent EP1734922-A1, 2006.
- [47] Johnson & Johnson Consumer Co Inc, Combination, useful as an antimicrobial preservative system for cosmetic/personal care formulations, comprises caprylyl glycol and hinokitiol, Patent RD516001-A, 2007.
- [48] R. Pillai, J. Roeding, S. Lange, G. Schmaus, Mixture for e.g. preservation or antimicrobial treatment of perishable products comprises 1,2-hexanediol, 1,2-octanediol, potassium

sorbate, parabens, iodopropynyl butylcarbamate and optionally 1,2-pentanediol and/or 1,2-decanediol, Patent EP1804580-A1, 2007.

[49] Y.M. Chen, M. Ike, M. Fujita, Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols, *Environ. Toxicol.* 17 (2002) 80-86.

[50] W. Zhang, B. Xiong, W. Sun, S. An, K. Lin, M. Guo, X. Cui, Acute and chronic toxic effects of bisphenol A on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*, *Environ. Toxicol.* 29 (2014) 714-722.

[51] W. Chen, Y. Shen, S. Chen, Assessing bisphenol A (BPA) exposure risk from long-term dietary intakes in Taiwan, *Sci. Total Environ.* 543 (2016) 140-146.

[52] B. DeBenedictis, H. Guan, K. Yang, Prenatal exposure to bisphenol A disrupts mouse fetal liver maturation in a sex-specific manner, *J. Cell. Biochem.* 117 (2016) 344-350.

[53] C.M. Metz, Bisphenol A: Understanding the controversy, *Workplace Health Saf.* 64 (2016) 28-36.

[54] W. Qiu, Y. Zhao, M. Yang, M. Farajzadeh, C. Pan, N.L. Wayne, Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish, *Endocrinology* 157 (2016) 636-647.

[55] R.E. Dodson, M. Nishioka, L.J. Standley, L.J. Perovich, J.G. Brody, R.A. Rudel, Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products, *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 935-943.

[56] H.A. Beydoun, M.A. Beydoun, A.H. Jeng, A.B. Zonderman, S.M. Eid, Bisphenol-A and sleep adequacy among adults in the national health and nutrition examination surveys. *Sleep* 39 (2016) 467-476.

[57] C. Han, Y. Hong, Bisphenol A, hypertension, and cardiovascular diseases: Epidemiological, laboratory, and clinical trial evidence, *Curr. Hypertens. Rep.* 18 (2016) 11-13.

[58] S. Muller, P. Schmid, C. Schlatter, Evaluation of the estrogenic potency of nonylphenol in non-occupationally exposed humans, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6 (1998) 27-33.

[59] M. Zumbado, L.D. Boada, S. Torres, J.G. Monterde, B.N. Díaz-Chico, J.L. Afonso, J.J. Cabrera, A. Blanco, Evaluation of the acute hepatotoxic effects exerted by environmental estrogens nonylphenol and 4-octylphenol in immature male rats, *Toxicology* 175 (2002) 49-62.

[60] M. Seki, H. Yokota, M. Maeda, H. Tadokoro, K. Kobayashi, Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 1507-1516.

[61] E. Fasano, F. Bono-Blay, T. Cirillo, P. Montuori, S. Lacorte, Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging, *Food Control* 27 (2012) 132-138.

[62] C. Mansilha, P. Silva, S. Rocha, P. Gameiro, V. Domingues, C. Pinho, I. Ferreira, Bisphenol A migration from plastic materials: Direct insight of ecotoxicity in *Daphnia magna*, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 6007-6018.

- [63] A.M. Calafat, L. Valentin-Blasini, X. Ye, Trends in exposure to chemicals in personal care and consumer products, *Curr. Envir. Health Rep.* 2 (2015) 348-355.
- [64] A. Torres, C. Ramírez, J. Romero, G. Guerrero, X. Valenzuela, A. Guarda, M.J. Galotto, Experimental and theoretical study of bisphenol A migration from polycarbonate into regulated EU food simulant, *Eur. Food Res. Technol.* 240 (2015) 335-343.
- [65] P.M. Nagarnaik, B. Boulanger, Advanced oxidation of alkylphenol ethoxylates in aqueous systems, *Chemosphere* 85 (2011) 854-860.
- [66] A. Karci, I. Arslan-Alaton, M. Bekbolet, Advanced oxidation of a commercially important nonionic surfactant: Investigation of degradation products and toxicity, *J. Hazard. Mater.* 263 (2013) 275-282.
- [67] J.P. Van Miller, C.A. Staples, Review of the potential environmental and human health-related hazards and risks from long-term exposure to p-tert-octylphenol, *Hum. Ecol. Risk Assess.* 11 (2005) 319-351.
- [68] R. Vazquez-Duhalt, F. Marquez-Rocha, E. Ponce, A.F. Licea, M.T. Viana, Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant, *Appl. Ecol. Environ. Res.* 4 (2005) 1-25.
- [69] A. David, H. Fenet, E. Gomez, Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 953-960.
- [70] I. Lavilla, N. Cabaleiro, C. Bendicho, Main chemical contaminants in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods, en: A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, 2ª ed., Elsevier, Ámsterdam, 2018, pp. 331-383.
- [71] A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, Nitrosamines, en: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science*, 2ª ed., Elsevier, Ámsterdam, 2005, vol. 6, pp. 197-202.
- [72] Decimoquinta Directiva 92/86/CEE de la Comisión, de 21 de octubre de 1992, por la que se adaptan al progreso técnico los Anexos II, III, IV, V, VI y VII de la Directiva 76/768/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos.
- [73] T.Y. Fan, U. Goff, L. Song, D.H. Fine, G.P. Arsenault, K. Biemann, N-nitrosodiethanolamine in cosmetics, lotions and shampoos, *Food Cosmet. Toxicol.* 15 (1997) 423-430.
- [74] K.H. Beyer, W.F. Bergfeld, W.O. Berndt, R.K. Boutwell, W.W. Carlton, D.K. Hoffmann, A.L. Schroeder, Final report on the safety assessment of triethanolamine, diethanolamine and monoethanolamine, *J. Am. Coll. Toxicol.* 2 (1983) 183-235.
- [75] R.C. Schothorst, R.W. Stephany, Occurrence of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics from the Dutch market, *Int. J. Cosmet. Sci.* 23 (2001) 109-114.
- [76] S. Rath, L.S. Canaes, Contamination of cosmetics and personal care products by N-nitrosamines, *Quimica Nova* 32 (2009) 2159-2168.
- [77] K. Ikeda, K.G. Migliorese, Analysis of nitrosamines in cosmetics, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41 (1990) 283-333.
- [78] G. Eisenbrand, G.M. Blankart, H. Sommer, B. Weber, N-nitrosoalkanolamines in cosmetics, *IARC Scientific Publications* 105 (1991) 238-241.

Introducción

- [79] J.W.H. Biesterbos, T. Dudzina, C.J.E. Delmaar, M.I. Bakker, F.G.M. Russel, N. von Goetz, P.T.J. Scheepers, N. Roeleveld, Usage patterns of personal care products: important factors for exposure assessment, *Food Chem. Toxicol.* 55 (2013) 8-17.
- [80] M. Valcárcel, *Principios de Química Analítica*, Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 1999.
- [81] A. Gałuszka, P. Konieczka, Z.M. Migaszewski, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 61-72.
- [82] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78-84.
- [83] M. Valcárcel, R. Lucena, Social responsibility in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 31 (2012) 1-7.
- [84] M. Valcárcel, G.D. Christian, R. Lucena, Teaching social responsibility in analytical chemistry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6152-6161.
- [85] M. Valcárcel, R. Lucena, A quantitative model to assess social responsibility in environmental science and technology, *Sci. Total Environ.* 466 (2014) 40-46.
- [86] Directiva 98/34/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de junio de 1998, por la que se establece un procedimiento de información en materia de las normas y reglamentaciones técnicas.
- [87] European Committee for Standardization (CEN), www.cen.eu
- [88] Asociación Española de Normalización (UNE), www.une.org
- [89] Dirección Europea de Calidad del Medicamento y la Asistencia Sanitaria (EDQM), www.edqm.eu
- [90] International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org
- [91] U. Vincent, *JRC Guidelines for: 1 - Selecting and/or validating analytical methods for cosmetics. 2 - Recommending standardization steps for analytical methods for cosmetics*, Joint Research Center (JRC), Bélgica, 2015.
- [92] Comisión Europea, *Cosmetics legislation. Cosmetic products. Methods of analysis*, CosmetLex, vol. 2, Bélgica, 1999.
- [93] J.G. March, A. Salvador, A. Chisvert, Selection from bibliographic resources of an analytical method for cosmetic products: Validation of a method, en: A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, 2ª ed., Elsevier, Ámsterdam, 2018, pp. 57-66.
- [94] A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Ámsterdam, 2007.
- [95] A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, 2ª ed., Elsevier, Ámsterdam, 2018.
- [96] S. Fu, D. Arraez-Roman, A. Segura-Carretero, J.A. Menendez, M.P. Menendez-Gutierrez, V. Micol, A. Fernandez-Gutierrez, Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 643-654.

- [97] E. Tripoli, M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco, M. La Guardia, The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health, *Nutr. Res. Rev.* 18 (2005) 98-112.
- [98] K.L. Tuck, P.J. Hayball, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 636-644.
- [99] S. McDonald, P.D. Prenzler, M. Antolovich, K. Robards, Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts, *Food Chem.* 73 (2001) 73-84.
- [100] H.K. Obied, M.S. Allen, D.R. Bedgood, P.D. Prenzler, K. Robards, R. Stockmann, Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 823-837.
- [101] E.S. Aktas, S. Imre, L. Esroy, Characterization and lime treatment of olive mil wastewater, *Water Res.* 35 (2001) 2336-2340.
- [102] F. Ortega-Garcia, J. Peragon, HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tirosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv. Picual during ripening, *J. Sci. Food Agric.* 90 (2010) 2295-2300.
- [103] L.Q. Peng, Q. Li, Y.X. Chang, M.R. An, R. Yang, Z.J. Tan, J. Hao, J. Cao, J.J. Xu, S.S. Hu, Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1456 (2016) 68-76.
- [104] H. Habibi, A. Mohammadi, M. Farhoodi, S. Jazaeri, Application and optimization of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of oleuropein and hydroxytyrosol in olive pomace, *Food Anal. Method.* 11 (2018) 3078-3088.
- [105] M. Rambla-Alegre, S. Marco-Peiro, J. Peris-Vicente, B. Beltran-Martinvarro, M.A. Collado-Sanchez, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, Analytical determination of hydroxytyrosol in olive extract samples by micellar liquid chromatography, *Food Chem.* 129 (2011) 614-618.
- [106] P. Hashemi, F.N. Serenkeh, A.R. Ghiasvand, Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with multivariate optimization for sensitive HPLC determination of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil, *Anal. Sci.* 27 (2011) 943-947.
- [107] M.P. Godoy-Caballero, M.I. Acedo-Valenzuela, T. Galeano-Diaz, New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 291-301.
- [108] M. Ricciutelli, S. Marconi, M.C. Boarelli, G. Caprioli, G. Sagratini, R. Ballini, D. Fiorini, Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim, *J. Chromatogr. A* 1481 (2017) 53-63.
- [109] L. Bartella, F. Mazzotti, A. Napoli, G. Sindona, L. Di Donna, A comprehensive evaluation of tyrosol and hydroxytyrosol derivatives in extra virgin olive oil by microwave-assisted hydrolysis and HPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2193-2201.

- [110] M. Bonoli, M. Montanucci, T.G. Toschi, G. Lercker, Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection, *J. Chromatogr. A* 1101 (2003) 163-172.
- [111] M. del Pilar Godoy-Caballero, M. Isabel Acedo-Valenzuela, T. Galeano-Díaz, A. Costa-García, M. Teresa Fernández-Abedul, Microchip electrophoresis with amperometric detection for a novel determination of phenolic compounds in olive oil, *Analyst* 137 (2012) 5153-5160.
- [112] M. del Pilar Godoy-Caballero, T. Galeano-Díaz, M. Isabel Acedo-Valenzuela, Simple and fast determination of phenolic compounds from different varieties of olive oil by nonaqueous capillary electrophoresis with UV-visible and fluorescence detection, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 3529-3539.
- [113] R. Paula Monasterio, M. de los Angeles Fernández, M. Fernanda Silva, High-throughput determination of phenolic compounds in virgin olive oil using dispersive liquid-liquid microextraction-capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 34 (2013) 1836-1843.
- [114] E. Fernández, L. Vidal, A. Canals, Rapid determination of hydrophilic phenols in olive oil by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and screen-printed carbon electrodes, *Talanta* 181 (2018) 44-51.
- [115] EN 16342:2013, Quantitative determination of zinc pyrithione, piroctone olamine and climbazole in surfactant containing cosmetic anti-dandruff products.
- [116] EN 16343:2013, Determination of 3-iodo-2-propinyl butylcarbamate (IPBC) in cosmetic preparations, LC-MS methods.
- [117] Segunda Directiva 82/434/CEE de la Comisión, de 14 de mayo de 1982, sobre la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros relativas a los métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos.
- [118] Cuarta Directiva 85/490/CEE de la Comisión, de 11 de octubre de 1985, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos.
- [119] Quinta Directiva 93/73/CEE de la Comisión, de 9 de septiembre de 1993, relativa a los métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos.
- [120] Sexta Directiva 95/32/CE de la Comisión, de 7 de julio de 1995, relativa a los métodos de análisis necesarios para el control de la composición de los productos cosméticos.
- [121] Séptima Directiva 96/45/CE de la Comisión, de 2 de julio de 1996, relativa a los métodos de análisis necesarios para comprobar la composición de los productos cosméticos.
- [122] V. Ferioli, F. Vezzalini, C. Rustichelli, G. Gambernini, Determination of bronidox and bronopol in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Farmaco* 47 (1992) 833-839.
- [123] J. Hu, J. Wang, Determination of eleven preservatives including bronopol in cosmetic by reversed-phase ion-pair chromatography, *Chin. J. Chromatogr.* 17 (1999) 495-497.
- [124] H.F. Wang, G.J. Provan, K. Helliwell, Determination of bronopol and its degradation products by HPLC, *J. Pharmaceut. Biomed.* 29 (2002) 387-392.

- [125] E. Marengo, V. Gianotti, S. Angioi, M.C. Gennaro, Optimization by experimental design and artificial neural networks of the ion-interaction reversed-phase liquid chromatographic separation of twenty cosmetic preservatives, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 57-65.
- [126] J.W. Weyland, A. Stern, J. Rooselaar, Determination of bronopol, bronidox and methylidibromo glutaronitrile in cosmetics by liquid chromatography with electrochemical detection, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1132-1136.
- [127] S. Scalia, S. Simeoni, E. Bousquet, Determination of bronopol in cosmetic products by HPLC with electrochemical detection, *Pharmazie* 56 (2001) 318-320.
- [128] L. Bendahl, S.H. Hansen, B. Gammergaard, S. Sturup, C. Nielsen, Hyphenation of ultra performance liquid chromatography (UPLC) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for fast analysis of bromine containing preservatives, *J. Pharmaceut. Biomed.* 40 (2006) 648-652.
- [129] T. Wu, C. Wang, X. Wang, Q. Ma, Simultaneous determination of 21 preservatives in cosmetics by ultra performance liquid chromatography, *Int. J. Cosmet. Sci.* 30 (2006) 367-372.
- [130] T. Nash, The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, *Biochem. J.* 55 (1953) 416-421.
- [131] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 292 (2009) 809-833.
- [132] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84-98.
- [133] R. Costa, Newly introduced sample preparation techniques: towards miniaturization, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44 (2014) 299-310.
- [134] R.T. Rivero, V. Topiwala, Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using combined headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography, *J. Cosmet. Sci.* 55 (2004) 343-350.
- [135] R.T. Rivero, V. Topiwala, Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using a combined solid-phase microextraction-isotope dilution mass spectrometry method, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 217-222.
- [136] P.A. Martos, J. Pawliszyn, Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization, *Anal. Chem.* 70 (1990) 2311-2320.
- [137] I. Lavilla, N. Cabaleiro, F. Pena, I. de la Calle, C. Bendicho, Ultrasound-assisted emulsification microextraction with simultaneous derivatization coupled to fibre optics-based cuvetteless UV-vis micro-spectrophotometry for formaldehyde determination in cosmetic samples, *Anal. Chim. Acta* 674 (2010) 59-63.
- [138] P.F. Brandao, R.M. Ramos, J.A. Rodrigues, GDME-based methodology for the determination of free formaldehyde in cosmetics and hygiene products containing formaldehyde releasers, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6873-6880.
- [139] N.K. Temel, R. Gurkan, Combination of ultrasound-assisted cloud-point extraction with spectrophotometry for extraction, preconcentration, and determination of low levels of free formaldehyde from cosmetic products, *J. AOAC Int.* 101 (2018) 1763-1772.

- [140] M. Vilanova, C. Martinez, First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* cv. Castanal grow in Galicia (NW Spain), *Eur. Food Res. Technol.* 224 (2007) 431-436.
- [141] E. Coelho, R. Perestrelo, N.R. Neng, J.S. Camara, M.A. Coimbra, J.M.F. Nogueira, S.M. Rocha, Optimisation of stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volumen injection-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry for the determination of volatile compounds in wines, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 79-89.
- [142] A. Angioni, G. Pintore, P. Caboni, Determination of wine aroma compounds by dehydration followed by GC/MS, *J. AOAC Int.* 95 (2012) 813-819.
- [143] M. Li, Z. Yang, J. Hao, L. Shan, J. Dong, Determination of tyrosol, 2-phenethyl alcohol, and tryptophol in beer by high-performance liquid chromatography, *J. Am. Soc. Bew. Chem.* 66 (2008) 245-249.
- [144] J. Hrivnak, D. Smogrovicova, P. Nadasky, J. Lakatosova, Determination of beer aroma compounds using headspace solid-phase microcolumn extraction, *Talanta* 83 (2010) 294-296.
- [145] J.H. Kahn, H.A. Conner, Alcoholic beverages. Rapid gas-liquid chromatographic determination of phenethyl alcohol in alcoholic distillates, *J. AOAC Int.* 55 (1972) 1155-1158.
- [146] R. Arla, K. Koumaravelou, Development and validation of stability-indicating gas chromatography method for the quantitative determination of ethylhexylglycerin and its impurities in bulk and pharmaceutical dosage forms, *Asian J. Pharm.* 12 (2018) S243-S250.
- [147] A.G. Asimakopoulos, N.S. Thomaidis, M.A. Koupparis, Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol, *Toxicol. Lett.* 210 (2012) 141-154.
- [148] H. Nakazawa, Y. Iwasaki, R. Ito, Analytical methods for the quantification of bisphenol A, alkylphenols, phthalate esters, and perfluorinated chemicals in biological samples, *Anal. Sci.* 30 (2014) 25-34.
- [149] I. Jimenez-Diaz, F. Vela-Soria, R. Rodriguez-Gomez, A. Zafra-Gomez, O. Ballesteros, A. Navalon, Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: A review, *Anal. Chim. Acta* 892 (2015) 27-48.
- [150] N. Caballero-Casero, L. Lunar, S. Rubio, Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids: A review, *Anal. Chim. Acta* 908 (2016) 22-53.
- [151] N. Salgueiro-Gonzalez, M.J. Lopez de Alda, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodriguez, D. Barcelo, Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles, *Trends Anal. Chem.* 66 (2015) 45-52.
- [152] N. Salgueiro-Gonzalez, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, Trends in analytical methodologies for the determination of alkylphenols and bisphenol A in water samples, *Anal. Chim. Acta* 962 (2017) 1-14.
- [153] N. Salgueiro-Gonzalez, S. Castiglioni, E. Zuccato, I. Turnes-Carou, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo, Recent advances in analytical methods for the determination of 4-alkylphenols and bisphenol A in solid environmental matrices: A critical review, *Anal. Chim. Acta* 1024 (2018) 39-51.

- [154] R. Zhu, W. Zhao, M. Zhai, F. Wei, Z. Cai, N. Sheng, Q. Hu, Moleculrarily imprinted layer-coated silica nanoparticles for selective solid-phase extraction of bisphenol A from chemical cleansing and cosmetic samples, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 209-216.
- [155] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Vinas, M. Hernandez-Cordoba, Stir bar sorptive extraction with EG-Silicone coating for bisphenols determination in personal care products by GC-MS, *J. Pharmaceut. Biomed.* 78-79 (2013) 255-260.
- [156] H. Shaaban, A. Mostafa, W. Alhajri, L. Almubarak, K. Al Khalifah, Development and validation of an eco-friendly SPE-HPLC-MS method for the simultaneous determination of selected parabens and bisphenol A in personal care products: Evaluation of the greenness profile of the developed method, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 41 (2018) 621-628.
- [157] M.S. Chang, J.Y. Shen, S.H. Yang, G.J. Wu, Determination of three endocrine disrupting chemicals, triclosan, 4-n-nonylphenol, and di-n-butyl phthalate using stir bar sorptive extraction in samples of different matrices, *Toxicol. Environ. Chem.* 94 (2012) 1027-1033.
- [158] C. Liao, K. Kannan, A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2014) 50-59.
- [159] C. Esteve, L. Herrero, B. Gomara, J.E. Quintanilla-Lopez, Fast and simultaneous determination of endocrine disrupting compounds by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 146 (2016) 326-334.
- [160] ISO 10130:2009, Nitrosamines: Detection and determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics by HPLC, post-column photolysis and derivatization.
- [161] ISO 15819:2014, Nitrosamines: Detection and determination of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics by HPLC-MS-MS.
- [162] D. Klein, A.M. Girard, J. Desmedt, Y. Fellion, G. Debry, Analysis of nitrosodiethanolamine in cosmetic products, *Food Cosmet. Toxicol.* 19 (1981) 233-235.
- [163] J.L. Ho, H.H. Wineski, R.L. Yates, High-pressure liquid-chromatographic thermal-energy determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics, *J. Assoc. Off. Ana. Chem.* 64 (1981) 800-804.
- [164] I.E. Rosenberg, J. Gross, T. Spears, P. Rahn, Analysis of nitrosamines in cosmetic raw-materials and finished product by high-pressure liquid-chromatography, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 31 (1980) 237-252.
- [165] R. Schwarzenbach, J.P. Schmid, Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics: high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as alternative methods to chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A* 472 (1989) 231-242.
- [166] C. Flower, S. Carter, A. Earls, R. Flower, S. Hewlins, S. Lalljie, M. Lefebvre, J. Mavro, D. Small, N. Volpe, A method for the determination of N-nitrosodiethanolamine in personal care products - collaboratively evaluated by the CTPA Nitrosamines Working Group, *Int. J. Cosmet. Sci.* 28 (2006) 21-33.
- [167] A. Chisvert, J.L. Benedé, M. Peiró, I. Pedrón, A. Salvador, Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography, *Talanta* 166 (2017) 81-86.

- [168] R.C. Schothorst, H.H.J. Somers, Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by LC-MS-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 681-685.
- [169] A. Ghassempour, M. Abbaci, Z. Talebpour, B. Spengler, A. Roempp, Monitoring of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by ion-pair complex liquid chromatography and identification with negative ion electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 43-48.
- [170] K.M. Joo, M.S. Shin, J.H. Jung, B.M. Kim, J.W. Lee, H.J. Jeong, K.M. Lim, Determination of N-nitrosodiethanolamine, NDELA in cosmetic ingredients and products by mixed mode solid phase extraction and UPLC-tandem mass spectrometry with porous graphitic carbon column through systemic sample pre-cleanup procedure, *Talanta* 137 (2015) 109-119.
- [171] G. Abedi, Z. Talebpour, Modified QuEChERS as novel sample preparation method for analysis of N-nitrosodiethanolamine in shampoo by high performance liquid chromatography, *Anal. Methods* 9 (2017) 5165-5173.
- [172] S.K. Vohra, G.W. Harrington, Chromatopolarography of N-nitrosamines including the determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products, *Food Cosmet. Toxicol.* 19 (1981) 485-487.
- [173] D.B. Black, R.C. Lawrence, E.G. Edward, J.R. Watson, Gas-liquid chromatographic-thermal energy analyzer method for N-nitrosodiethanolamine in cosmetics, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64 (1981) 1474-1478.
- [174] H. Sommer, M. Blankart, G. Eisenbrand, Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics and in alkanolamines - results of collaborative studies. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189 (1989) 144-146.
- [175] S.S.H. Davarani, L. Masoomi, M.H. Banitaba, H.R.L.Z. Zhad, O. Sadeghi, A. Samiei, Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by headspace solid phase microextraction using a novel aluminium hydroxide grafted fused silica fiber followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis, *Talanta* 105 (2013) 347-353.
- [176] S.W. Collier, S.R. Milstein, D.S. Orth, K. Jayasimhulu, Quantitative assay of volatile and non-volatile N-nitrosamines by gas-chromatography with an electrolytic conductivity detector. 1. Method development and assay of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in creams and lotions, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 39 (1988) 329-346.
- [177] B. Rollmann, P. Lombart, J. Rondelet, M. Mercier, Determination of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics by gas-chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr.* 206 (1981) 158-163.
- [178] M.T. Matyska, J.J. Pesek, L. Yang, Screening method for determining the presence of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics by open-tubular capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 497-503.
- [179] H. Sommer, G. Eisenbrand, A method for the determination of N-nitrosoalkanolamines in cosmetics, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186 (1988) 235-238.
- [180] H. Sommer, H.P. Loeffler, G. Eisenbrand, A method to determine N-nitrosoalkanolamines in alkanolamines, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 39 (1988) 133-137.

- [181] H. Dong, X. Guo, Y. Xian, H. Luo, B. Wang, Y. Wu, A salting out-acetonitrile homogeneous extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of thirteen N-nitrosamines in skin care cosmetics, *J. Chromatogr. A* 1422 (2015) 82-88.
- [182] N.R. Choi, Y.P. Kim, W.H. Ji, G.S. Hwang, Y.G. Ahn, Identification and quantification of seven volatile N-nitrosamines in cosmetics using gas chromatography/chemical ionization-mass spectrometry coupled with headspace-solid phase microextraction, *Talanta* 148 (2016) 69-74.
- [183] Q. Ma, H.W. Xi, C. Wang, H. Bai, G.C. Xi, N. Su, L.Y. Xu, J.B. Wang, Determination of 10 volatile nitrosamines in cosmetics by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Chinese J. Anal. Chem.* 39 (2011) 1201-1207.
- [184] T.A. Meyer, J.B. Powell, Quantitation of the nitrosamine 2-ethylhexyl-4-(N-methyl-N-nitroso) benzoate (NPABAO) in sunscreen products, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (1991) 766-771.
- [185] S.M. Billedeau, T.M. Heinze, J.G. Wilkes, H.C. Thompson, Application of the particle-beam interface to high-performance liquid-chromatography thermal-energy analysis and electron-impact mass spectrometry for detection of nonvolatile N-nitrosamines, *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 55-65.
- [186] L.H. Wang, H.C. Hsia, C.C. Wang, Simultaneous determination of five volatile and non-volatile N-nitrosamines in biological fluids and cosmetic products by liquid chromatography with photodiode array detection, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 1737-1751.
- [187] F. Liu, Y. Xian, J. Chen, H. Dong, H. Liu, X. Guo, M. Chen, H. Li, Determination of eleven volatile N-nitrosamines in skin care cosmetics using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive clean-up sorbent and ultrahigh-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 8 (2016) 4245-4253.
- [188] R.M. Smith, Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3-27.
- [189] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de separación en Química Analítica*, Síntesis, Madrid, 2002.
- [190] F. Pena-Pereira, A. Rulka, P. Mitchel, *Miniaturization in sample preparation*, F. Pena-Pereira (Ed.), De Gruyter Open, Varsovia/Berlín, 2014.
- [191] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565-574.
- [192] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, Liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1-14.
- [193] A. Chisvert, The large tentacles of liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 3 (2012) 3-7.
- [194] M. Rezaee, Y. Assadi, M.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.

- [195] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1271 (2010) 2342-2357.
- [196] A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, M.A. Rodriguez-Delgado, Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 728-751.
- [197] A. Zgoła-Grzeskowiak, T. Grzeskowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1382-1399.
- [198] V. Andrich, I.S. Balogh, L. Kocurova, J. Sandrejova, Five years of dispersive liquid-liquid microextraction, *Appl. Spectrosc. Rev.* 48 (2013) 161-259.
- [199] H.Y. Yan, H. Wang, Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1295 (2013) 1-15.
- [200] M. Saraji, M.K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2027-2066.
- [201] M.I. Leong, M.R. Fuh, S.D. Huang, Beyond dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1335 (2014) 2-14.
- [202] L. Kocurova, I.S. Balogh, J. Sandrejova, V. Andrich, Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, *Microchem J.* 102 (2012) 11-17.
- [203] M.J. Trujillo-Rodriguez, P. Rocio-Bautista, V. Pino, A.M. Afonso, Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction, *Trends Anal. Chem.* 51 (2013) 87-106.
- [204] P.J. Zhang, L. Hu, R.H. Lu, W.F. Zhou, H.X. Gao, Application of ionic liquids for liquid-liquid microextraction, *Anal. Methods* 5 (2013) 5376-5385.
- [205] I. Rykowska, J. Ziemblinska, I. Nowak, Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review, *J. Mol. Liq.* 259 (2018) 319-339.
- [206] P. Hashemi, F. Raeisi, A.R. Ghiasvand, A. Rahimi, Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein, *Talanta* 80 (2010) 1926-1931.
- [207] S. Liu, Q. Xie, J. Chen, J. Sun, H. He, X. Zhang, Development and comparison of two dispersive liquid-liquid microextraction techniques coupled to high performance liquid chromatography for the rapid analysis of bisphenol A in edible oils, *J. Chromatogr. A* 1295 (2013) 16-23.
- [208] M. Hosseini, R. Heydari, M. Alimoradi, Reversed-phase vortex-assisted liquid-liquid microextraction: a new sample preparation method for the determination of amygdalin in oil and kernel samples, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 663-669.
- [209] N. Goudarzi, S. Farsimadan, M.A. Chamjangali, G.A. Bagherian, Development of coupled ultrasound-assisted and reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction before high-performance liquid chromatography for the sensitive determination of vitamin A and vitamin E in oil samples, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3254-3261.
- [210] M. Ziyaadini, M.M. Zahedi, S. Khosravinia, Ultrasound-assisted extraction combined with reverse phase-dispersive liquid-liquid microextraction as new approach for preconcentration

and spectrophotometric determination of total phenol in marine sediments of Chabahar Bay, *Mar. Pollut. Bull.* 109 (2016) 104-109.

[211] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovolas, N. Kalogerakis, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A, *Talanta* 80 (2010) 2057-2062.

[212] K.J. Huang, H. Wang, M. Ma, M.L. Sha, H.S. Zhang, Ultrasound-assisted liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide produced in PC12 cells using 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dicarboxy-8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiazas-indacene, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 193-201.

[213] S. Cabredo-Pinillos, T. Cedron-Fernandez, M. Gonzalez-Briongos, L. Puente-Pascual, C. Saenz-Barrio, Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method, *Talanta* 69 (2006) 1123-1129.

[214] J.A. Perez-Serradilla, F. Priego-Capote, J.A. Luque de Castro, Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6767-6774.

[215] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J.C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27-38.

[216] A.R. Fontana, R. Wuilloud, L.D. Martinez, J.C. Altamirano, Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 147-153.

[217] J.F. Wu, B.R. Xiang, J. Xia, Application of ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with high performance liquid chromatography to the determination of propoxur in environmental and beverage samples, *Microchim. Acta* 166 (2009) 157-162.

[218] S. Ozcan, A. Tor, M.E. Aydin, Application of ultrasound-assisted emulsification-microextraction for the analysis of organochlorine pesticides in waters, *Water Res.* 43 (2009) 4269-4277.

[219] A. Saleh, Y. Yamini, M. Faraji, M. Rezaee, M. Ghambarian, Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6673-6679.

[220] J. Regueiro, M. Llompart, E. Psillakis, J.C. Garcia-Monteagudo, C. Garcia-Jares, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of phenolic preservatives in water, *Talanta* 79 (2009) 1387-1397.

[221] M.M. Delgado-Povedano, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted extraction and in situ derivatization, *J. Chromatogr. A* 1296 (2013) 226-234.

[222] A. Szreniawa-Sztajnert, B. Zabiegała, J. Namiesnik, Developments in ultrasound-assisted microextraction techniques for isolation and preconcentration of organic analytes from aqueous samples, *Trends Anal. Chem.* 49 (2013) 45-54.

- [223] F. Kamarei, H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, Optimization of ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the analysis of phthalate esters in cosmetics and environmental water samples, *Microchem. J.* 99 (2011) 26-33.
- [224] N. Cabaleiro, F. Pena-Pereira, I. de la Calle, C. Bendicho, I. Lavilla, Determination of triclosan by cuvetteless UV-vis micro-spectrophotometry following simultaneous ultrasound-assisted emulsification microextraction with derivatization: Use of a micellar-ionic liquid as extractant, *Microchem. J.* 99 (2011) 246-251.
- [225] Y. Yamini, A. Saleh, M. Rezaee, L. Ranjbar, M. Moradi, Ultrasound-assisted emulsification microextraction of various preservatives from cosmetics, beverages, and water samples, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 2623-2642.
- [226] J. Perez-Outerual, E. Millan, R. Garcia-Arrona, Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of fragrance allergens in cosmetics and water, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 1561-1569.
- [227] T. Ma, Z. Li, Q. Jia, W.H. Zhou, Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid emulsification microextraction coupled with capillary electrophoresis for the determination of parabens in personal care products, *Electrophoresis* 37 (2016) 1624-1631.
- [228] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, Ultrasound-assisted preparation of liquid samples, *Talanta* 72 (2007) 321-334.
- [229] E. Psillakis, D. Mantzavinos, N. Kalogerakis, Monitoring the sonochemical degradation of phthalate esters in water using solid-phase microextraction, *Chemosphere* 54 (2004) 849-857.
- [230] L. Sanchez-Prado, R. Barro, C. Garcia-Jares, M. Llompart, M. Lores, C. Petrakis, N. Kalogerakis, D. Mantzavinos, E. Psillakis, Sonochemical degradation of triclosan in water and wastewater, *Ultrason. Sonochem.* 15 (2008) 689-694.
- [231] Z.X. Zhong, G.K. Li, R. Wu, Z.B. Luo, B.H. Zhu, Y.J. Shao, Rapid determination of trace phenols migrating into drinking water from plastic-based pipe materials and household water treatment equipment using vortex-assisted emulsification microextraction, *Anal. Methods* 6 (2014) 3482-3489.
- [232] P. Rocio-Bautista, V. Pino, B. Delgado, A.M. Afonso, J.H. Ayala, Vortex-assisted emulsification microextraction followed by in-syringe ultrasound-assisted back-microextraction to determine haloacetic acids in waters, *Anal. Methods* 6 (2014) 4115-4123.
- [233] P. Gonzalez-Hernandez, V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, A simplified vortex-assisted emulsification microextraction method for determining personal care products in environmental water samples by ultra-high-performance liquid chromatography, *Anal. Methods* 7 (2015) 1825-1833.
- [234] M. Asadi, Determination of ochratoxin A in fruit juice by high-performance liquid chromatography after vortex-assisted emulsification microextraction based on solification of floating organic drop, *Mycotoxin Res.* 34 (2018) 15-20.
- [235] Z. Yang, Y. Lu, Y. Liu, T. Wu, Z. Zhou, D. Liu, Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7071-7077.

- [236] R.H. Li, D.H. Liu, Z.H. Yang, Z.Q. Zhou, P. Wang, Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in water samples by microemulsión electrokinetic chromatography, *Electrophoresis* 33 (2012) 2176-2183.
- [237] Z.H. Yang, D.H. Liu, W.T. Zhao, T. Wu, Z.Q. Zhou, P. Wang, Low-density solvent-based vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction and its application, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 916-922.
- [238] M. Eftekhari, M. Chamsaz, M.H. Arbab-Zavar, A. Eftekhari, Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification microextraction based on solidification of floating organic drop followed by electrothermal atomic absorption spectrometry for speciation of antimony (III,V), *Environ. Monit. Asses.* 187 (2015) 4129.
- [239] X.C. Chen, X.W. You, F.M. Liu, X. Zhang, Low-density solvent based vortex-assisted surfactant enhanced emulsification microextraction with a home-made extraction device for the determination of four herbicides residues in river water, *Anal. Methods* 7 (2015) 9513-9519.
- [240] A. Asati, G.N.V. Satyanarayana, D.K. Patel, Vortex-assisted surfactant enhanced emulsification microextraction combined with LC-MS/MS for the determination of glucocorticoids in water with the aid of experimental design, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2905-2918.
- [241] Y.F. Zhang, H.K. Lee, Low-density solvent-based vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the fast determination of phthlate esters in bottled water, *J. Chromatogr. A* 1274 (2013) 28-35.
- [242] J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijarani, Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction with solification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides, *Talanta* 117 (2013) 221-228.
- [243] G. Leng, W.J. Chen, M.F. Zhang, F. Huang, Q.M. Cao, Determination of phthlate esters in liquor samples by vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction followed by GC-MS, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 684-690.
- [244] J. Donthuan, S. Yunchalard, S. Srijaranai, Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction of biogenic amines in fermented foods before their simultaneous determination analysis by high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3164-3173.
- [245] J. Vichapong, Y. Santaladchaiyakit, R. Burakham, W. Kanchanamayoon, S. Srijaranai, Determination of benzimidazole anthelmintics using HPLC after vortex-assisted mixed anionic-cationic surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet procedure, *J. Food Compos. Anal.* 37 (2015) 30-37.
- [246] D. Moreno-Gonzalez, J.F. Huertas-Perez, A.M. Garcia-Campana, L. Gamiz-Garcia, Vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction for the determination of carbamates in juices by micellar electrokinetic chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta* 139 (2015) 174-180.

- [247] Y. Santaladchaiyakit, J. Bunchamnan, D. Tongsa, S. Srijaranai, Methyl salicylate-based vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction and HPLC for determination of fungicides in honey samples, *Acta Chim. Slov.* 64 (2017) 849-857.
- [248] M. Asadi, A.M.H. Shabani, S. Dadfarnia, B. Abbasi, Vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on solification of floating organic drop combined with high performance liquid chromatography for the determination of naproxen and nabumetone, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 17-24.
- [249] D. Wei, Z.H. Huang, S.L. Wang, Z.F. Guo, J. Li, Determination of herbicides in milk using vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of a floating organic droplet, *Food Anal. Methods* 9 (2016) 427-436.
- [250] V. Andruch, M. Burdel, L. Korucova, J. Sandrejova, I.S. Balogh, Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction, *Trends Anal. Chem.* 49 (2013) 1-19.
- [251] M. Moradi, Y. Yamini, B. Ebrahimpour, Emulsion-based liquid-phase microextraction: a review, *J. Iran. Chem. Soc.* 11 (2014) 1087-1101.
- [252] A. Spietelun, L. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namiesnik, Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques, *Talanta* 119 (2014) 34-45.
- [253] C.B. Ojeda, F.S. Rojas, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction (VALLME): Applications, *Chromatographia* 77 (2014) 745-754.
- [254] C.B. Ojeda, F.S. Rojas, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction (VALLME): The latest applications, *Chromatographia* 81 (2018) 89-103.
- [255] E. Psillakis, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction revisited, *Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 332-339.
- [256] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25-33.
- [257] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C.A. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737-747.
- [258] M. Anastasiades, S.J. Lehotay, D. Stainbaier, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431.
- [259] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic compounds in aqueous media, *Anal. Chim. Acta* 926 (2016) 63-71.
- [260] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive-dispersive microextraction coupled to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 147 (2016) 246-252.

- [261] J.L. Benedé, A. Chisvert, C. Moyano, D.L. Giokas, A. Salvador, Expanding the application of stir bar sorptive-dispersive microextraction approach to solid matrices: Determination of ultraviolet filters in coastal sand samples, *J. Chromatogr. A* 1564 (2018) 25-33.
- [262] J. Grau, J.L. Benedé, J. Serrano, A. Segura, A. Chisvert, Stir bar sorptive-dispersive microextraction for trace determination of triphenyl and diphenyl phosphate in urine of nail polish users, *J. Chromatogr. A* 1593 (2019) 9-16.
- [263] K. Aguilar-Arteaga, J.A. Rodríguez, E. Barrado, Magnetic solids in analytical chemistry: a review, *Anal. Chim. Acta* 674 (2010) 157-165.
- [264] X. Li, G. Zhu, Y. Luo, B. Yuan, Y. Feng, Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 233-247.
- [265] A. Ríos, M. Zougagh, Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes, *Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 72-83.
- [266] A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena, Dispersive micro-solid phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 226-233.
- [267] P. Rocío-Bautista, P. González-Hernández, V. Pino, J. Pasán, A.M. Afonso, Metal-organic frameworks as novel sorbents in dispersive-based microextraction approaches, *Trends Anal. Chem.* 90 (2017) 114-134.
- [268] F. Maya, C. Palomino Cabello, R.M. Frizzarin, J.M. Estela, G. Turnes Palomino, V. Cerdà, Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons, *Trends Anal. Chem.* 90 (2017) 142-152.
- [269] Y. Zhai, N. Li, L. Lei, X. Yang, H. Zhang, Dispersive micro-solid-phase extraction of hormones in liquid cosmetics with metal-organic framework, *Anal. Methods* 6 (2014) 9435-9445.
- [270] P. Rocío-Bautista, C. Martínez-Benito, V. Pino, J. Pasan, J.H. Ayala, C. Ruiz-Pérez, A.M. Afonso, The metal-organic framework HKUST-1 as efficient sorbent in a vortex-assisted dispersive micro solid-phase extraction of parabens from environmental waters, cosmetic creams, and human urine, *Talanta* 139 (2015) 13-20.
- [271] G. Férey, C. Mellot-Draznieks, C. Serre, F. Millange, J. Dutour, S. Surblé, I. Margiolaki, A chromium terephthalate-based solid with unusually large pore volumes and surface area, *Science* 309 (2005) 2040-2042.
- [272] S. Bauer, C. Serre, T. Devic, P. Horcajada, J. Marrot, G. Férey, N. Stock, High-throughput assisted rationalization of the formation of metal organic frameworks in the iron(III) aminoterephthalate solvothermal system, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 7568-7576.
- [273] K.M.L. Taylor-Pashow, J. Della Roca, Z. Xie, S. Tran, W. Lin, Postsynthetic modifications on iron-carboxylate nanoscale metal-organic frameworks for imaging and drug delivery, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 14261-14263.
- [274] J. Shin, M. Kim, J. Cirera, S. Chen, G.J. Halder, T.A. Yersak, F. Paesani, S.M. Cohen, Y.S. Meng, MIL-101(Fe) as a lithium-ion battery electrode material: a relaxation and intercalation mechanism during lithium insertion, *J. Mater. Chem. A* 3 (2015) 4738-4744.

Introducción

[275] I.Y. Skobelev, A.B. Sorokin, K.A. Kovalenko, V.P. Fedin, O.A. Kholdeeva, Solvent-free allylic oxidation of alkenes with O₂ mediated by Fe- and Cr-MIL-101, *J. Catal.* 298 (2013) 61-69.

[276] S. Zhang, Z. Jiao, W. Yao, A simple solvothermal process for fabrication of metal-organic framework with an iron oxide enclosure for the determination of organophosphorus pesticides in biological samples, *J. Chromatogr. A* 1371 (2014) 74-81.

[277] K. Maaz, A. Mumtaz, S.K. Hasanain, A. Ceylan, Synthesis and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles prepared by wet chemical route, *J. Magn. Magn. Mater.* 308 (2007) 289-295.

[278] I.P. Román, A. Chisvert, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2467-2475.

SECCIÓN II

RESUMEN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE HIDROXITIRO SOL Y TIROSOL MEDIANTE LIXIVIACIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS O SEMI-MICROEXTRACCIÓN CON FORMACIÓN DE EMULSIÓN ASISTIDA POR VÓRTICE Y CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS BASADOS EN EXTRACTOS PROCEDENTES DE LA OLIVA

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 102 (2015) 157-161; y presentado en forma de cartel en las 14^{as} *Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona (2014).

INTRODUCCIÓN

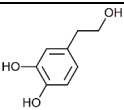
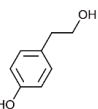
Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico rápido y eficaz que permita llevar a cabo la determinación simultánea de hidroxitirosol y tirosol en todas las etapas del proceso de fabricación de los productos cosméticos basados en extractos procedentes de la oliva, mediante LC-UV/Vis.

Compuestos estudiados

- Hidroxitirosol, 2-(3,4-dihidroxifenil)etanol (HTYR)
- Tirosol, 2-(4-hidroxifenil)etanol (TYR)

Tabla 3.1. Información sobre los compuestos estudiados.

Analito	Estructura química	Número CAS	M_r (g mol ⁻¹)	pK _a ^a	log K _{o/w} ^a
HTYR		10597-60-1	154.16	9.72	0.12
TYR		501-94-0	138.16	10.17	0.85

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs)* V11.02 (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea de hidroxitirosol y tirosol en extractos procedentes de la oliva, empleados como ingredientes en el proceso de fabricación, y en productos cosméticos acabados. El método propuesto, basado en LC-UV/Vis, permite el análisis de los diferentes tipos de muestras modificando únicamente la preparación según su naturaleza. En el caso de muestras sólidas y extractos hidrosolubles se llevó a cabo una lixiviación o dilución, respectivamente, asistida por ultrasonidos, mientras que en el caso de extractos liposolubles y muestras cosméticas se llevó a cabo la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME), explicada el [Capítulo 2](#). En primer lugar, se estudiaron las variables experimentales y se seleccionaron las

condiciones más adecuadas para la determinación. Se validó el método propuesto con buenos valores de repetibilidad (RSD <3.6 %), coeficientes de recuperación cuantitativos (95-107 %), y límites de detección en el nivel de $\mu\text{g g}^{-1}$. Finalmente, se aplicó el método propuesto al análisis de veinticuatro muestras.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrofotometría UV/Vis.
- Baño de ultrasonidos, agitador de vórtice, centrífuga y pH-metro.

Reactivos

- Hidroxitirosol ($\geq 98\%$) y tirosol (98 %) como patrones.
- Etanol, hexano y agua desionizada como disolventes en la preparación de muestras y patrones.
- Ácido acético e hidróxido de sodio para la preparación de disoluciones tampón.

Muestras

Dos alperujos (muestras A, B), un residuo sólido seco (muestra C), tres extractos liposolubles (muestras D-F), siete extractos hidrosolubles (muestras G-M), dos extractos sólidos concentrados (muestras N, O) y ocho cremas cosméticas (muestras P-W).

Adicionalmente, se preparó a escala de laboratorio una crema cosmética basada en un extracto de oliva conteniendo los analitos (muestra X, ver protocolo de elaboración en *Anexo 3.1*).

Método propuesto

Preparación de muestras y patrones

- *Muestras sólidas y extractos hidrosolubles*

Las muestras (A-C, G-O) se prepararon pesando 0.01-0.10 g en un matraz aforado de 10 mL empleando como disolvente una disolución tampón

acético/acetato (1 % v/v, pH 5). La mezcla se introdujo en un baño de ultrasonidos durante varios minutos para lixiviar los analitos y facilitar la disolución de la muestra. A continuación, se tomó una alícuota de la disolución y se filtró para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Respecto a las disoluciones patrón, a partir de una disolución patrón conteniendo $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos se prepararon disoluciones patrón de trabajo, entre 1 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, con el mismo disolvente empleado en la preparación de las muestras.

– *Extractos liposolubles y cremas cosméticas*

Para eliminar compuestos potencialmente interferentes de la matriz de la muestra y obtener una disolución acuosa apropiada para el análisis cromatográfico se llevó a cabo la VAEsME, de la manera descrita en el Capítulo 2 (Figura 3.1).

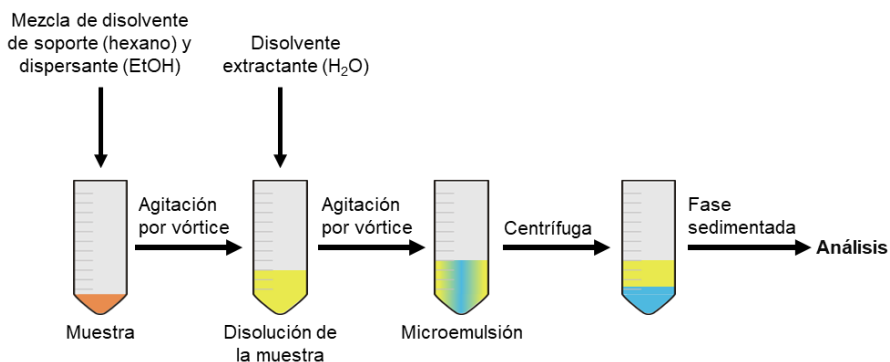


Figura 3.1. Esquema de la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME).

Las muestras (D-F, P-X) se prepararon pesando 0.01-0.10 g en un tubo de punta cónica y se dispersaron con 2 mL de hexano y 1 mL de etanol. La mezcla se homogeneizó mediante agitación por vórtice durante 10 s. A continuación, se añadieron 1.5 mL de una disolución tampón acético/acetato (1 % v/v) ajustada a pH 8 y se agitó por vórtice durante 10 s más. Finalmente, se centrifugó (3500 rpm, 2 min) y se tomó una alícuota de la fase hidro-etanólica sedimentada para su análisis cromatográfico.

Respecto a las disoluciones patrón, a partir de una disolución patrón conteniendo $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos en etanol se prepararon disoluciones patrón de trabajo, entre 0.5 y $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, en el mismo disolvente. Para proceder de igual forma que en la preparación de las muestras, se tomó 1 mL de la disolución patrón en un tubo de punta cónica conteniendo 2 mL de hexano y se llevó a cabo la extracción de la manera descrita.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: $20 \mu\text{L}$
- Columna: Purospher® STAR RP-18e (125 mm , 4 mm d.i. , $5 \mu\text{m}$)
- Temperatura de la columna: $35 \text{ }^\circ\text{C}$
- Fase móvil:
 - Fase A: disolución tampón acético/acetato ($1 \text{ } \%$ v/v, $\text{pH } 5$)
 - Fase B: etanol
- Modo: isocrático, fase A:fase B ($95:5 \text{ v/v}$)
- Caudal: 1 mL min^{-1}
- Longitud de onda: 280 nm

El análisis de las muestras cosméticas requirió de una etapa adicional de lavado de la columna cromatográfica, por lo que tras el minuto 10 se aumentó progresivamente la proporción de fase B tal y como se indica en el programa de elución en gradiente mostrado en la *Tabla 3.2*.

Tabla 3.2. Programa de elución en gradiente.

Tiempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0	95	5
10	95	5
12	0	100
15	0	100
17	95	5
20	95	5

RESULTADOS

Estudio de las variables cromatográficas

Se estudió la influencia de la longitud de onda de detección, la composición y el pH de la fase móvil y la temperatura de la columna.

Longitud de onda de detección

Se registró el espectro de absorción UV de disoluciones patrón conteniendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos en agua desionizada. Como se observa en la *Figura 3.2*, los analitos presentan máximos de absorción a 230 y 280 nm. La longitud de onda de detección se fijó en 280 nm, por ser la más selectiva y proporcionar una sensibilidad aceptable en ambos casos.

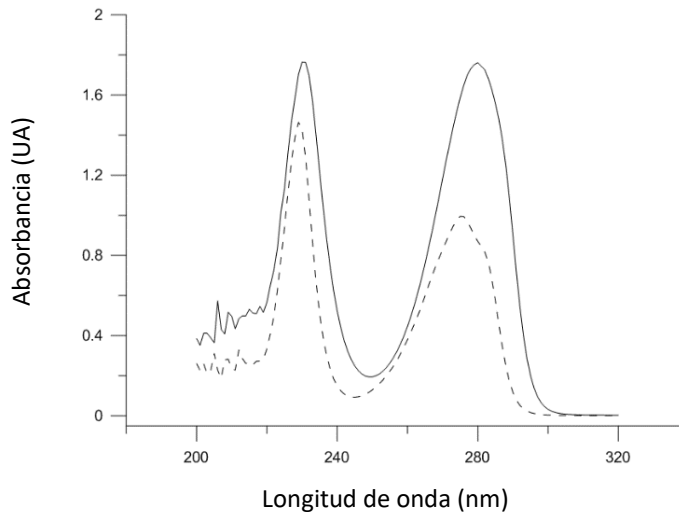


Figura 3.2. Espectros de absorción UV de hidroxitirosol (trazo continuo) y tirosol (trazo discontinuo).

pH de la fase móvil

Con el objetivo de favorecer la interacción con la fase estacionaria y mejorar la separación cromatográfica, se ensayaron valores de pH en los que los analitos se encontraron en su forma neutra, de acuerdo a sus valores de pK_a (*Tabla 3.1*). En este sentido, se ensayaron disoluciones tampón acético/acetato (1 % v/v) ajustadas a pH 3, 5 y 8. Se obtuvieron resultados

satisfactorios en todos los casos, por lo que se seleccionó la disolución de pH 5 al presentar mayor capacidad amortiguadora.

Composición de la fase móvil

Para reducir el tiempo de análisis manteniendo la resolución, se ensayaron etanol y acetonitrilo como modificadores orgánicos de la fase móvil en diferentes proporciones (5, 10, 15, 20 y 25 % v/v). Los mejores resultados se obtuvieron al emplear un 5 % de etanol, permitiendo la separación de los analitos en menos de 10 min, como se observa en la *Figura 3.3*.

En el caso de las muestras cosméticas fue necesaria una etapa adicional de lavado para eluir los compuestos menos polares del extracto inyectado. Para ello, se propuso incrementar el contenido de etanol de la fase móvil tras la separación isocrática de los analitos siguiendo el programa de elución en gradiente indicado anteriormente.

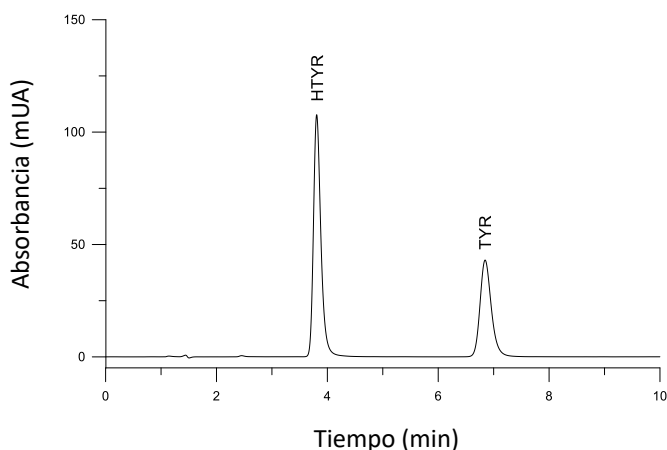


Figura 3.3. Cromatograma de una disolución patrón ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Temperatura de la columna

Se observó que los picos cromatográficos se hacían ligeramente más estrechos y disminuía su tiempo de retención al aumentar la temperatura de la columna. Se ensayaron temperaturas entre 30 y 50 °C y, dado que se obtuvo una buena separación en todos los casos, se seleccionó una temperatura de 35 °C para el análisis.

Estudio de variables en la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME)

Se estudió la influencia del volumen de extracción y el pH del disolvente extractante.

Volumen de extracción

Un mayor volumen de extracción implica que una mayor masa de los analitos puede ser extraída, pero el extracto resultante está más diluido. En este sentido, se ensayaron 0.5, 1, 1.5 y 2 mL como volúmenes de extracción (*Figura 3.4*). Con 0.5 y 1 mL se obtuvieron picos cromatográficos mal definidos debido al alto contenido en etanol de los extractos. Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron al emplear 1.5 mL de extractante.

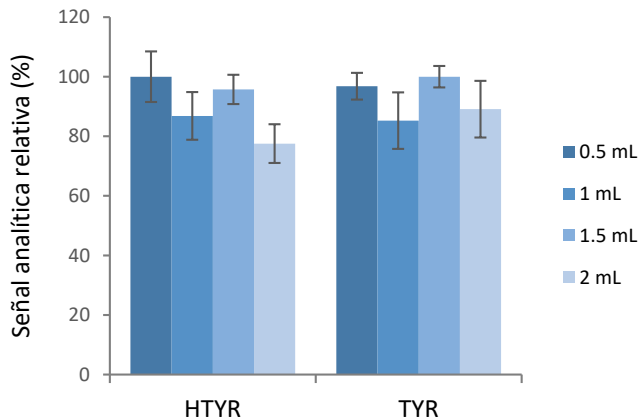


Figura 3.4. Estudio del volumen de extracción.

pH del disolvente extractante

Se ensayaron disoluciones tampón acético/acetato (1 % v/v) ajustadas a pH 3, 5, 8 y 11 (*Figura 3.5*). A pH 11 ambos analitos se encuentran parcialmente disociados (ver *Tabla 3.1*), lo que disminuye su afinidad por la fase dadora y por tanto se aumenta el rendimiento de la extracción. Sin embargo, cuando se trataron muestras reales, a pH 11 se observó la presencia de interferentes en el extracto que provocaron solapamientos cromatográficos, por lo que finalmente se seleccionó pH 8 para llevar a cabo la extracción.

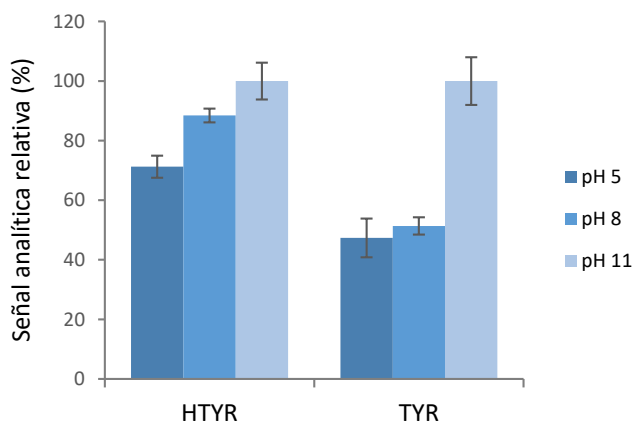


Figura 3.5. Estudio del pH del disolvente extractante.

Parámetros analíticos del método propuesto

Linealidad

La linealidad estudiada en ambos casos comprendió al menos el intervalo 0.5-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos analitos, obteniéndose coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.9999$).

Límites de detección y cuantificación

La Tabla 3.3 contiene los límites de detección ($3 S_{y/x}/b$) y cuantificación ($10 S_{y/x}/b$) instrumentales, siendo $S_{y/x}$ la desviación estándar de los residuales y b la pendiente de la recta de calibrado, así como los límites del método (en las muestras) teniendo en cuenta el procedimiento experimental.

Tabla 3.3. Límites de detección y cuantificación.

Procedimiento	Analito	Límites instrumentales		Límites del método ^c	
		LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^b	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^b
Muestras sólidas y extractos hidrosolubles	HTYR	0.02	0.07	2	7
	TYR	0.06	0.18	6	18
Extractos liposolubles y muestras cosméticas	HTYR	0.05	0.16	0.5	1.6
	TYR	0.15	0.48	1.5	4.8

^a LOD: límite de detección ($3 S_{y/x}/b$).

^b LOQ: límite de cuantificación ($10 S_{y/x}/b$).

^c Límites del método calculados para una masa de 0.1 g.

Factores de enriquecimiento

Los factores de enriquecimiento, definidos como $EF=C_{ext}/C_0$ donde C_{ext} es la concentración de analito en el extracto y C_0 es la concentración en la disolución inicial antes de la extracción, fueron 1.20 ± 0.04 para el hidroxitirosol y 1.25 ± 0.04 para el tirosol.

Rendimientos de extracción

Considerando los factores de enriquecimiento y teniendo en cuenta el procedimiento experimental ($EF_{m\acute{a}x}= 1.2$), los valores obtenidos para los rendimientos de extracción fueron $100 \pm 3 \%$ para el hidroxitirosol y $104 \pm 3 \%$ para el tirosol.

Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada aplicando el método propuesto a diez réplicas de una disolución patrón ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y a cinco réplicas en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, mostrados en la *Tabla 3.4*, revelan que se alcanzó una buena precisión ($RSD < 3.6 \%$).

Tabla 3.4. Estudio de la repetibilidad.

Analito	Repetibilidad (RSD, %) ^a	
	Intra-día	Inter-día
HTYR	1.1	1.7
TYR	2.7	3.6

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), n = 10.

Exactitud

Para evaluar la exactitud, se elaboró en el laboratorio una crema cosmética conteniendo cantidades conocidas de los analitos (muestra X) según el protocolo que se detalla en el *Anexo 3.1* y se analizó mediante el método propuesto. Como se observa en la *Tabla 3.5*, se obtuvieron errores relativos inferiores al 2 %.

Tabla 3.5. Estudio de la exactitud.

Analito	Contenido esperado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Contenido encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Error relativo (%) ^a
HTYR	107.0	104.9 \pm 0.8	- 2.0
TYR	18.4	18.1 \pm 0.6	- 1.4

^a Error relativo = [(Contenido encontrado - Contenido esperado) / Contenido esperado] x 100.

Análisis de muestras

La *Tabla 3.6* contiene los resultados obtenidos en el análisis de las muestras sólidas y los extractos hidrosolubles, mientras que los correspondientes a los extractos liposolubles y a las muestras cosméticas se muestran en la *Tabla 3.7*. Como puede observarse, se encontraron niveles de concentración de los analitos muy diferentes según el tipo de muestra, lo que pone de manifiesto la versatilidad del método propuesto.

A modo de ejemplo, en la *Figura 3.6* se muestran los cromatogramas obtenidos para algunas de las muestras analizadas.

Tabla 3.6. Concentraciones (% m/m) halladas en el análisis de muestras sólidas y extractos hidrosolubles.

Muestra ^a	Concentración (% m/m)	
	HTYR	TYR
A	0.013 \pm 0.003	0.011 \pm 0.002
B	0.009 \pm 0.001	0.013 \pm 0.001
C	0.014 \pm 0.002	0.010 \pm 0.001
G	1.049 \pm 0.010	0.180 \pm 0.001
H	1.368 \pm 0.004	0.132 \pm 0.002
I	1.298 \pm 0.008	0.214 \pm 0.004
J	1.139 \pm 0.002	0.188 \pm 0.001
K	1.628 \pm 0.001	0.268 \pm 0.007
L	0.365 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001
M	0.053 \pm 0.001	0.027 \pm 0.001
N	20.0 \pm 0.6	4.9 \pm 0.2
O	0.83 \pm 0.08	0.13 \pm 0.01

^a A, B: alperujos; C: residuo sólido seco; G-M: extractos hidrosolubles; N, O: extractos sólidos concentrados.

Tabla 3.7. Concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$) halladas en el análisis de extractos liposolubles y muestras cosméticas.

Muestra ^a	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	HTYR	TYR
D	25.4 \pm 0.3	19.5 \pm 0.4
E	31.3 \pm 0.6	22.2 \pm 0.3
F	21.9 \pm 0.4	10.1 \pm 0.1
P	8.6 \pm 0.3	7.1 \pm 0.7
Q	121 \pm 1	27.2 \pm 0.6
R	770 \pm 20	197 \pm 3
S	511 \pm 3	183 \pm 1
T	430 \pm 3	184 \pm 1
U	599 \pm 5	151 \pm 2
V	480 \pm 14	175 \pm 5
W	363 \pm 10	176 \pm 6
X	104.9 \pm 0.8	18.1 \pm 0.6

^a D-F: extractos liposolubles; P-W: cremas cosméticas; X: crema preparada en el laboratorio.

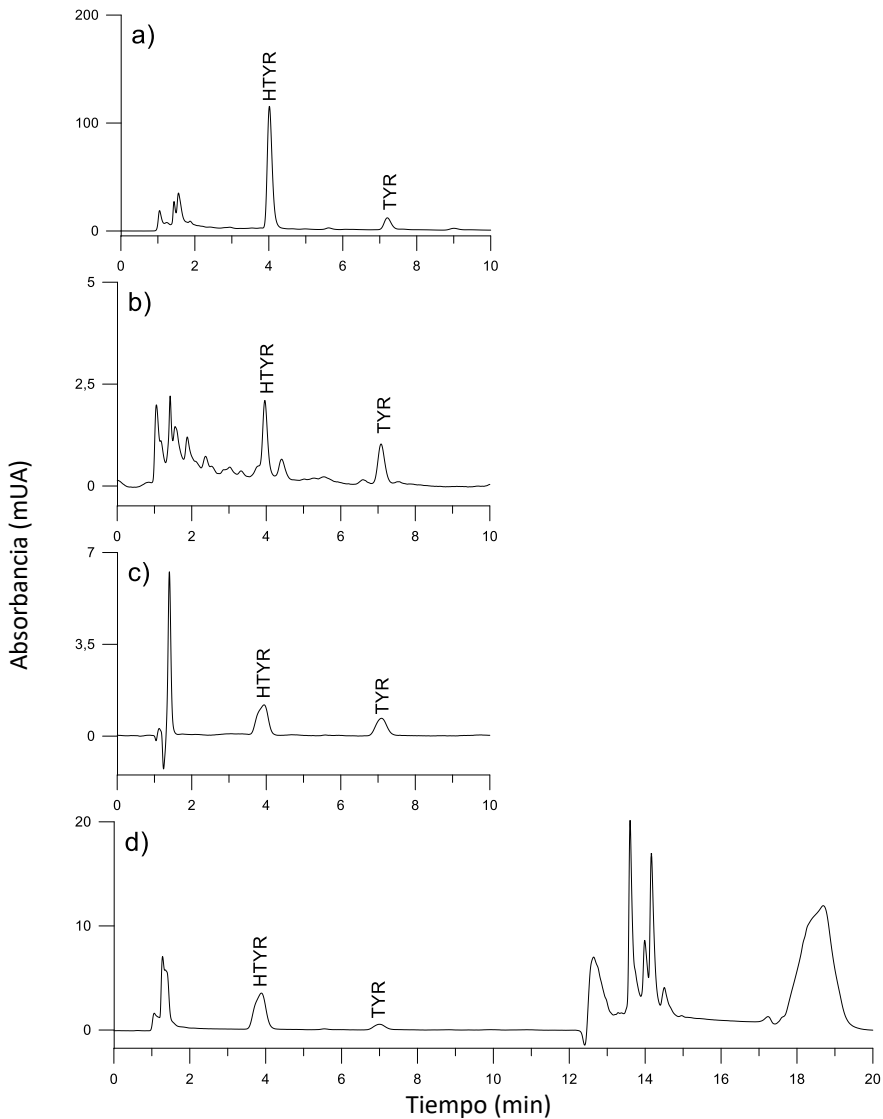


Figura 3.6. Cromatogramas obtenidos aplicando el método propuesto: (a) muestra G (extracto hidrosoluble), (b) muestra A (alperujo), (c) muestra E (extracto liposoluble) y (d) muestra Q (crema cosmética).

Estudio del efecto matriz

Se prepararon disoluciones de los diferentes tipos de muestras y se fortificaron con cantidades conocidas de los analitos a dos niveles de concentración. Tras esto, se calcularon los coeficientes de recuperación

determinando la concentración de los analitos en las muestras fortificadas y sin fortificar, aplicando el método propuesto. Como se observa en la *Tabla 3.8*, los coeficientes de recuperación obtenidos (95-107 %) indicaron que no existió un efecto matriz significativo. Además, estos resultados confirmaron el estudio de exactitud llevado a cabo anteriormente.

Tabla 3.8. Estudio del efecto matriz.

Muestra ^a	Concentración fortificada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coeficiente de recuperación (%)	
		HTYR	TYR
A	1	107 \pm 2	102 \pm 2
	5	102 \pm 4	101 \pm 5
D	1	101 \pm 2	101 \pm 4
	4	97 \pm 1	99 \pm 1
G	2	95 \pm 3	97 \pm 3
	10	99 \pm 4	102 \pm 3
X	1	100 \pm 2	99 \pm 7
	4	99 \pm 5	99 \pm 2

^a A: alperujo; D: extracto liposoluble; G: extracto hidrosoluble; X: crema preparada en el laboratorio.

CONCLUSIONES

El uso como ingredientes cosméticos de extractos procedentes de la oliva que contienen hidroxitirosol y tirosol es interesante debido a sus propiedades beneficiosas como antioxidantes. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para la determinación simultánea de ambos compuestos de forma simple y efectiva en diferentes tipos de extractos procedentes de la oliva y muestras cosméticas.
- El método se basa en la dilución o lixiviación de los analitos, para muestras sólidas y extractos hidrosolubles, o en la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME), para extractos liposolubles y muestras cosméticas, seguida de LC-UV/Vis.
- El método propuesto es útil para el control analítico de todas las etapas del proceso de fabricación de los productos cosméticos basados en extractos procedentes del olivo.

- Tan sólo se requieren pequeños volúmenes de disolventes orgánicos, en conformidad con los principios de la denominada *Química Analítica Ecológica*.

Anexo 3.1

**Protocolo de elaboración de la formulación cosmética
empleada en este capítulo**

En el desarrollo de este capítulo se preparó a escala de laboratorio una crema cosmética conteniendo los analitos objeto de estudio para llevar a cabo el estudio de exactitud descrito anteriormente. A continuación, se detallan los ingredientes empleados, así como la composición y el modo de preparación de esta formulación cosmética.

Ingredientes

- *Aceite de aguacate*: mezcla natural de ácidos grasos saturados, oleico y linoleico, muy rica en vitaminas A, B₁, B₂, D y E. Actúa principalmente como emoliente.
- *Base PFC o/w*: crema base que permite la elaboración de emulsiones aceite/agua compuesta por una mezcla de miristato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila.
- *Dimeticona 350*: mezcla de siliconas entre las que se encuentra el dimetilsiloxano. Entre sus funciones destaca favorecer la formación de emulsiones, proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto y actuar como vehículo de los componentes activos.
- *Hidrovitón®*: mezcla de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes y cloruro sódico, cuya función es hidratar la piel.
- *Fenonip®*: mezcla de parabenos y fenoxietanol que actúa como conservante.
- *Propilenglicol*: agente emoliente que actúa como humectante, impidiendo la desecación de la capa córnea de la piel.

Adicionalmente, se empleó como ingrediente cosmético un extracto procedente del olivo conteniendo los analitos objeto de estudio:

- *Naturlive Health*: extracto concentrado de oliva, de naturaleza líquida hidrosoluble cuyo contenido en hidroxitirosol (1 %, m/m) y en tirosol (0.2 %, m/m) fue determinado previamente aplicando el método propuesto.

Formulación

<i>Fase A:</i>	Base PFC o/w	18 %
	Aceite de aguacate	5 %
	Dimeticona 350	5 %
<i>Fase B:</i>	Propilenglicol	5 %
	Hidrovitón®	4 %
	Naturlive Health	1 %
	Agua	c.s.p. 100 %
<i>Fase C:</i>	Fenonip®	0.5 %

Elaboración

En primer lugar, se pesan los componentes de las fases A y B en sendos vasos de precipitados, se tapan con un vidrio de reloj y se sumergen en un baño de agua caliente (70 °C) hasta que la fusión de la fase A sea completa. Posteriormente, se vierte lentamente y bajo agitación constante la fase B sobre la fase A. A continuación, se retira el vaso de precipitados del baño caliente y, sin cesar la agitación, se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente, se adiciona la fase C y se mantiene la agitación hasta conseguir la completa homogenización.

CAPÍTULO 4

DETERMINACIÓN DE BRONOPOL EN PRODUCTOS COSMÉTICOS MEDIANTE SEMI-MICROEXTRACCIÓN CON FORMACIÓN DE EMULSIÓN ASISTIDA POR VÓRTICE Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *Vortex-assisted emulsification semimicroextraction for the analytical control of restricted ingredients in cosmetic products: determination of bronopol by liquid chromatography*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 408 (2016) 1929-1934; y presentado en forma de cartel en el 6th *International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques*, Valencia (2015).

INTRODUCCIÓN

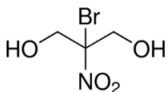
Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico para la determinación de bronopol en productos cosméticos, un conservante de uso restringido, empleando la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME) seguida de LC-UV/Vis.

Compuesto estudiado

- Bronopol, 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol (BP)

Tabla 4.1. Información sobre el compuesto estudiado.

Estructura química	Número CAS	M_r (g mol ⁻¹)	pK_a ^a	$\log K_{o/w}$ ^a
	52-51-7	199.99	12.02	1.15

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs) V11.02 (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

Se propone el uso de la VAEsME, cuyo fundamento se explicó en el [Capítulo 2](#), como técnica para llevar a cabo la preparación de la muestra cosmética en una única etapa, incluyendo tanto la dispersión de la muestra como la extracción del analito, seguida de la determinación por LC-UV/Vis. Este procedimiento permite llevar a cabo la limpieza de la muestra con una dilución mínima y resulta útil para la determinación de ingredientes cosméticos sujetos a restricciones en su concentración máxima permitida, como el bronopol. El método propuesto se aplicó al análisis de dieciocho muestras cosméticas comerciales, incluyendo cremas, champús y geles de baño. Se obtuvieron coeficientes de recuperación cuantitativos (91-104 %), buena repetibilidad (RSD <10.9 %) y un límite de detección de 9 $\mu\text{g g}^{-1}$, lo que hace que el método propuesto sea útil para el control de calidad de los productos cosméticos que contienen el conservante bronopol en su formulación.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrofotometría UV/Vis.
- Agitador de vórtice y centrífuga.

Reactivos

- Bronopol (98 %) como patrón.
- Etanol, hexano y agua desionizada como disolventes en la preparación de muestras y patrones.
- Ácido acético para la preparación de la fase móvil.

Muestras

Once cremas hidratantes (muestras A-K), cinco champús (muestras L-P) y dos geles de baño (muestras Q, R).

Adicionalmente, se preparó a escala de laboratorio una crema cosmética conteniendo el analito (ver protocolo de elaboración en *Anexo 4.1*).

Método propuesto

Preparación de muestras

Las muestras se prepararon pesando 0.1 g en un tubo de punta cónica añadiendo 1 mL de hexano y 0.5 mL de etanol. La muestra se dispersó mediante agitación en vórtice durante 10 s. A continuación, se añadieron 0.5 mL de agua desionizada como extractante y se asistió la extracción con agitación en vórtice durante 10 s. Finalmente, la mezcla se centrifugó (6000 rpm, 5 min) para separar las fases y se tomó una alícuota de la fase hidro-etanólica sedimentada para el análisis cromatográfico.

Preparación de patrones

Se preparó una disolución patrón en etanol conteniendo $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ del analito. A partir de ésta, se prepararon disoluciones patrón de trabajo, entre 5 y $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, tomando alícuotas (0.02-0.5 mL) que se trasvasaron a tubos de punta cónica y se diluyeron con etanol hasta un volumen total de 0.5 mL. A continuación, se añadió 1 mL de hexano y se llevó a cabo el mismo proceso de extracción seguido en la preparación de las muestras.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: 20 μL
- Columna: Purospher® STAR RP-18e (125 mm, 4 mm d.i., 5 μm)
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Fase móvil:
 - Fase A: disolución acuosa de ácido acético (1 % v/v)
 - Fase B: etanol
- Modo: gradiente (*Tabla 4.2*)
- Caudal: 0.5 mL min⁻¹
- Longitud de onda: 250 nm

Tabla 4.2. Programa de elución en gradiente.

Tiempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0.0	87	13
3.0	87	13
3.1	0	100
6.0	0	100
6.1	87	13
12.0	87	13

RESULTADOS**Estudio de las variables cromatográficas**

Se estudió el efecto de la composición de la fase móvil y la temperatura de la columna.

Composición de la fase móvil

Como fase móvil se usó una disolución de ácido acético en agua desionizada (1 % v/v) y etanol como modificador orgánico. Se ensayaron diferentes proporciones de etanol (0-25 %), obteniendo los mejores resultados con un 13 % de etanol, por lo que se seleccionó esta mezcla para la primera etapa del programa de elución en gradiente. Tras esto, se incrementó el contenido de etanol para eluir los compuestos menos polares del extracto de muestra inyectado. Finalmente, se recuperaron las condiciones iniciales.

Temperatura de la columna

Se observó un ligero estrechamiento del pico cromatográfico del analito y una disminución en su tiempo de retención al aumentar la temperatura de la columna. Se ensayaron temperaturas entre 30 y 50 °C, seleccionándose una temperatura de 40 °C.

Estudio de variables en la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME)

En la preparación de las muestras cosméticas, se llevó a cabo la VAEsME como procedimiento de disolución y extracción de la muestra en una única etapa, empleando una mezcla de hexano y etanol como disolvente de la muestra y agua desionizada como disolvente de extracción. Al agitar la mezcla mediante vórtice se forma una microemulsión, debido a la inmiscibilidad entre hexano y agua, en la que el etanol actúa como dispersante. Esta microemulsión permite incrementar la superficie de contacto entre las fases, mejorando la eficiencia de la extracción y reduciendo el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. En este sentido, se estudió la influencia de los volúmenes de hexano, etanol y agua empleados, así como el tiempo de extracción.

Volumen de disolventes

Se ensayaron diferentes volúmenes de hexano (1, 2 y 3 mL), etanol (0.5, 1 y 1.5 mL) y agua desionizada (0.5, 1 y 1.5 mL).

Los volúmenes de hexano y etanol considerados fueron los mínimos necesarios para poder dispersar una cantidad adecuada de muestra (0.1 g), reduciendo así el consumo de disolventes orgánicos. Se observó que el volumen de hexano no influyó significativamente en el proceso de extracción, por lo que se seleccionó 1 mL. Respecto a los volúmenes de etanol y agua desionizada, los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 4.1*. Como puede verse, se obtuvo la mayor señal analítica empleando 0.5 mL de ambos disolventes, al conseguir una mayor concentración de analito en un volumen de extracto menor.

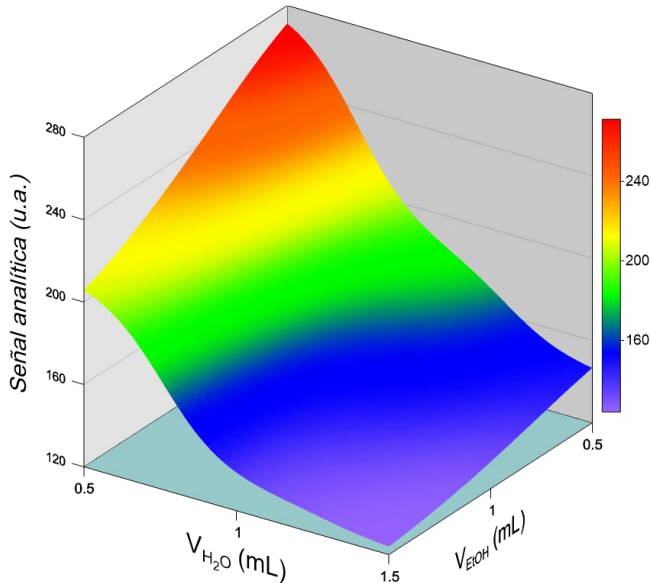


Figura 4.1. Curva de resposta entre la señal analítica frente a los volúmenes de agua y etanol empleados en la VAEsME.

Tiempo de extracción

Se ensayaron 10, 30, 60 y 120 s de agitación en vórtice como tiempo de extracción. No se observaron diferencias significativas, por lo que se seleccionó el tiempo más breve, 10 s, para formar la microemulsión.

Parámetros analíticos del método propuesto

Linealidad

La linealidad estudiada alcanzó al menos $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.9990$).

Límites de detección y cuantificación

Los valores obtenidos para los límites de detección ($3 S_{y/x}/b$) y cuantificación ($10 S_{y/x}/b$) instrumentales, siendo $S_{y/x}$ la desviación estándar de los residuales y b la pendiente de la recta de calibrado, fueron 0.9 y $2.7 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Considerando el procedimiento experimental, los límites de detección y cuantificación del método fueron 9 y $27 \mu\text{g g}^{-1}$ en muestra, respectivamente.

Factor de enriquecimiento

El factor de enriquecimiento, definido como $EF=C_{ext}/C_0$ donde C_{ext} es la concentración de analito en el extracto y C_0 es la concentración en la disolución inicial antes de la extracción, fue 1.7 ± 0.1 .

Rendimiento de extracción

Considerando el factor de enriquecimiento y teniendo en cuenta el procedimiento experimental ($EF_{m\acute{a}x}= 1.5$), el rendimiento de extracción obtenido fue $113 \pm 7 \%$.

Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada aplicando el procedimiento completo a cinco réplicas de disoluciones patrón conteniendo el analito a dos niveles de concentración (5 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, mostrados en la *Tabla 4.3*, revelan que se alcanzó una buena precisión ($RSD < 10.9 \%$).

Tabla 4.3. Estudio de la repetibilidad.

Repetibilidad intra-día (RSD, %) ^a		Repetibilidad inter-día (RSD, %) ^a	
$5 \mu\text{g mL}^{-1}$	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	$5 \mu\text{g mL}^{-1}$	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$
6.7	2.2	10.9	3.9

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), $n = 5$.

Exactitud

Se elaboró y analizó en el laboratorio una crema cosmética conteniendo una cantidad conocida del analito (específicamente, 0.1% m/m) de acuerdo al protocolo detallado en el *Anexo 4.1*. El resultado obtenido fue de $0.099 \pm 0.001 \%$ m/m. Por tanto, el error relativo de la determinación fue inferior al 1.5% , mostrando la exactitud del método propuesto.

Análisis de muestras

Los resultados obtenidos en el análisis de las dieciocho muestras cosméticas comerciales se muestran en la *Tabla 4.4*. En todos los casos se obtuvo una buena resolución cromatográfica del analito frente a otros compuestos polares procedentes de la matriz de las muestras que también fueron

extraídos y detectados. En la *Figura 4.2* se muestran, a modo de ejemplo, algunos de los cromatogramas obtenidos.

Tabla 4.4. Resultados obtenidos en el análisis de muestras comerciales.

Muestra ^a	Concentración (% m/m)	Muestra ^a	Concentración (% m/m)
A	0.025 ± 0.002	J	0.029 ± 0.002
B	0.008 ± 0.001	K	0.030 ± 0.001
C	0.007 ± 0.001	L	0.020 ± 0.001
D	0.011 ± 0.001	M	0.042 ± 0.001
E	0.029 ± 0.001	N	0.041 ± 0.001
F	0.028 ± 0.001	O	0.019 ± 0.001
G	0.013 ± 0.001	P	0.043 ± 0.001
H	0.022 ± 0.001	Q	0.042 ± 0.001
I	0.026 ± 0.001	R	0.037 ± 0.001

^a A-K: cremas hidratantes; L-P: champús; Q, R: geles de baño.

Estudio del efecto matriz

Para estudiar el efecto matriz se prepararon disoluciones de tres muestras de diferente forma cosmética y se fortificaron con el analito a dos niveles de concentración (5 y 100 µg mL⁻¹). Los coeficientes de recuperación obtenidos (*Tabla 4.5*), entre 91 y 104 %, indicaron que no existió un efecto matriz significativo.

Tabla 4.5. Estudio del efecto matriz.

Muestra ^a	Coeficiente de recuperación (%)	
	5 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹
A	101 ± 1	91 ± 1
N	94 ± 2	92 ± 1
R	104 ± 3	96 ± 2

^a A: crema hidratante; N: champú; R: gel de baño.

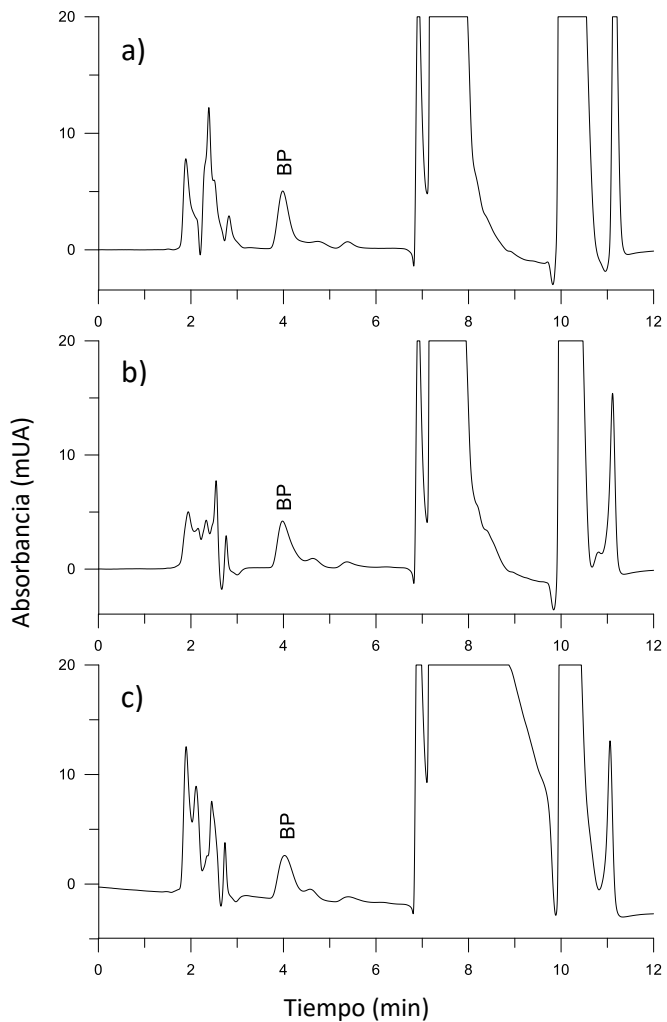


Figura 4.2. Cromatogramas obtenidos aplicando el método propuesto a las muestras: (a) muestra A (crema hidratante), (b) muestra N (champú) y (c) muestra R (gel de baño).

CONCLUSIONES

El bronopol es un conservante autorizado cuya concentración máxima se encuentra restringida, de acuerdo al *Anexo V* del Reglamento Europeo sobre los productos cosméticos. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para la determinación de bronopol en productos cosméticos.
- El método propuesto se basa en la semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice (VAEsME), que permite la dispersión de la muestra y la extracción del analito en una única etapa, seguida de LC-UV/Vis.
- El método propuesto es aplicable a diferentes tipos de muestras cosméticas, con matrices hidrofílicas y lipofílicas.
- El método propuesto es útil para llevar a cabo el control de calidad de los productos cosméticos, por sus buenas prestaciones analíticas, además de su sencillez, rapidez y asequibilidad.
- El método propuesto es seguro para el operador y respetuoso con el medio ambiente, ya que sólo se utilizan pequeños volúmenes de disolventes orgánicos, siguiendo los principios de la *Química Analítica Ecológica*.

Anexo 4.1

**Protocolo de elaboración de la formulación cosmética
empleada en este capítulo**

En el desarrollo de este capítulo se preparó a escala de laboratorio una crema cosmética conteniendo el conservante bronopol para llevar a cabo el estudio de exactitud descrito anteriormente. A continuación, se detallan los ingredientes empleados, así como la composición y el modo de preparación de esta formulación cosmética.

Ingredientes

- *Aceite de aguacate*: mezcla natural de ácidos grasos saturados, oleico y linoleico, muy rica en vitaminas A, B₁, B₂, D y E. Actúa principalmente como emoliente.
- *Base PFC o/w*: crema base que permite la elaboración de emulsiones aceite/agua compuesta por una mezcla de miristato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila.
- *Dimeticona 350*: mezcla de siliconas entre las que se encuentra el dimetilsiloxano. Entre sus funciones destaca favorecer la formación de emulsiones, proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto y actuar como vehículo de los componentes activos.
- *Hidrovitón*[®]: mezcla de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes y cloruro sódico, cuya función es hidratar la piel.
- *Fenonip*[®]: mezcla de parabenos y fenoxietanol que actúa como conservante.
- *Propilenglicol*: agente emoliente que actúa como humectante, impidiendo la desecación de la capa córnea de la piel.

Adicionalmente, se empleó como ingrediente cosmético el patrón comercial de bronopol (98 %).

Formulación

<i>Fase A:</i>	Base PFC o/w	20 %
	Aceite de aguacate	5 %
	Dimeticona 350	5 %
<i>Fase B:</i>	Propilenglicol	5 %
	Hidrovitón®	4 %
	Bronopol	0.1 %
	Agua	c.s.p. 100 %
<i>Fase C:</i>	Fenonip®	0.5 %

Elaboración

En primer lugar, se pesan los componentes de las fases A y B en sendos vasos de precipitados, se tapan con un vidrio de reloj y se sumergen en un baño de agua caliente (70 °C) hasta que la fusión de la fase A sea completa. Posteriormente, se vierte lentamente y bajo agitación constante la fase B sobre la fase A. A continuación, se retira el vaso de precipitados del baño caliente y, sin cesar la agitación, se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente, se adiciona la fase C y se mantiene la agitación hasta conseguir la completa homogenización.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE FORMALDEHÍDO LIBRE EN PRODUCTOS COSMÉTICOS QUE CONTIENEN CONSERVANTES DADORES DE FORMALDEHÍDO MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EN FASE REVERSA Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DERIVATIZACIÓN POST-COLUMNA

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *Determination of free formaldehyde in cosmetics containing formaldehyde-releasing preservatives by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with post-column derivatization*, **Journal of Chromatography A** 1543 (2018) 34-39; y presentado en forma de cartel en el *19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*, Santiago de Compostela (2017).

INTRODUCCIÓN


Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico para la determinación de formaldehído en productos cosméticos que contienen conservantes dadores de formaldehído en su formulación, empleando microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa (RP-DLLME) y LC-UV/Vis con derivatización post-columna.

Compuesto estudiado

- Formaldehído.

Tabla 5.1. Información sobre el compuesto estudiado.

Estructura química	Número CAS	M_r (g mol ⁻¹)	pK_a^a	$\log K_{o/w}^a$
	50-00-0	30.03	13.27	0.35

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs) V11.02 (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para determinar formaldehído a nivel de trazas en cosméticos que contienen conservantes dadores de formaldehído, tales como diazolidinil urea, imidazolidinil urea, DMDM hidantoína y bronopol, que liberan formaldehído paulatinamente. El método se basa en RP-DLLME, cuyo procedimiento se detalló en el [Capítulo 2](#), y LC-UV/Vis con derivatización post-columna, siguiendo la reacción de Hantzsch (*Figura 5.1*). El método presentó un factor de enriquecimiento de 86 ± 2 , un límite de detección de 30 ng g^{-1} y buena repetibilidad (RSD <9.2 %). Finalmente, se aplicó al análisis de ocho muestras cosméticas comerciales conteniendo diferentes conservantes dadores de formaldehído obteniendo coeficientes de recuperación cuantitativos (91-113 %).

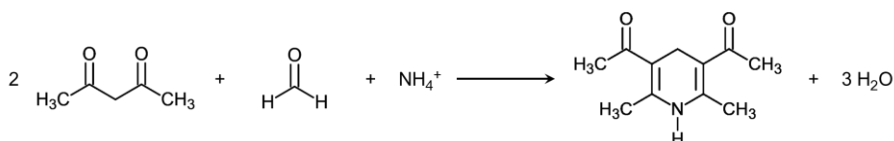


Figura 5.1. Esquema de la reacción de Hantzsch.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrofotometría UV/Vis.
- Reactor post-columna: tubo de PTFE enroscado (5 m, 0.3 mm d.i.), en baño de agua (ver *Figura 5.2*).
- Bomba auxiliar de alta presión, agitador de vórtice, centrífuga y pH-metro.

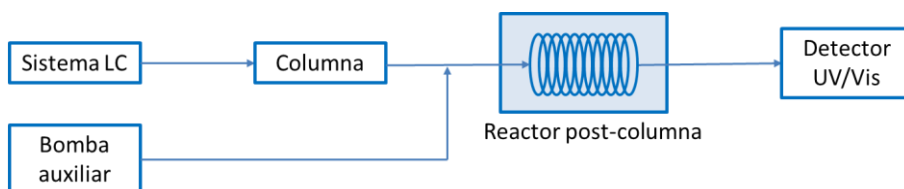


Figura 5.2. Diagrama del sistema cromatográfico con reactor post-columna.

Reactivos

- Formaldehído (37 % m/v) en agua (10-15 % metanol), estandarizado mediante yodometría, como patrón.
- Acetilacetona (pentano-2,4-diona), ácido acético y acetato amónico como reactivo derivatizante.
- Sulfato de magnesio anhidro como desecante.
- Dihidrógeno fosfato sódico para la preparación de la fase móvil.
- Acetonitrilo, tolueno y agua desionizada como disolventes para la preparación de muestras y patrones.

Muestras

Una crema hidratante (muestra A), una mascarilla capilar (muestra B) y un champú (muestra C) conteniendo diazolidinil urea; un gel reductor (muestra D) y un gel refrescante (muestra E) conteniendo bronopol; un champú (muestra F) conteniendo DMDM hidantoína; y dos jabones de manos (muestras G, H) conteniendo DMDM hidantoína e imidazolidinil urea.

Método propuesto

Preparación de patrones

Se preparó una disolución patrón en acetonitrilo conteniendo $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de formaldehído. A partir de ésta, se preparó una disolución patrón conteniendo $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de formaldehído en tolueno. Finalmente, se prepararon disoluciones patrón de trabajo, entre 10 y 50 ng mL^{-1} , en tolueno.

Para la RP-DLLME, 5 mL de cada disolución patrón fueron transferidos, respectivamente, a tubos de punta cónica conteniendo 0.4 g de sulfato de magnesio anhidro como desecante. Cada tubo se agitó mediante vórtice durante 1 min , se centrifugó (6000 rpm , 5 min) y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos. A continuación, en cada uno de ellos se inyectó rápidamente una mezcla de $500 \mu\text{L}$ de acetonitrilo y $50 \mu\text{L}$ de agua desionizada. Una vez formada la microemulsión, se centrifugaron (6000 rpm , 5 min) para separar las fases y finalmente se recogieron las fases sedimentadas (ca. $40 \mu\text{L}$) para el análisis cromatográfico.

Preparación de muestras

Las muestras se prepararon, por triplicado, pesando 0.01 - 0.1 g en un vial de vidrio conteniendo 0.4 g de sulfato de magnesio anhidro y se mezcló hasta obtener un sólido homogéneo. A continuación, la mezcla se transfirió a un tubo de punta cónica al que se añadieron 5 mL de tolueno. Posteriormente, se agitó por vórtice durante 1 min , se centrifugó (6000 rpm , 5 min) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Finalmente, se llevó a cabo la RP-DLLME de la forma descrita para la preparación de los patrones. En la *Figura 5.3* se muestra un diagrama del procedimiento experimental.

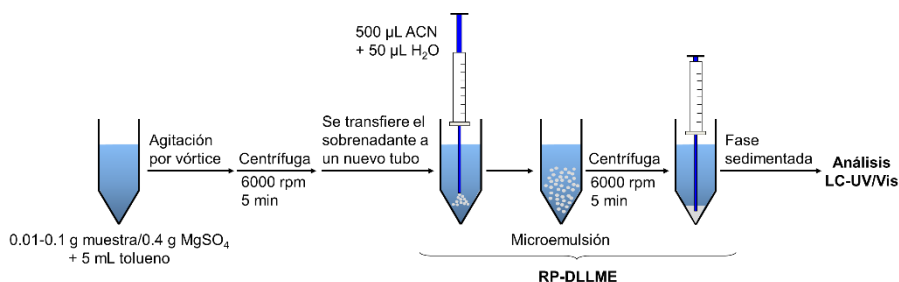


Figura 5.3. Esquema del procedimiento experimental propuesto.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: 20 μL
- Columna: LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm, 4 mm d.i., 5 μm)
- Temperatura de la columna: 35 °C
- Fase móvil: tampón fosfato 6 mM, pH 2
- Modo: isocrático
- Caudal: 1 mL min^{-1}
- Reactivo post-columna: acetilacetona (0.5 % v/v), acetato amónico (6.25 % m/v) y ácido acético (0.75 % v/v) en agua desionizada
- Temperatura del reactor post-columna: 85 °C en baño de agua
- Caudal auxiliar: 1 mL min^{-1}
- Longitud de onda: 407 nm

RESULTADOS

Estudio de variables en la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa (RP-DLLME)

Se estudió el efecto de la naturaleza de los disolventes de soporte y dispersante, así como los volúmenes empleados de disolvente dispersante y de agua como disolvente extractante.

Naturaleza del disolvente de soporte

Para llevar a cabo la RP-DLLME es necesario un disolvente orgánico que sirva de soporte para formar la microemulsión. Este disolvente debe ser inmisible en agua y tener menos densidad para facilitar la posterior recolección de la fase acuosa sedimentada. Además, su toxicidad debe ser la menor posible. Por este motivo se seleccionó tolueno como disolvente de soporte al ser una alternativa menos tóxica que otros posibles disolventes, como cloroformo o diclorometano, siendo éstos además poco deseables por su mayor densidad. Por otra parte, se descartó el uso de acetato de etilo por no formar la microemulsión y de hexano por no favorecer la separación de fases.

Naturaleza del disolvente dispersante

El disolvente dispersante debe ser miscible tanto con el disolvente de soporte (tolueno) como con el disolvente extractante (agua desionizada). Se ensayaron acetonitrilo, acetona y etanol.

Para ello, se inyectaron mezclas de 125 μL de agua desionizada y 750 μL del disolvente dispersante en 5 mL de tolueno conteniendo 10 ng mL^{-1} del analito. Se observó que no fue posible formar la microemulsión al emplear etanol, por lo que se descartó. Al usar acetona se observó una interferencia en el posterior análisis cromatográfico, por lo que también se descartó. Finalmente, se seleccionó acetonitrilo, con el que se obtuvieron buenos resultados.

Volumen de disolvente dispersante

Se ensayaron mezclas de 50 μL de agua desionizada y diferentes volúmenes de acetonitrilo, entre 100 y 750 μL . Con volúmenes inferiores a 500 μL no se formó la microemulsión, mientras que no se observaron diferencias significativas al utilizar volúmenes superiores (*Figura 5.4*). Por tanto, se seleccionaron 500 μL de acetonitrilo como volumen de disolvente dispersante.

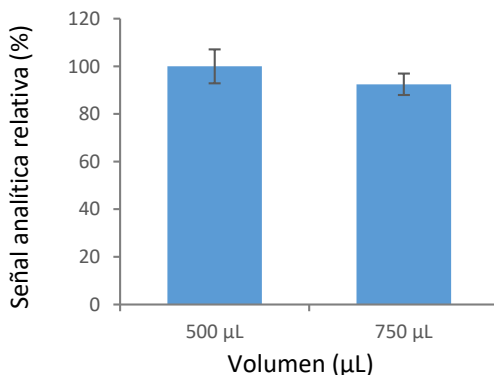


Figura 5.4. Estudio del volumen de disolvente dispersante.

Volumen de disolvente extractante

Se ensayaron mezclas de 500 μL de acetonitrilo y diferentes volúmenes de agua desionizada, entre 50 y 150 μL . Como se observa en la *Figura 5.5*, los

mejores resultados se obtuvieron con 50 μL de extractante, ya que se produjo una disminución progresiva de la señal analítica con volúmenes superiores debido al efecto de la dilución.

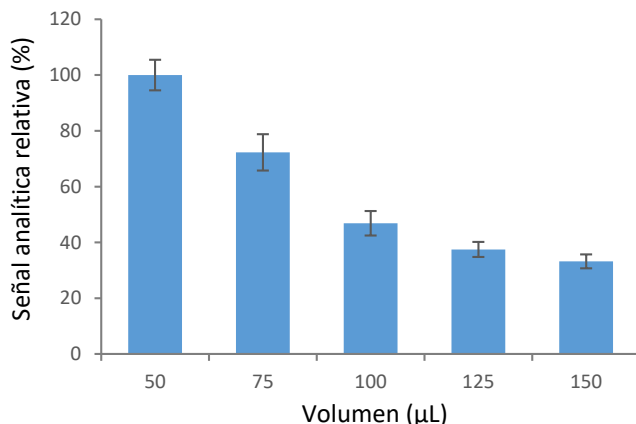


Figura 5.5. Estudio del volumen de disolvente extractante.

Estudio del pretratamiento de la muestra

Se observó que una simple agitación no era suficiente para dispersar eficazmente la muestra cosmética en el disolvente orgánico de soporte, debido a que las muestras contienen agua. Además, de esta forma no se obtendrían resultados fiables, ya que el volumen del extracto obtenido no se correspondería con el volumen de agua empleado como extractante, sino que contendría también el agua procedente de la muestra. Por ello, se propuso el uso de un desecante y se estudió la influencia de su naturaleza y la cantidad utilizada.

Por otro lado, se observó una disminución en la señal analítica obtenida al utilizar desecante antes de la RP-DLLME, posiblemente debido a que el analito se adsorbía parcialmente sobre su superficie. Por este motivo, se realizó el mismo tratamiento en la preparación de patrones.

Naturaleza del desecante

Se ensayaron 0.1 g de sulfato de sodio anhidro, sulfato de magnesio anhidro y sílice como desecantes antes de la RP-DLLME, empleando disoluciones patrón (25 ng mL^{-1}). La señal analítica se comparó con la proporcionada por

una disolución patrón de la misma concentración en la que no se usó desecante. Como se observa en la *Figura 5.6*, los mejores resultados se obtuvieron con los sulfatos anhidros de sodio y de magnesio. Finalmente, se seleccionó la sal de magnesio porque actúa más rápidamente.

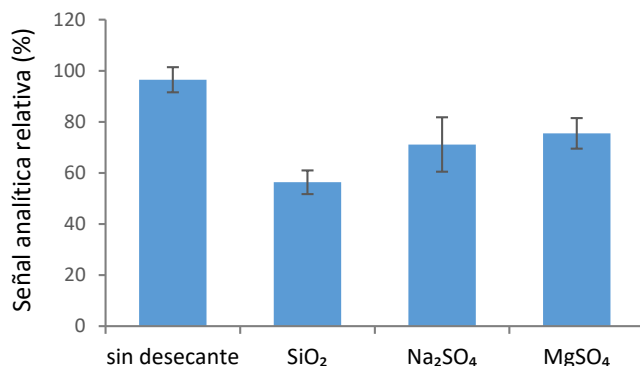


Figura 5.6. Estudio de la naturaleza del agente desecante.

Cantidad de desecante

Se analizó una muestra exenta de formaldehído según el método propuesto cuya disolución en tolueno se fortificó con el analito (25 ng mL^{-1}), ensayando diferentes cantidades de desecante, entre 0.1 y 0.5 g. Se evaluaron los coeficientes de recuperación y los mejores resultados se obtuvieron con 0.4 g de desecante, como se observa en la *Figura 5.7*.

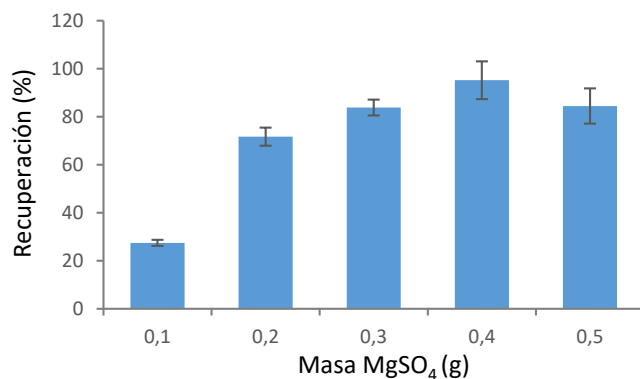


Figura 5.7. Estudio de la cantidad de desecante.

Estudio de interferencias con conservantes dadores de formaldehído

Para comprobar la ausencia de interferencias debidas a la presencia de conservantes dadores de formaldehído en las muestras, se estudió la influencia de bronopol, diazolidinil urea, imidazolidinil urea, quaternium-15 y DMDM hidantoína. Individualmente, se prepararon disoluciones de los conservantes en agua y se inyectaron en el sistema cromatográfico. No se observaron picos cromatográficos para ninguno de ellos en las condiciones seleccionadas. Además, se prepararon disoluciones de los conservantes en tolueno y se analizaron mediante RP-DLLME aplicando el método propuesto. Del mismo modo, no se obtuvieron picos cromatográficos en ningún caso, confirmando la ausencia de interferencias producidas por la presencia de estos compuestos.

Parámetros analíticos del método propuesto

Linealidad

La linealidad estudiada alcanzó al menos 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.9990$).

Límites de detección y cuantificación

Los valores obtenidos para los límites de detección ($3 S/N$) y cuantificación ($10 S/N$) instrumentales, siendo S/N la relación señal-ruido, fueron 0.7 y 2 ng mL^{-1} , respectivamente. Considerando el procedimiento experimental, los límites de detección y cuantificación del método fueron 30 y 110 ng g^{-1} en muestra, respectivamente.

Factor de enriquecimiento

El factor de enriquecimiento, definido como $EF = C_{ext}/C_0$ donde C_{ext} es la concentración de formaldehído en el extracto y C_0 es la concentración de formaldehído en la disolución de tolueno, fue 86 ± 2 .

Rendimiento de extracción

Considerando el factor de enriquecimiento y teniendo en cuenta el procedimiento experimental ($EF_{m\acute{a}x} = 100$), el rendimiento de extracción obtenido fue $86 \pm 2 \%$.

Repetibilidad

La repetibilidad del método propuesto se evaluó aplicando el procedimiento completo a diez réplicas de disoluciones patrón conteniendo el analito a tres niveles de concentración (10, 25 y 50 ng mL⁻¹) en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, mostrados en la *Tabla 5.2*, revelan que se alcanzó una buena precisión (RSD <9.2 %).

Tabla 5.2. Estudio de la repetibilidad.

Repetibilidad intra-día (RSD, %) ^a			Repetibilidad inter-día (RSD, %) ^a		
10 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹
4.7	1.9	4.5	9.2	6.9	6.3

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), n = 10.

Análisis de muestras

El análisis de las muestras cosméticas comerciales reveló la presencia de formaldehído en siete de las ocho muestras analizadas en niveles de µg g⁻¹. Estos resultados se muestran en la *Tabla 5.3*. En la *Figura 5.8* se muestran, a modo de ejemplo, algunos de los cromatogramas obtenidos.

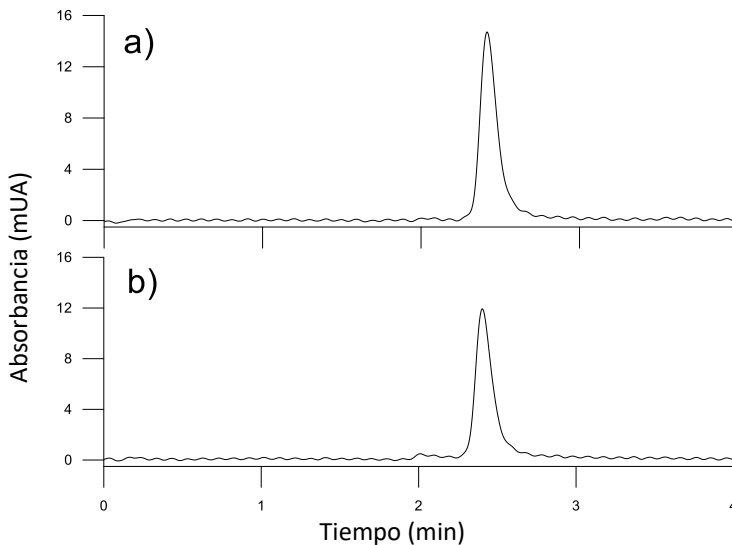


Figura 5.8. Cromatogramas obtenidos aplicando el método propuesto a una crema cosmética (muestra A): (a) fortificada en disolución con 25 ng mL⁻¹ y (b) sin fortificar.

Tabla 5.3. Concentración de formaldehído ($\mu\text{g g}^{-1}$) y coeficientes de recuperación (%) obtenidos en el análisis de muestras comerciales.

Muestra ^a	Ingrediente dador de formaldehído	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Coeficiente de recuperación (%)	
			10 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹
A	Diazolidinil urea	9.7 ± 0.3	93 ± 9	91 ± 6
B	Diazolidinil urea	14.5 ± 0.2	99 ± 7	109 ± 6
C	Diazolidinil urea	5.1 ± 0.1	101 ± 5	98 ± 4
D	Bronopol	n.d.	105 ± 8	95 ± 7
E	Bronopol	3.6 ± 0.1	96 ± 2	104 ± 7
F	DMDM hidantoína	13.0 ± 0.5	113 ± 8	102 ± 5
G	DMDM hidantoína, imidazolidinil urea	24.5 ± 0.3	98 ± 7	104 ± 4
H	DMDM hidantoína, imidazolidinil urea	22.1 ± 0.2	110 ± 9	99 ± 6

^a A: crema hidratante; B: mascarilla capilar; C, F: champús; D: gel reductor; E: gel refrescante; G, H: jabones de manos.

n.d.: no detectado.

Estudio del efecto matriz

Para validar la exactitud del método propuesto se prepararon disoluciones de las muestras, se fortificaron con el analito a dos niveles de concentración (10 y 25 ng mL⁻¹) y se evaluaron los coeficientes de recuperación. Los resultados obtenidos (Tabla 5.3), comprendidos entre 91 y 113 %, indicaron que no existió un efecto matriz significativo.

CONCLUSIONES

El formaldehído es un conservante autorizado cuya concentración máxima se encuentra restringida de acuerdo al Anexo V del Reglamento Europeo sobre los productos cosméticos. Además, ha sido relacionado con la dermatitis de contacto, por lo que los fabricantes lo han sustituido por otros conservantes que actúan liberando formaldehído lentamente. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para la determinación a nivel de trazas de formaldehído libre en productos cosméticos que contienen conservantes dadores de formaldehído.

- El método propuesto se basa en la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa (RP-DLLME) seguida de LC-UV/Vis con derivatización post-columna.
- El método propuesto permite llevar a cabo la determinación en diferentes tipos de muestras cosméticas, con matrices hidrofílicas y lipofílicas.
- El método propuesto es sensible, exacto y preciso, además de sencillo, rápido y asequible, por lo que es adecuado para llevar a cabo el control de calidad de los productos cosméticos que contienen este tipo de conservantes.

CAPÍTULO 6

DETERMINACIÓN DE HIDROXIETOXIFENIL BUTANONA EN PRODUCTOS COSMÉTICOS MEDIANTE LIXIVIACIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *A green and rapid analytical method for the determination of hydroxyethoxyphenyl butanone in cosmetic products by liquid chromatography*, **Cosmetics** 5 (2018) 44; y presentado en forma de cartel en la *XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica*, Valladolid (2019).

INTRODUCCIÓN

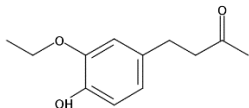
Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico rápido y sencillo que permita llevar a cabo la determinación de hidroxietoxifenil butanona en productos cosméticos, empleando LC-UV/Vis.

Compuesto estudiado

- Hidroxietoxifenil butanona (HEPB)

Tabla 6.1. Información sobre el compuesto estudiado.

Estructura química	Número CAS	M _r (g mol ⁻¹)	pK _a ^a	log K _{o/w} ^a
	569646-79-3	208.25	10.19	1.68

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs) V11.02 (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación de HEPB, compuesto empleado en los últimos años como conservante alternativo en los productos cosméticos. El método se basa en la lixiviación del analito asistida por ultrasonidos, seguida de su determinación por LC-UV/Vis. El método fue validado empleando las condiciones seleccionadas con un límite de detección de 30 µg g⁻¹, buenos coeficientes de recuperación (86-103 %) y repetibilidad (RSD <4.7 %). Finalmente, se analizaron siete productos cosméticos comerciales con matrices hidrofílicas y lipofílicas, como cremas hidratantes, protectores solares, champús, jabones de manos y bases de maquillaje. Además, se analizó una muestra cosmética preparada en el laboratorio conteniendo cantidades conocidas del analito. Los parámetros analíticos del método propuesto, junto con su sencillez e inocuidad, hacen que sea de gran utilidad en el control de calidad de los productos cosméticos.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrofotometría UV/Vis.
- Baño de ultrasonidos.

Reactivos

- HEPB (95 %) como patrón.
- Agua desionizada como disolvente en la preparación de muestras y patrones.
- Etanol y ácido acético como disolventes para la preparación de la fase móvil.

Muestras

Dos jabones de manos líquidos (muestras A, B), un champú (muestra C), dos protectores solares (muestras D, E), una crema hidratante (muestra F) y una base de maquillaje (muestra G).

Adicionalmente, se preparó a escala de laboratorio una crema cosmética conteniendo HEPB (muestra H, ver protocolo de elaboración en *Anexo 6.1*).

Método propuesto

Preparación de patrones

Se preparó una disolución patrón en agua desionizada conteniendo $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de HEPB en agua desionizada. A partir de ésta, se prepararon disoluciones patrón de trabajo, entre 1 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, en el mismo disolvente.

Preparación de muestras

Las muestras se prepararon pesando 0.1 g en un matraz aforado de 10 mL y enrasando con agua desionizada. A continuación, el matraz se introdujo en un baño de ultrasonidos hasta la completa dispersión de la muestra para lixiviar el analito. Finalmente, se tomó una alícuota de la disolución (filtrando en caso necesario) para su posterior análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: 20 μL
- Columna: LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm, 4 mm d.i., 5 μm)
- Temperatura de la columna: 35 °C
- Fase móvil:
 - Fase A: disolución acuosa de ácido acético (1 % v/v)
 - Fase B: etanol
- Modo: isocrático, fase A:fase B (77:23 v/v)
- Caudal: 0.8 mL min^{-1}
- Longitud de onda: 279 nm

RESULTADOS**Estudio de las variables cromatográficas**

Se estudió el efecto de la composición y el caudal de la fase móvil, la temperatura de la columna y la longitud de la columna utilizada.

Composición de la fase móvil

Como fase móvil acuosa se empleó una disolución de ácido acético (1 % v/v) y como modificador orgánico se empleó etanol. En este sentido, se ensayaron mezclas con diferentes proporciones, obteniendo los mejores resultados al emplear 23 % de etanol. Cabe indicar que se prefirió el uso de etanol frente a otros posibles modificadores orgánicos, como metanol o acetonitrilo, por su menor toxicidad.

Caudal

Se ensayaron valores entre 0.5 y 1 mL min^{-1} , obteniendo el mejor compromiso entre retención y tiempo de análisis a 0.8 mL min^{-1} .

Temperatura de la columna

Se ensayaron temperaturas entre 30 y 50 °C sin observar diferencias significativas. Se seleccionó una temperatura de 35 °C.

Longitud de la columna

Se comparó una columna Purospher® STAR RP-18e (125 mm, 4 mm d.i., 5 μm) con una columna LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm, 4 mm d.i., 5 μm), obteniendo la mejor separación al emplear esta última.

Estudio de variables en la preparación de muestras

Se llevaron a cabo estudios para encontrar un procedimiento de preparación común para muestras con diferente composición y forma cosmética. Se observó que en esta etapa de preparación no era necesario disolver la muestra por completo, sino que era suficiente con lixiviar el analito y separar la fracción insoluble por filtración.

Para ello, se ensayaron mezclas de agua desionizada con diferentes proporciones de etanol (entre 0 y 50 % v/v). Se obtuvieron picos cromatográficos desdoblados al emplear mezclas con un contenido en etanol ≥ 25 %, mientras que no se observaron diferencias significativas para contenidos menores. Por otro lado, los ensayos de solubilidad mostraron que la dispersión de la muestra en agua desionizada mediante agitación en baño de ultrasonidos permite lixiviar el analito, dada su elevada solubilidad en agua, sin necesidad de emplear disolventes orgánicos.

Parámetros analíticos del método propuesto

Linealidad

La linealidad estudiada alcanzó al menos 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.9997$).

Límites de detección y cuantificación

Los valores obtenidos para los límites instrumentales de detección ($3 S/N$) y cuantificación ($10 S/N$), siendo S/N la relación señal-ruido, fueron 0.3 y 0.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estos valores se corresponden con unos límites de detección y cuantificación del método de 30 y 90 $\mu\text{g g}^{-1}$ en muestra, respectivamente.

Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada aplicando el método propuesto a cinco réplicas de disoluciones patrón conteniendo HEPB a tres niveles de concentración (5,

25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, mostrados en la *Tabla 6.2*, revelan que se alcanzó una buena precisión ($\text{RSD} < 4.7 \%$).

Tabla 6.2. Estudio de la repetibilidad.

Repetibilidad intra-día (RSD, %) ^a			Repetibilidad inter-día (RSD, %) ^a		
5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
2.5	0.2	0.9	1.2	1.2	4.7

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), n = 5.

Exactitud

Se preparó en el laboratorio una crema cosmética conteniendo una cantidad conocida del analito (específicamente, 0.36 %, m/m) de acuerdo al procedimiento de elaboración descrito en el *Anexo 6.1*. La muestra se analizó por triplicado y el resultado obtenido fue $0.34 \pm 0.01 \%$, m/m. Por tanto, el error relativo de la determinación fue inferior al 5.6 %, mostrando que el método propuesto es exacto.

Análisis de muestras

En el análisis de las siete muestras cosméticas comerciales solo se detectó HEPB en la muestra F correspondiente a una crema hidratante, con un contenido de $0.083 \pm 0.002 \%$ m/m.

A modo de ejemplo, en la *Figura 6.1* se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos.

Estudio del efecto matriz

Para validar la exactitud del método propuesto se prepararon disoluciones de las muestras, se fortificaron con el analito a tres niveles de concentración (5, 25 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se evaluaron los coeficientes de recuperación. Los coeficientes de recuperación obtenidos (*Tabla 6.3*), entre 86 y 103 %, mostraron que no existió un efecto matriz significativo.

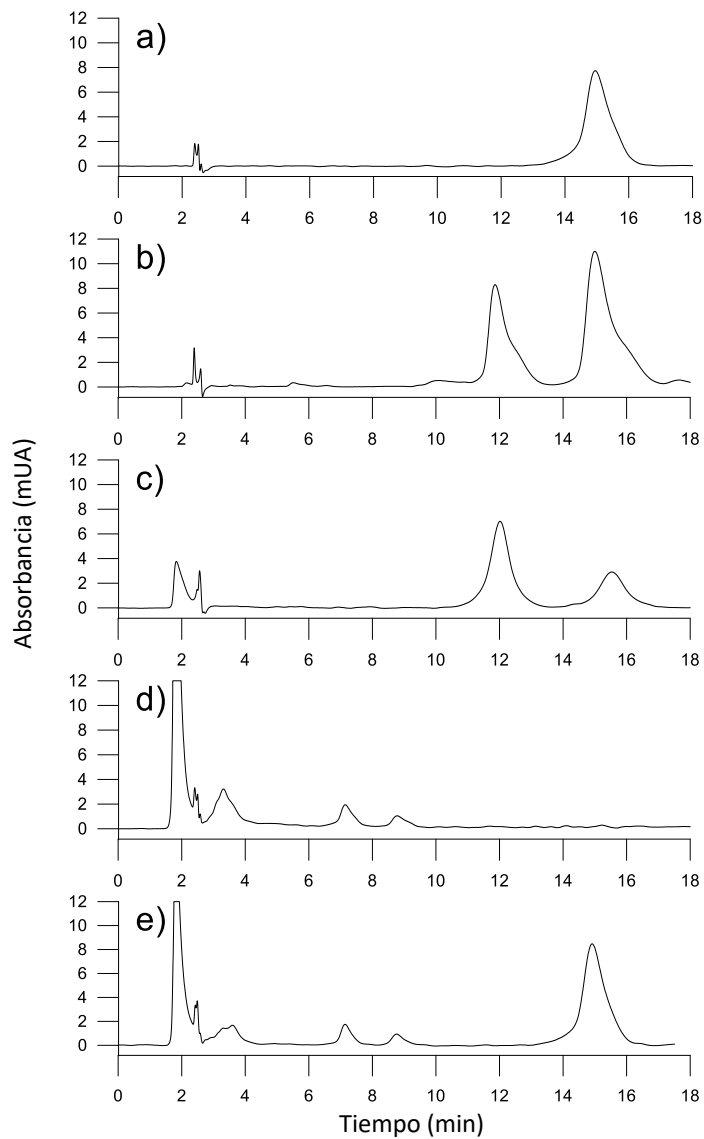


Figura 6.1. Cromatogramas obtenidos aplicando el método propuesto a: (a) disolución patrón ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), (b) crema preparada en el laboratorio (muestra H), (c) crema hidratante (muestra F), (d) protector solar (muestra G) y (e) protector solar (muestra G) fortificado con $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ en disolución.

Tabla 6.3. Estudio del efecto matriz.

Muestra ^a	Coeficiente de recuperación (%)		
	5 µg mL ⁻¹	25 µg mL ⁻¹	50 µg mL ⁻¹
A	98 ± 4	102 ± 2	101 ± 1
B	100 ± 4	100 ± 1	99 ± 1
C	99 ± 1	100 ± 1	99 ± 1
D	97 ± 1	98 ± 1	100 ± 1
E	89 ± 2	90 ± 2	87 ± 2
F	103 ± 8	92 ± 5	91 ± 1
G	93 ± 2	90 ± 1	89 ± 2
H	86 ± 2	102 ± 5	90 ± 5

^a A, B: jabones de manos; C: champú; D, E: protectores solares; F: crema hidratante; G: base de maquillaje; H: crema preparada en el laboratorio.

CONCLUSIONES

La hidroxietoxifenil butanona (HEPB) es un conservante alternativo cuyo uso en los productos cosméticos no está regulado. Además, el CCSC ha puesto de manifiesto su posible toxicidad por exposición prolongada. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para la determinación de HEPB en productos cosméticos.
- El trabajo presentado en este capítulo es el primer método publicado en la bibliografía analítica que propone esta determinación.
- El método se basa en la simple lixiviación del analito asistida por ultrasonidos seguida de LC-UV/Vis.
- El método propuesto permite el análisis en diferentes tipos de muestras cosméticas, con matrices hidrofílicas y lipofílicas.
- Las buenas prestaciones analíticas del método propuesto, además de su sencillez, rapidez y asequibilidad, hacen que sea útil para llevar a cabo el control de calidad de los productos cosméticos.
- El método propuesto es inocuo para el operador y el medio ambiente, de acuerdo a los principios de la *Química Analítica Ecológica*, ya que no se utiliza ningún disolvente orgánico durante la etapa de preparación de muestras.

Anexo 6.1

**Protocolo de elaboración de la formulación cosmética
empleada en este capítulo**

En el desarrollo de este capítulo se preparó a escala de laboratorio una crema cosmética conteniendo hidroxietoxifenil butanona (HEPB) para llevar a cabo el estudio de exactitud descrito anteriormente. A continuación, se detallan los ingredientes empleados, así como la composición y el modo de preparación de esta formulación cosmética.

Ingredientes

- *Aceite de aguacate*: mezcla natural de ácidos grasos saturados, oleico y linoleico, muy rica en vitaminas A, B₁, B₂, D y E. Actúa principalmente como emoliente.
- *Base PFC o/w*: crema base que permite la elaboración de emulsiones aceite/agua compuesta por una mezcla de miristato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila.
- *Dimeticona 350*: mezcla de siliconas entre las que se encuentra el dimetilsiloxano. Entre sus funciones destaca favorecer la formación de emulsiones, proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto y actuar como vehículo de los componentes activos.
- *Hidrovitón*[®]: mezcla de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes y cloruro sódico, cuya función es hidratar la piel.
- *Fenonip*[®]: mezcla de parabenos y fenoxietanol que actúa como conservante.
- *Propilenglicol*: agente emoliente que actúa como humectante, impidiendo la desecación de la capa córnea de la piel.

Adicionalmente, se empleó como ingrediente cosmético el patrón comercial de HEPB (95 %).

Formulación

<i>Fase A:</i>	Base PFC o/w	20 %
	Aceite de aguacate	5 %
	Dimeticona 350	5 %
<i>Fase B:</i>	Propilenglicol	5 %
	Hidrovitón®	4 %
	HEPB	0.4 %
	Agua	c.s.p. 100 %
<i>Fase C:</i>	Fenonip®	0.5 %

Elaboración

En primer lugar, se pesan los componentes de las fases A y B en sendos vasos de precipitados, se tapan con un vidrio de reloj y se sumergen en un baño de agua caliente (70 °C) hasta que la fusión de la fase A sea completa. Posteriormente, se vierte lentamente y bajo agitación constante la fase B sobre la fase A. A continuación, se retira el vaso de precipitados del baño caliente y, sin cesar la agitación, se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente, se adiciona la fase C y se mantiene la agitación hasta conseguir la completa homogenización.

CAPÍTULO 7

DETERMINACIÓN DE CONSERVANTES ALTERNATIVOS EN PRODUCTOS COSMÉTICOS MEDIANTE DERIVATIZACIÓN SEGUIDA DE SEMI-MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO ASISTIDA POR VÓRTICE Y CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *Determination of alternative preservatives in cosmetics products by chromophoric derivatization followed by vortex-assisted liquid-liquid semimicroextraction and liquid chromatography*, **Talanta** 154 (2016) 1-6; y presentado en forma de cartel en el *18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on Separation Sciences*, Toruń, Polonia (2016).

INTRODUCCIÓN

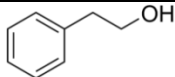
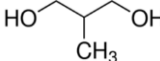
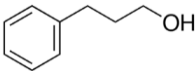
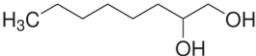
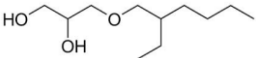
Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico que permita la determinación simultánea de cinco conservantes alternativos en productos cosméticos, que todavía no están regulados por el actual Reglamento Europeo sobre productos cosméticos, empleando la semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLSME) seguida de LC-UV/Vis.

Compuestos estudiados

- Alcohol fenético, 2-feniletanol (PA)
- Metilpropanodiol, 2-metil-1,3-propanodiol (MP)
- Fenilpropanol, 3-fenilpropanol (PP)
- Caprilil glicol, 1,2-octanodiol (CG)
- Etilhexilglicerina, 3-[(2-etilhexil)oxi]-1,2-propanodiol (EG)

Tabla 7.1. Información sobre los compuestos estudiados.

Analito	Estructura química	Número CAS	M_r (g mol ⁻¹)	pK _a ^a	log K _{o/w} ^a
PA		60-12-8	122.16	15.17	1.50
MP		2163-42-0	90.12	14.51	-0.74
PP		122-97-4	136.19	15.04	1.78
CG		1117-86-8	146.23	14.60	1.54
EG		70445-33-9	204.31	13.67	2.47

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea de alcohol fenético, metilpropanodiol, fenilpropanol, caprilil glicol y etilhexilglicerina, empleados como conservantes alternativos en

productos cosméticos. El método propuesto está basado en la derivatización de los analitos con cloruro de benzoílo (*Figura 7.1*) para mejorar su respuesta en el detector de absorción UV/Vis seguida de VALLsME, cuyo procedimiento se ha descrito en el Capítulo 2, y LC-UV/Vis. En primer lugar, se estudiaron las variables cromatográficas, las condiciones de la reacción de derivatización y la preparación de las muestras. Con las condiciones seleccionadas, el método fue validado con coeficientes de recuperación cuantitativos (84-118 %), límites de detección comprendidos entre 1 y 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ y buena repetibilidad (RSD <9.5 %). Finalmente, se aplicó el método propuesto al análisis de diez muestras cosméticas comerciales.

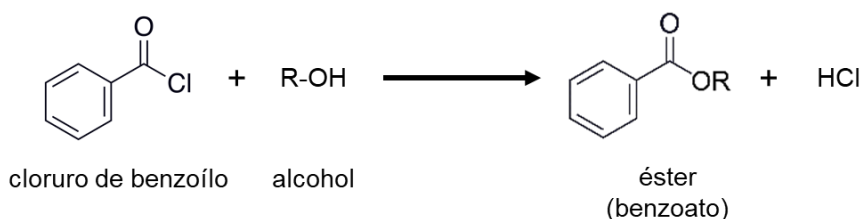


Figura 7.1. Esquema de la reacción de derivatización con cloruro de benzoílo.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrofotometría UV/Vis.
- Agitador de vórtice, centrífuga y placa calefactora.

Reactivos

- PP (98 %), CG (98 %), PA (99%), MP (99 %) y EG (98 %) como patrones.
- Cloruro de benzoílo e hidróxido de sodio (NaOH) como reactivos para la derivatización.
- Hexano, acetonitrilo, ácido acético y agua desionizada como disolventes en la preparación de patrones, muestras y fase móvil.

Muestras

Cuatro cremas hidratantes (muestras A-D), dos protectores solares (muestras E, F) y cuatro geles de baño (muestras G-H).

Método propuesto

Preparación de muestras

Las muestras se prepararon, por triplicado, pesando 0.1 g en un matraz aforado de 5 mL y se enrasaron con agua desionizada. En caso necesario, la disolución se centrifugó y filtró para eliminar los compuestos insolubles. A continuación, se tomó una alícuota de 0.5 mL que se transfirió a un matraz aforado de 5 mL al que se añadieron 1 mL de NaOH 5 M y 20 μL de cloruro de benzoilo para llevar a cabo la derivatización. Después, la mezcla se agitó vigorosamente durante 3 min mediante agitación en vórtice y tras esto se enrasó con agua desionizada. Posteriormente, la disolución se trasvasó a un tubo de punta cónica y se añadió 1 mL de hexano para llevar a cabo la VALLsME (Figura 7.2) durante 30 s. A continuación, se recogió el sobrenadante y se transfirió a un vial de inyección cromatográfico donde se evaporó a sequedad sobre una placa calefactora a 60 °C, en vitrina extractora. Finalmente, se reconstituyó el extracto añadiendo 400 μL de acetonitrilo.

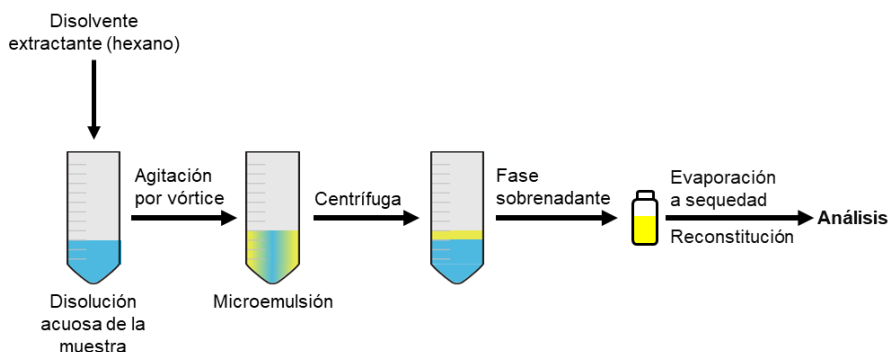


Figura 7.2. Esquema de la semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLsME).

Preparación de patrones

Se preparó una disolución patrón en agua desionizada conteniendo 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos. A partir de ésta, se prepararon disoluciones patrón de trabajo, entre 1 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y se sometieron al mismo proceso de derivatización y extracción.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: 20 μL
- Columna: Purospher® STAR RP-18e (125 mm, 4 mm d.i., 5 μm)
- Temperatura de la columna: 30 °C
- Fase móvil:
 - Fase A: disolución acuosa de ácido acético (0.5 % v/v)
 - Fase B: acetonitrilo
- Modo: gradiente (*Tabla 7.2*)
- Caudal: 1 mL min⁻¹
- Longitud de onda: 235 nm

Tabla 7.2. Programa de elución en gradiente.

Tiempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0.0	40	60
4.0	40	60
10.0	0	100
11.0	0	100
11.1	40	60
14.0	40	60

RESULTADOS

Estudio de las variables cromatográficas

Se estudió la influencia de la composición de la fase móvil y la temperatura de la columna.

Composición de la fase móvil

Como fase móvil acuosa se usó una disolución de ácido acético en agua desionizada (0.5 % v/v). Aunque los analitos se encuentran en su forma neutra en el todo el intervalo de pH compatible con la columna (ver *Tabla 7.1*), el uso de una disolución acuosa de ácido acético como fase móvil permitió mejorar el perfil de los picos cromatográficos, aumentando su simetría y evitando la aparición de colas.

Como modificadores orgánicos de la fase móvil se ensayaron acetonitrilo y etanol. Los mejores resultados se obtuvieron al usar acetonitrilo, debido a su menor absorbancia en la longitud de onda de detección (235 nm). Finalmente, se ensayaron diferentes programas de elución en gradiente, obteniéndose los mejores resultados con el programa indicado anteriormente.

Temperatura de la columna

Se ensayaron temperaturas entre 30 y 50 °C. No se observaron diferencias significativas, por lo que se seleccionaron 30 °C. En la *Figura 7.3* se muestra la separación cromatográfica de los analitos derivatizados.

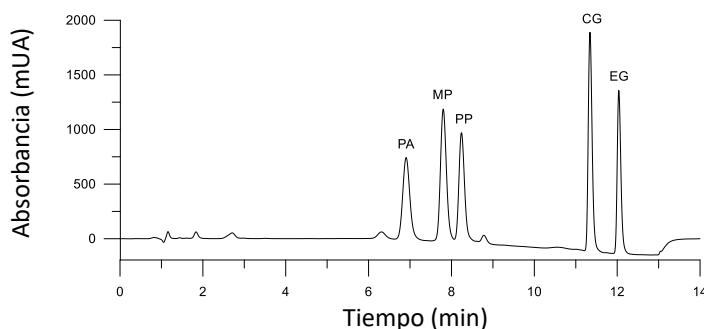


Figura 7.3. Cromatograma de una disolución patrón ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Estudio de variables en la derivatización

Se estudió el efecto del volumen de los reactivos empleados y el tiempo de reacción en la etapa de derivatización analizando disoluciones patrón de los analitos ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Volumen de reactivos

Se ensayaron 10, 20 y 30 μL de cloruro de benzoílo combinados con 0.5 y 1 mL de NaOH 5 M. En las *Figuras 7.4* y *7.5* se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, los mejores resultados se obtuvieron con 20 μL de cloruro de benzoílo y 1 mL de NaOH 5 M.

Resumen de los resultados experimentales

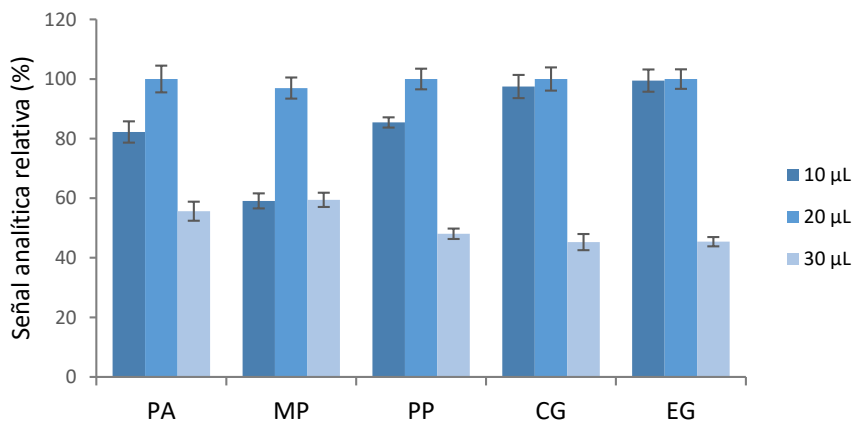


Figura 7.4. Estudio del volumen de cloruro de benzoilo. Volumen de NaOH 5 M: 1 mL.

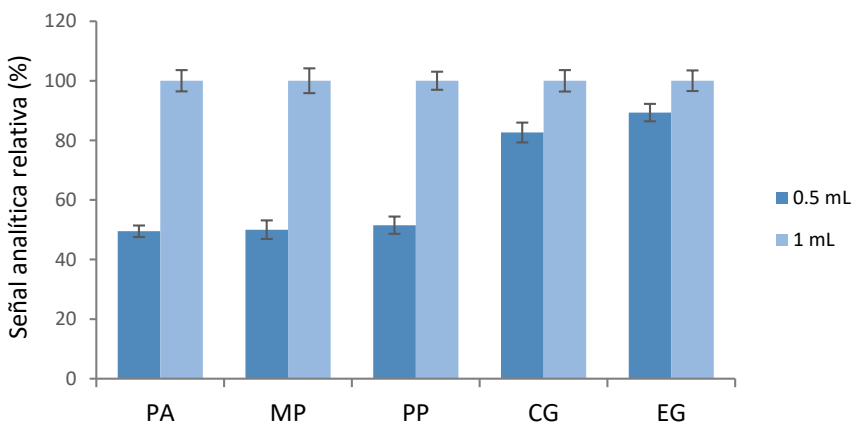


Figura 7.5. Estudio del volumen de NaOH 5 M. Volumen de cloruro de benzoilo: 20 µL.

Tiempo de reacción

Para asistir la derivatización se utilizó la agitación en vórtice. Se ensayaron tiempos de reacción de 0.5, 1, 2, 3 y 5 min. Como se observa en la Figura 7.6, la reacción se completó tras 3 min de agitación.

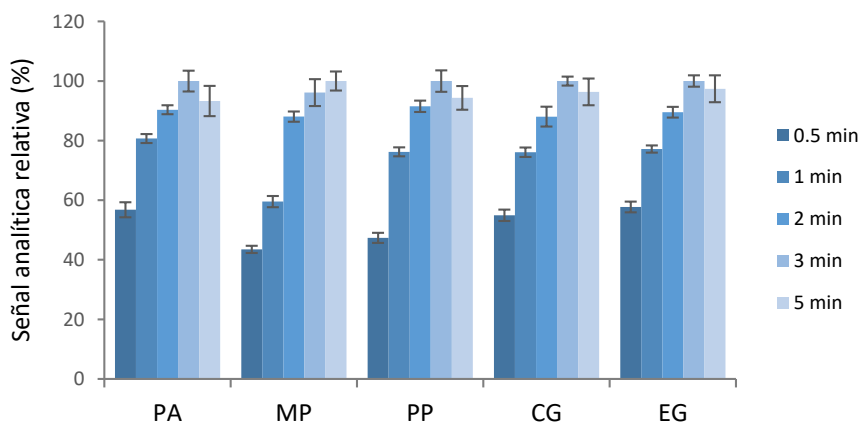


Figura 7.6. Estudio del tiempo de reacción en la derivatización.

Estudio de variables en la semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLsME)

Tras la derivatización se llevó a cabo la VALLsME para preconcentrar los analitos, eliminar posibles interferentes y evitar la degradación de los derivados obtenidos. Se estudió la influencia del volumen de extracción, el tiempo de extracción y el volumen de reconstitución.

Volumen de extracción

Se ensayaron 0.5, 1 y 2 mL de hexano como extractante. Como se observa en la Figura 7.7, los mejores resultados se obtuvieron con 1 mL de hexano.

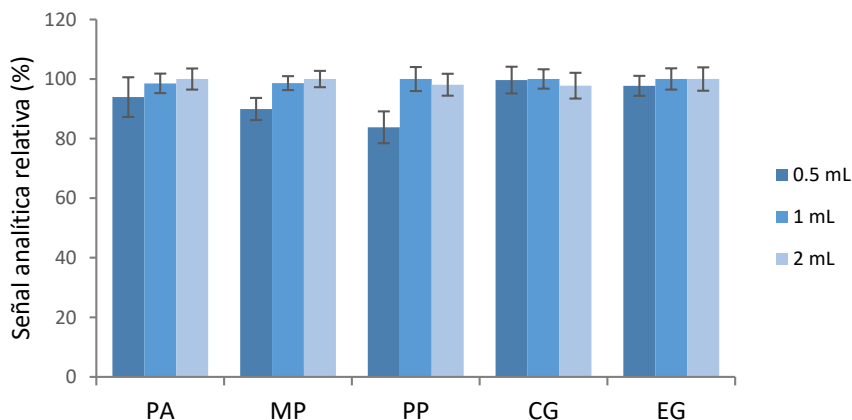


Figura 7.7. Estudio del volumen de extracción.

Tiempo de extracción

Para incrementar la superficie de contacto entre las fases se empleó la agitación por vórtice. Se ensayaron 10, 30, 60 y 90 s como tiempo de extracción. Como se observa en la *Figura 7.8*, los mejores resultados en términos de precisión y sensibilidad se obtuvieron tras 30 s de extracción.

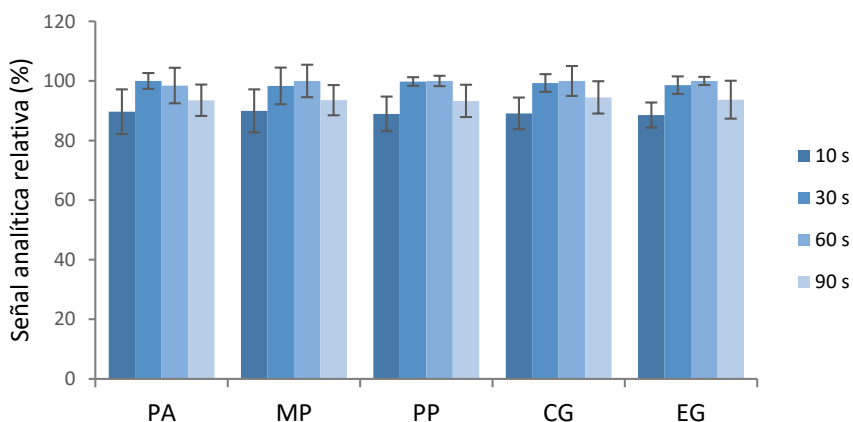


Figura 7.8. Estudio del tiempo de extracción.

Volumen de reconstitución

Tras la evaporación de los extractos se reconstituyó con 100, 250, 400 o 500 μL de acetonitrilo. Se seleccionó un volumen de 400 μL para mantener un buen compromiso entre sensibilidad y precisión.

Estudio de la estabilidad de los analitos derivatizados

Durante los ensayos preliminares se analizaron disoluciones de patrones y muestras tras la derivatización, sin llevar a cabo la VALLsME. Se observó que los derivados formados (ésteres de ácido benzoico) eran inestables en el medio alcalino en el que había tenido lugar la reacción, ya que podían descomponerse por hidrólisis (*Figura 7.9*).

estándar de los residuales y b la pendiente de la recta de calibrado, así como los límites del método (en las muestras) teniendo en cuenta el procedimiento experimental.

Tabla 7.3. Límites de detección y cuantificación.

Analito	Límites instrumentales		Límites del método ^c	
	LOD ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)
PA	0.03	0.11	1.5	6
MP	0.06	0.19	3	10
PP	0.02	0.06	1	3
CG	0.06	0.18	3	9
EG	0.02	0.07	1	4

^a LOD: límite de detección ($3 S_{y/x}/b$).

^b LOQ: límite de cuantificación ($10 S_{y/x}/b$).

^c Límites del método calculados para una masa de 0.1 g.

Factores de enriquecimiento

La *Tabla 7.4* contiene los valores obtenidos para los factores de enriquecimiento, definidos como $EF=C_{ext}/C_0$ donde C_{ext} es la concentración de analito en el extracto y C_0 es la concentración inicial antes de la extracción, que estuvieron comprendidos entre 10.7 y 13.6.

Tabla 7.4. Factores de enriquecimiento y rendimientos de extracción.

Analito	EF ^a	RE (%) ^b
PA	13.1 \pm 0.9	105 \pm 7
MP	13.6 \pm 1.2	109 \pm 9
PP	12.6 \pm 0.7	101 \pm 6
CG	11.5 \pm 0.4	92 \pm 3
EG	10.7 \pm 0.6	86 \pm 1

^a EF: factor de enriquecimiento.

^b RE: rendimiento de extracción.

Rendimientos de extracción

Considerando los factores de enriquecimiento y teniendo en cuenta el procedimiento experimental ($EF_{m\acute{a}x}= 12.5$), los valores obtenidos para los rendimientos de extracción estuvieron comprendidos entre 86 y 109 % (*Tabla 7.4*).

Repetibilidad

Se evaluó la repetibilidad aplicando el procedimiento completo a diez réplicas de disoluciones patrón conteniendo los analitos a dos niveles de concentración (1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, mostrados en la *Tabla 7.5*, indican que se alcanzó una buena precisión ($\text{RSD} < 9.5 \%$).

Tabla 7.5. Estudio de la repetibilidad.

Analito	Repetibilidad (RSD, %) ^a			
	Intra-día		Inter-día	
	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	$10 \mu\text{g mL}^{-1}$	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	$10 \mu\text{g mL}^{-1}$
PA	3.9	4.7	6.7	6.9
MP	6.2	6.5	8.7	8.4
PP	6.9	6.7	9.5	9.1
CG	6.0	6.2	8.6	8.5
EG	6.8	7.0	9.2	9.3

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), $n = 10$.

Análisis de muestras

Los resultados obtenidos en el análisis de las diez muestras cosméticas comerciales se muestran en la *Tabla 7.6*. En la *Figura 7.11* se muestran, a modo de ejemplo, algunos de los cromatogramas obtenidos.

Tabla 7.6. Resultados obtenidos en el análisis de muestras comerciales.

Muestra ^a	Concentración (% m/m)				
	PA	MP	PP	CG	EG
A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C	n.d.	n.d.	n.d.	0.18 ± 0.01	n.d.
D	n.d.	n.d.	n.d.	0.065 ± 0.005	0.047 ± 0.003
E	0.76 ± 0.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F	0.79 ± 0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G	n.d.	1.88 ± 0.07	0.078 ± 0.005	0.51 ± 0.07	n.d.
H	n.d.	1.95 ± 0.05	0.084 ± 0.006	0.62 ± 0.04	n.d.
I	n.d.	1.72 ± 0.09	0.087 ± 0.006	0.59 ± 0.02	n.d.
J	n.d.	1.84 ± 0.05	0.076 ± 0.004	0.55 ± 0.03	n.d.

^a A-D: cremas hidratantes; E, F: protectores solares; G-H: geles de baño.
n.d.: no detectado.

Resumen de los resultados experimentales

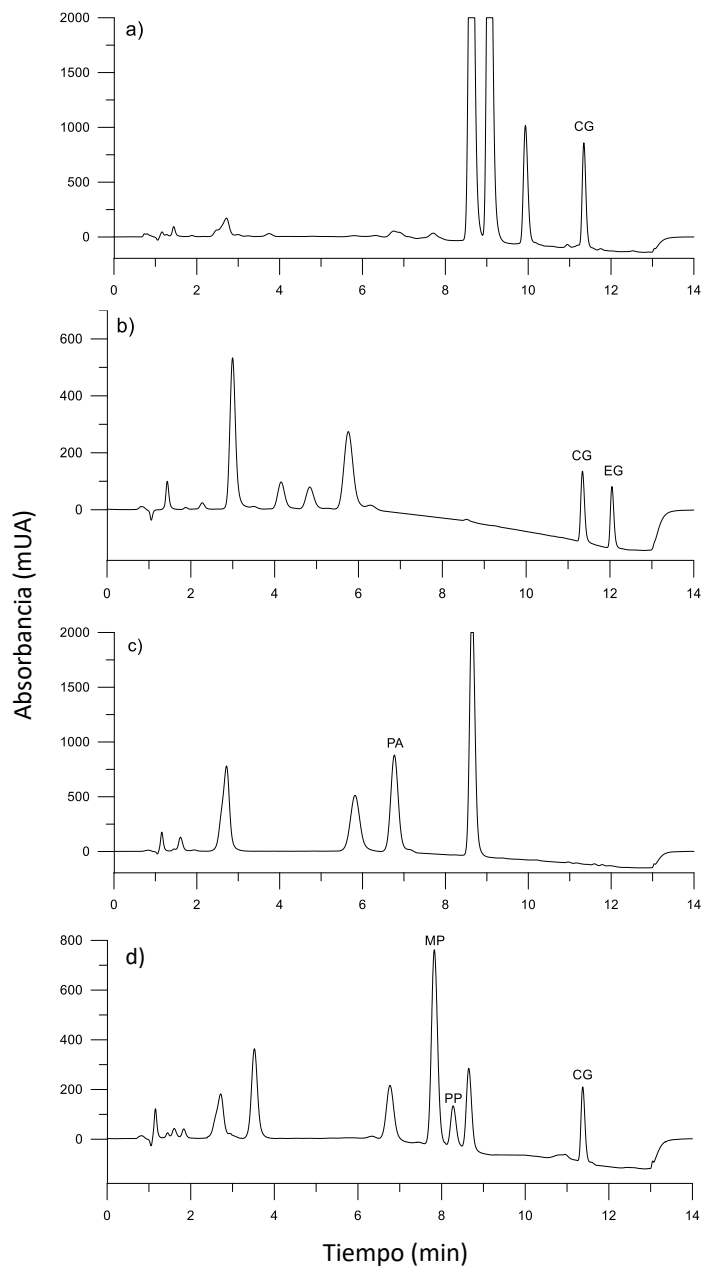


Figura 7.11. Cromatogramas obtenidos aplicando el método propuesto a las muestras: (a) muestra C (crema hidratante), (b) muestra D (crema hidratante), (c) muestra E (protector solar) y (d) muestra G (gel de baño).

Estudio del efecto matriz

Para evaluar la exactitud se prepararon por triplicado disoluciones de cuatro muestras cosméticas y se fortificaron con los analitos a dos niveles de concentración (1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Los coeficientes de recuperación obtenidos, que se muestran en la *Tabla 7.7*, estuvieron comprendidos entre 84 y 118 %, indicando que no se dio un efecto matriz significativo.

Tabla 7.7. Estudio del efecto matriz.

Muestra ^a	Concentración fortificada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coeficiente de recuperación (%)				
		PA	MP	PP	CG	EG
A	1	102 ± 5	87 ± 7	97 ± 5	85 ± 9	104 ± 4
	10	105 ± 8	84 ± 3	107 ± 5	106 ± 3	115 ± 7
B	1	99 ± 4	90 ± 6	91 ± 3	118 ± 8	105 ± 8
	10	86 ± 3	94 ± 4	106 ± 3	97 ± 6	92 ± 5
C	1	94 ± 6	92 ± 3	97 ± 4	108 ± 9	98 ± 5
	10	110 ± 9	84 ± 7	108 ± 7	106 ± 5	100 ± 6
G	1	90 ± 7	n.c.	89 ± 3	98 ± 4	94 ± 6
	10	93 ± 6	92 ± 5	112 ± 8	100 ± 5	103 ± 3

^a A-C: cremas hidratantes; G: gel de baño.

n.c.: no calculado, el analito se encontró en la muestra en concentración elevada.

CONCLUSIONES

Los conservantes alternativos objeto de estudio todavía no están regulados por el actual Reglamento Europeo sobre los productos cosméticos. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea de cinco conservantes alternativos en productos cosméticos.
- El método se basa en una derivatización seguida de una semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice (VALLSME) y LC-UV/Vis.
- El método propuesto permite el análisis de diferentes tipos de muestras cosméticas, con matrices hidrofílicas y lipofílicas.

Resumen de los resultados experimentales

- Las buenas características analíticas del método propuesto, además de su sencillez y rapidez, lo hacen útil para llevar a cabo el control de calidad de los productos cosméticos que contienen los conservantes objeto de estudio.
- El método propuesto es seguro para el operador y respetuoso con el medio ambiente, según los principios de la *Química Analítica Ecológica*, ya que solo se requiere el uso de pequeños volúmenes de disolventes orgánicos.

CAPÍTULO 8

DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS FENÓLICOS EN PRODUCTOS COSMÉTICOS Y MATERIAS PRIMAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *Determination of phenolic endocrine disruptors in cosmetics by high-performance liquid chromatography mass spectrometry*, **Analytical Letters** 51 (2018) 717-727; y presentado en forma de cartel en el 18th *International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on Separation Sciences*, Toruń, Polonia (2016).

INTRODUCCIÓN

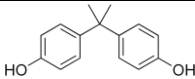
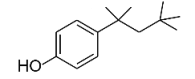
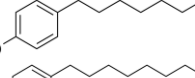

Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico que permita la determinación simultánea de cuatro disruptores endocrinos, pertenecientes a la familia de los alquilfenoles, en productos cosméticos y materias primas mediante LC-MS.

Compuestos estudiados

- Bisfenol A, 2,2-bis-(4-hidroxifenil)propano (BPA).
- 4-t-Octilfenol, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol (t-OP).
- 4-n-Octilfenol (OP).
- 4-n-Nonilfenol (NP).

Tabla 8.1. Información sobre los compuestos estudiados.

Analito	Estructura química	Número CAS	M _r (g mol ⁻¹)	pK _a ^a	log K _{o/w} ^a
BPA		80-05-7	228.29	10.29	3.64
t-OP		140-66-9	206.32	10.15	5.18
OP		1806-26-4	206.32	10.15	5.63
NP		104-40-5	220.35	10.15	6.14

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

Se ha desarrollado y validado un método analítico basado en LC-MS para la determinación simultánea de cuatro alquilfenoles considerados tóxicos para la salud humana por su actividad como disruptores endocrinos. Para corregir el efecto matriz se utilizó la calibración por adición de patrón, obteniendo límites de detección entre 0.14 y 0.3 µg g⁻¹. El método fue validado con coeficientes de recuperación cuantitativos (90-106 %) y buena repetibilidad (RSD <8.2 %). Finalmente, se aplicó al análisis de diez productos cosméticos comerciales y materias primas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrometría de masas.
- Agitador de vórtice, centrífuga y pH-metro.

Reactivos

- BPA ($\geq 99\%$), t-OP (97%), OP (99%) y NP (99.8%) como patrones.
- Etanol y agua desionizada como disolventes en la preparación de muestras y patrones.
- Amoníaco (ac.), acetato de amonio, metanol grado-MS y agua grado-MS como disolventes para la preparación de la fase móvil.

Muestras

Seis cremas hidratantes (muestras A-F), un gel de baño (muestra G), un champú (muestra H) y dos materias primas de etoxilatos de alquilfenol (muestras I, J) empleados como surfactantes.

Método propuesto

Preparación de muestras y patrones

Se preparó una disolución patrón conteniendo $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos, empleando una mezcla de etanol y agua desionizada (1:1) como disolvente. Esta disolución se empleó posteriormente para preparar las disoluciones de trabajo mediante el método de adición de patrón.

Las muestras se prepararon pesando 1 g de producto cosmético o 0.01 g de materia prima en un matraz aforado de 10 mL y se enrasó con el mismo disolvente. La mezcla se agitó durante 30 s mediante agitación de vórtice y se centrifugó y/o filtró en caso necesario para eliminar la fracción insoluble.

Finalmente, las disoluciones de trabajo, entre 0 y 250 ng mL^{-1} , se prepararon en viales de inyección añadiendo 500 μL de la disolución de muestra, diferentes alícuotas de la disolución patrón (0-250 μL) y completando hasta 1 mL con el mismo disolvente.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: 20 μL
- Columna: Purospher® STAR RP-18e (125 mm, 4 mm d.i., 5 μm)
- Temperatura de la columna: 45 °C
- Fase móvil:
 - Fase A: disolución acuosa de acetato amónico (5 mM, pH 8)
 - Fase B: metanol
- Modo: gradiente (*Tabla 8.2*)
- Caudal: 1 mL min⁻¹

Tabla 8.2. Programa de elución en gradiente.

Tiempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0	30	70
0.5	30	70
6	15	85
9.5	15	85
9.6	30	70
12	30	70

La detección de los analitos por espectrometría de masas se llevó a cabo mediante ionización por electrospray (ESI, del inglés *electrospray ionization*) en modo negativo y monitorización de iones seleccionados (SIM, del inglés *selected ion monitoring*) con los siguientes parámetros: caudal de gas de secado, 12 L min⁻¹; temperatura de gas de secado, 350 °C; presión del nebulizador, 35 psi; voltaje del capilar, 3000 V; voltaje de fragmentación, 125 V para BPA, 140 V para t-OP y OP, 160 V para NP; relación masa-carga (*m/z*), 227 para BPA, 205 para t-OP y OP, 219 para NP.

RESULTADOS**Estudios previos**

Se llevaron a cabo análisis preliminares y se observó que algunos compuestos procedentes de la matriz de las muestras coelúan con los analitos, lo que podría ocasionar diferencias en la ionización de los analitos procedentes de las muestras en comparación con los procedentes de las disoluciones patrón. Es decir, que los compuestos que coeluyen pueden modificar la eficiencia de

la ionización de los analitos y provocar la supresión o la intensificación de la señal analítica (efecto matriz).

Además, debido a la formulación más o menos compleja de las muestras cosméticas, se propuso llevar a cabo una etapa de limpieza previa a la determinación cromatográfica para eliminar potenciales interferentes. Se ensayaron diferentes procedimientos de (micro)extracción, como LLE, DLLME o SPE, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios en ningún caso. El BPA es significativamente más polar que los otros alquilfenoles estudiados (ver *Tabla 8.1*), pero todos en un rango de polaridad similar a los compuestos interferentes, por lo que no se pudo conseguir la extracción selectiva de los cuatro analitos con los procedimientos ensayados.

Estudio de variables en la espectrometría de masas

Se estudió la influencia de la polaridad de la ionización (modo positivo o modo negativo), el caudal del gas de secado (entre 1 y 13 L min⁻¹), la temperatura del gas de secado (entre 100 y 350 °C), la presión del nebulizador (entre 10 y 35 psi), el voltaje del capilar (entre 600 y 6000 V), el voltaje de fragmentación (entre 40 y 400 V) y la relación *m/z* para la monitorización de los iones. Se ensayaron diferentes valores para cada variable y se seleccionaron aquellos que proporcionaron la mayor señal analítica.

Estudio de las variables cromatográficas

Se estudió la influencia de la composición de la fase móvil, el pH de la fase móvil y la temperatura de la columna.

Composición de la fase móvil

Como fase móvil se usó una disolución 5 mM de acetato amónico en agua desionizada y metanol como modificador orgánico. Se ensayaron diferentes programas de elución en gradiente, obteniéndose los mejores resultados con el programa indicado en el método propuesto.

pH de la fase móvil

Se ensayaron disoluciones de acetato amónico 5 mM ajustadas a diferentes pH en el intervalo 5-8. No se observaron diferencias significativas en la

separación cromatográfica, pero sí se observó una mejora significativa en la señal analítica de t-OP, OP y NP a pH 8, como se observa en la *Figura 8.1*, por mejorar la eficiencia de la ionización.

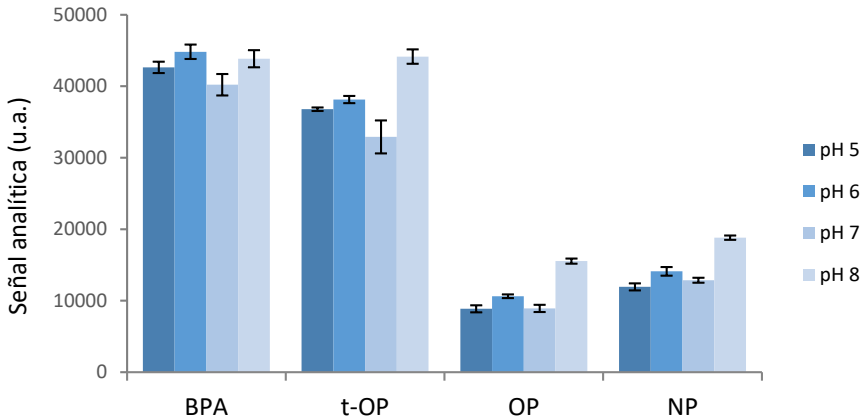


Figura 8.1. Estudio de la influencia del pH de la fase móvil.

Temperatura de la columna

Se ensayaron temperaturas entre 30 y 60 °C. Se observó un ligero estrechamiento de los picos cromatográficos al aumentar la temperatura, por lo que se seleccionó una temperatura de 45 °C. Con estas condiciones, se obtuvo una buena separación cromatográfica de los analitos en menos de 10 min, como se observa en la *Figura 8.2*.

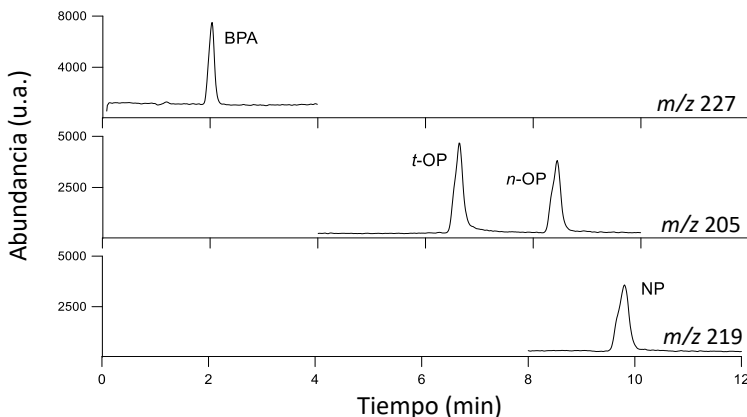


Figura 8.2. Cromatograma de una disolución patrón de los analitos (250 ng mL⁻¹).

Estudio del efecto matriz

Se estudió el efecto matriz mediante el análisis de muestras fortificadas empleando calibración externa. Se evaluaron los coeficientes de recuperación (*Tabla 8.3*) que estuvieron comprendidos entre 15 y 186 %, mostrando la existencia de un efecto matriz significativo en la determinación.

Tabla 8.3. Estudio del efecto matriz.

Muestra ^a	Concentración fortificada (ng mL ⁻¹)	Coeficiente de recuperación (%)			
		BPA	t-OP	OP	NP
A	50	36 ± 2	71 ± 5	170 ± 15	64 ± 5
	250	37 ± 4	77 ± 5	186 ± 17	67 ± 4
B	50	42 ± 3	60 ± 3	159 ± 12	29 ± 3
	250	44 ± 6	75 ± 4	160 ± 10	33 ± 2
C	50	53 ± 3	69 ± 4	87 ± 8	30 ± 6
	250	48 ± 2	76 ± 5	112 ± 9	36 ± 4
D	50	55 ± 4	82 ± 4	95 ± 5	38 ± 3
	250	51 ± 4	84 ± 5	104 ± 7	43 ± 5
E	50	35 ± 3	71 ± 6	160 ± 15	45 ± 7
	250	36 ± 2	79 ± 4	145 ± 13	45 ± 4
F	50	34 ± 5	56 ± 3	180 ± 18	27 ± 3
	250	45 ± 5	48 ± 6	138 ± 11	32 ± 4
G	50	98 ± 7	23 ± 3	34 ± 3	19 ± 2
	250	89 ± 5	20 ± 2	22 ± 3	15 ± 2
H	50	54 ± 3	29 ± 3	46 ± 7	15 ± 2
	250	62 ± 4	32 ± 4	27 ± 4	16 ± 3
I	50	97 ± 6	117 ± 8	101 ± 8	83 ± 6
	250	120 ± 9	108 ± 7	108 ± 6	109 ± 7
J	50	106 ± 6	102 ± 5	97 ± 5	115 ± 6
	250	108 ± 7	112 ± 6	114 ± 7	114 ± 5

^a A-F: cremas hidratantes; G: gel de baño; H: champú; I, J: etoxilatos de alquilfenol.

Para verificar la exactitud empleando calibración por adición de patrón se analizaron disoluciones de muestras exentas de analito fortificadas con una concentración conocida de los analitos (50 ng mL⁻¹). Los resultados obtenidos (*Tabla 8.4*) mostraron que la calibración por adición de patrón permitió corregir el efecto matriz.

Tabla 8.4. Estudio de la exactitud.

Muestra ^a	Concentración fortificada (ng mL ⁻¹)	Coeficiente de recuperación (%)			
		BPA	t-OP	OP	NP
C	50	95 ± 5	97 ± 2	106 ± 7	98 ± 3
G	50	90 ± 4	98 ± 3	100 ± 2	94 ± 4
H	50	95 ± 6	94 ± 2	93 ± 3	102 ± 5

^a C: crema hidratante; G: gel de baño; H: champú.

Parámetros analíticos del método propuesto

Linealidad

La linealidad estudiada alcanzó al menos 500 ng mL⁻¹ para todos los analitos, obteniéndose coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.990$).

Límites de detección y cuantificación

La *Tabla 8.5* contiene los valores obtenidos para los límites de detección ($3 S_{y/x}/b$) y cuantificación ($10 S_{y/x}/b$) instrumentales, siendo $S_{y/x}$ la desviación estándar de los residuales y b la pendiente de la recta de calibrado, así como los correspondientes límites del método teniendo en cuenta el procedimiento experimental. Los límites se muestran como intervalos debido a las diferencias observadas en la respuesta analítica (pendiente de la recta de calibrado) de las diferentes muestras ensayadas.

Tabla 8.5. Límites de detección y cuantificación.

Analito	Límites instrumentales		Límites del método ^c	
	LOD ^a (ng mL ⁻¹)	LOQ ^b (ng mL ⁻¹)	LOD ^a (μg g ⁻¹)	LOQ ^b (μg g ⁻¹)
BPA	7-12	23-40	0.14-0.2	0.5-0.8
t-OP	9-14	30-46	0.18-0.3	0.6-0.9
OP	8-15	26-50	0.16-0.3	0.5-1
NP	10-15	33-50	0.2-0.3	0.7-1

^a LOD: límite de detección ($3 S_{y/x}/b$).

^b LOQ: límite de cuantificación ($10 S_{y/x}/b$).

^c Límites del método calculados para una masa de 1 g.

Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada aplicando el procedimiento completo a diez réplicas de disoluciones patrón conteniendo los analitos a dos niveles de

concentración (50 y 250 ng mL⁻¹) en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, que se muestran en la *Tabla 8.6*, indican que se alcanzó una buena precisión (RSD <8.2 %).

Tabla 8.6. Estudio de la repetibilidad.

Analito	Repetibilidad (RSD, %) ^a			
	Intra-día		Inter-día	
	50 ng mL ⁻¹	250 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹	250 ng mL ⁻¹
BPA	5.5	3.2	7.3	3.3
t-OP	6.8	2.7	6.1	3.3
OP	7.4	2.9	8.2	3.2
NP	6.5	4.6	4.8	4.7

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), n = 10.

Análisis de muestras

En el análisis de las muestras comerciales no se detectaron los compuestos estudiados en seis de los ocho productos cosméticos analizados (muestras C-H). Se encontró OP en dos de las cremas hidratantes (muestra A, $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$; muestra B, $0.9 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$). Además, se encontró t-OP en las dos materias primas analizadas en concentraciones elevadas (muestra I, $520 \pm 30 \mu\text{g g}^{-1}$; muestra J, $840 \pm 50 \mu\text{g g}^{-1}$) y NP en una de ellas (muestra I, $55 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$).

A modo de ejemplo, en la *Figura 8.3* se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos.

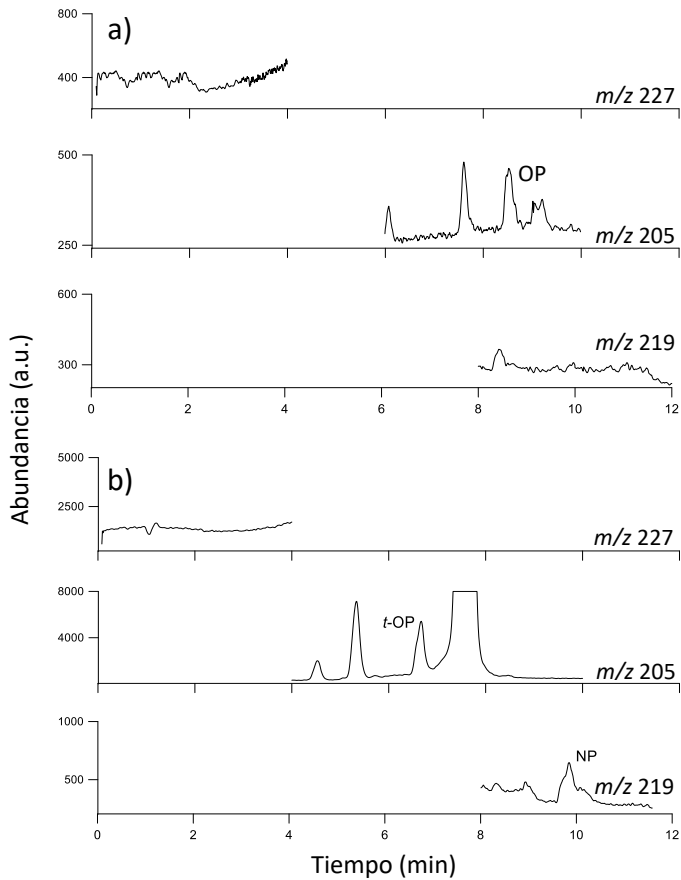


Figura 8.3. Cromatogramas obtenidos aplicando el método propuesto a las muestras: (a) muestra A (crema hidratante), (b) muestra I (materia prima).

CONCLUSIONES

Los compuestos estudiados se consideran tóxicos para la salud humana por su actividad como disruptores endocrinos. Por este motivo, BPA y NP están prohibidos de acuerdo al Reglamento Europeo sobre los productos cosméticos. Aunque t-OP y OP no están prohibidos, son igualmente tóxicos. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para la determinación simultánea de cuatro alquilfenoles (BPA, t-OP, OP y NP) en muestras cosméticas.
- El método se basa en la determinación directa de los analitos mediante LC-MS aplicando la calibración por adición de patrón para corregir el efecto matriz.
- El método propuesto se ha aplicado al análisis de productos cosméticos acabados, con matrices hidrofílicas y lipofílicas, y materias primas de etoxilatos de alquilfenol.
- El método propuesto es útil para el control de calidad de los productos cosméticos por su sencillez y buenas características analíticas.
- El método propuesto es inocuo para el operador y el medio ambiente, de acuerdo a los principios de la *Química Analítica Ecológica*, ya que no se utilizan disolventes orgánicos tóxicos durante la preparación de las muestras.

CAPÍTULO 9

DETERMINACIÓN DE NITROSAMINAS EN PRODUCTOS COSMÉTICOS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA EN FASE REVERSA ASISTIDA POR VÓRTICE Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *Determination of N-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with mass spectrometry*, **Journal of Separation Science** 41 (2018) 3143-3151; y presentado en forma de cartel en el *19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*, Santiago de Compostela (2017).

INTRODUCCIÓN

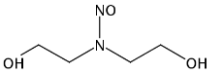

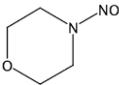
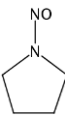
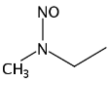
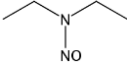
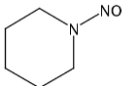
Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico que permita la determinación simultánea de siete nitrosaminas en productos cosméticos, empleando la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa asistida por vórtice (VA-RP-DLLME) seguida de LC-MS.

Compuestos estudiados

- N-nitrosodietanolamina (NDELA)
- N-nitrosodimetilamina (NDMA)
- N-nitrosoetilmetilamina (NMEA)
- N-nitrosodietilamina (NDEA)
- N-nitrosomorfolina (NMOR)
- N-nitrosopirrolidina (NPYR)
- N-nitrosopiperidina (NPIP)

Tabla 9.1. Información sobre los compuestos estudiados.

Analito	Estructura química	Número CAS	M_r (g mol^{-1})	pK_a^a	$\log K_{o/w}^a$
NDELA		1116-54-7	134.13	13.76	-1.33
NDMA		62-75-9	74.08	-3.63	-0.50
NMOR		59-89-2	116.12	-5.72	-0.59
NPYR		930-55-2	100.12	-3.14	-0.09
NMEA		10595-95-6	88.11	-3.39	0.01
NDEA		55-18-5	102.14	-3.14	0.52
NPIP		100-75-4	114.15	-3.18	0.44

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02* (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

En este capítulo se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea a nivel de trazas de siete nitrosaminas prohibidas en productos cosméticos. El método propuesto se basa en la VA-RP-DLLME, cuyo fundamento se ha descrito en el Capítulo 2, seguida de LC-MS. Se estudiaron las variables experimentales y se validó el método con las condiciones seleccionadas, obteniendo límites de detección entre 1.8 y 50 ng g⁻¹, factores de enriquecimiento entre 2.2 y 65, coeficientes de recuperación cuantitativos (80-113 %) y buena repetibilidad (RSD <9.8 %). Finalmente, se aplicó al análisis de cuatro muestras cosméticas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrometría de masas.
- Agitador de vórtice y centrifuga.

Reactivos

- NDELA (99.8 %) y mezcla de nitrosaminas EPA 8270/Appendix IX conteniendo los compuestos estudiados (2000 µg mL⁻¹ en metanol) como patrones.
- Sulfato de sodio anhidro como desecante.
- Etanol, hexano y agua desionizada como disolventes en la preparación de muestras y patrones.
- Agua grado-MS, metanol grado-MS y ácido fórmico como disolventes para la preparación de la fase móvil.

Muestras

Dos cremas hidratantes (muestras A, B) y dos geles de baño (muestras C, D).

Método propuesto

Preparación de patrones

Se preparó una disolución patrón en etanol conteniendo 25 µg mL⁻¹ de los analitos. A partir de ésta, se preparó una disolución patrón conteniendo 1 µg

mL^{-1} de los analitos en hexano. Finalmente, se prepararon disoluciones patrón de trabajo, entre 0.5 y 50 ng mL^{-1} , en hexano. Para la VA-RP-DLLME, 5 mL de cada una de las disoluciones patrón fueron transferidos respectivamente a tubos de punta cónica y se añadieron 75 μL de agua desionizada en cada uno de ellos. A continuación, se agitaron por vórtice durante 30 s y, una vez formada la microemulsión, se centrifugaron (6000 rpm, 5 min) para separar las fases. Finalmente, se recogieron las fases acuosas sedimentadas (ca. 50 μL) para el análisis cromatográfico.

Preparación de muestras

Las muestras se prepararon, por triplicado, pesando 0.1 g en un vial de vidrio conteniendo 0.2-0.5 g de sulfato de sodio anhidro y se mezcló hasta obtener un sólido homogéneo. A continuación, la mezcla se transfirió a un tubo de punta cónica y se añadieron 5 mL de hexano. Después, se dispersó mediante agitación por vórtice, se centrifugó (6000 rpm, 5 min) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Finalmente, se llevó a cabo la VA-RP-DLLME de la forma descrita. En la *Figura 9.1* se muestra un diagrama del procedimiento experimental.

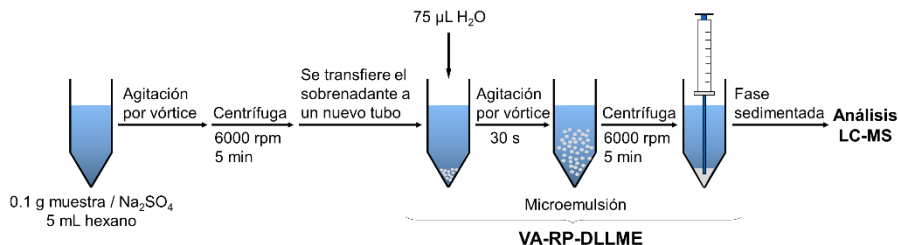


Figura 9.1. Esquema del procedimiento experimental propuesto.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: 20 μL
- Columna: Purospher® STAR RP-18e (125 mm, 4 mm d.i., 5 μm)
- Temperatura de la columna: 35 $^{\circ}\text{C}$
- Fase móvil:
 - Fase A: agua (ácido fórmico 0.1 % v/v)
 - Fase B: metanol (ácido fórmico 0.1 % v/v)
- Modo: gradiente (*Tabla 9.2*)
- Caudal: 0.5 mL min^{-1}

Tabla 9.2. Programa de elución en gradiente.

Tiempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0	95	5
0.5	95	5
3	65	35
10	10	90
12	10	90
12.1	95	5
15	95	5

La detección de los analitos por espectrometría de masas se llevó a cabo mediante ionización por electronebulización (ESI) en modo positivo y monitorización de iones seleccionados (SIM) con los siguientes parámetros: caudal de gas de secado, 10 L min⁻¹; temperatura de gas de secado, 280 °C; presión del nebulizador, 50 psi; voltaje del capilar, 4500 V; voltaje de fragmentación, 60 V; relación masa-carga (*m/z*), 75 para NDMA, 89 para NMEA, 101 para NPYR, 103 para NDEA, 115 para NPPI, 117 para NMOR y 135 para NDELA.

RESULTADOS

Estudio de variables en la espectrometría de masas

Se estudió la influencia de la polaridad de la ionización (modo positivo o modo negativo), el caudal del gas de secado (entre 1 y 13 L min⁻¹), la temperatura del gas de secado (entre 100 y 350 °C), la presión del nebulizador (entre 10 y 50 psi), el voltaje del capilar (entre 600 y 6000 V), el voltaje de fragmentación (entre 40 y 400 V) y la relación *m/z* para la monitorización de los iones. Se ensayaron diferentes valores para cada variable y se seleccionaron aquellos que proporcionaron la mayor señal analítica.

Estudio de las variables cromatográficas

Se estudió la influencia de la composición de la fase móvil y la temperatura de la columna.

Composición de la fase móvil

Como fase móvil se usó una mezcla de agua y metanol conteniendo ambos 0.1 % v/v de ácido fórmico. Se ensayaron diferentes programas de elución en gradiente, obteniéndose los mejores resultados con el programa indicado anteriormente.

Temperatura de la columna

Se ensayaron temperaturas entre 30 y 60 °C. No se observaron diferencias significativas, por lo que se seleccionaron 35 °C. Como se observa en la *Figura 9.2*, se obtuvo una buena separación cromatográfica de los analitos en menos de 10 min.

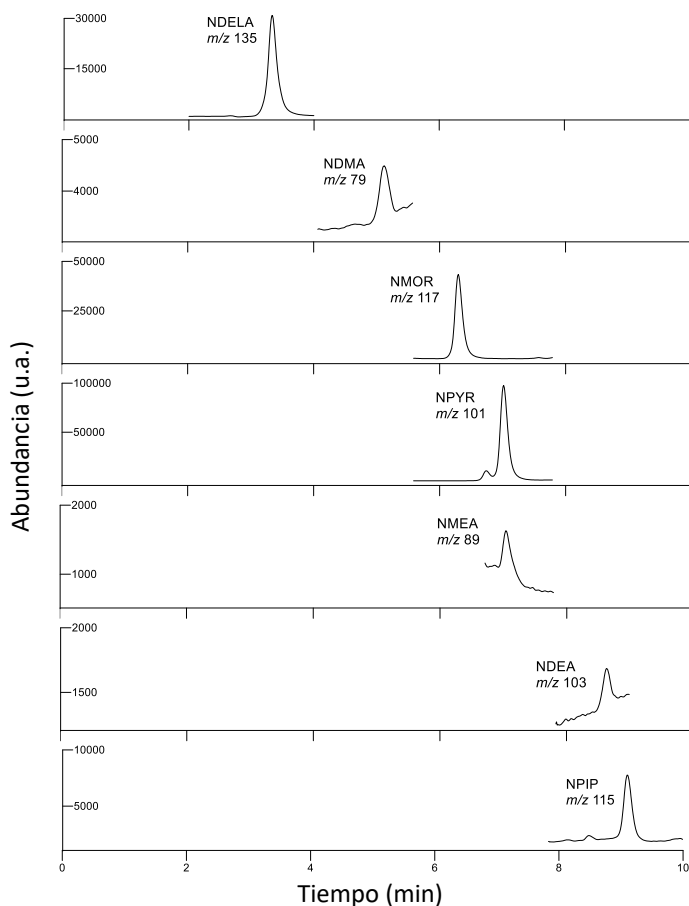


Figura 9.2. Cromatograma obtenido aplicando el método propuesto a una disolución patrón de los analitos (25 ng mL⁻¹).

Estudio de variables en la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa asistida por vórtice (VA-RP-DLLME)

Se estudió la influencia de la naturaleza del disolvente de soporte, el volumen del disolvente extractante y el tiempo de extracción analizando disoluciones patrón de los analitos (25 ng mL^{-1}). A diferencia de la RP-DLLME convencional, la propuesta presentada no requiere disolvente dispersante, ya que la microemulsión se forma mediante agitación por vórtice.

Naturaleza del disolvente de soporte

Se ensayaron tolueno y hexano como disolventes de soporte, al ser menos densos que el agua (extractante) y menos tóxicos que otros posibles disolventes, como cloroformo o diclorometano. Los resultados obtenidos mostraron que con tolueno solo se produjo la extracción de la NDELA, mientras que con hexano se obtuvieron resultados satisfactorios para todos los analitos estudiados, por lo que fue seleccionado.

Volumen de disolvente extractante

Se ensayaron diferentes volúmenes de agua desionizada como extractante, entre 50 y 175 μL . Como se observa en la *Figura 9.3*, en la mayoría de los casos se obtuvo una disminución progresiva de la señal analítica al aumentar el volumen debido al efecto de la dilución. Sin embargo, se seleccionó finalmente un volumen de 75 μL . Se descartó trabajar con un volumen de 50 μL porque, a pesar de presentar mayor sensibilidad, también presentó mayor irreproducibilidad debido a la dificultad en el manejo de la fase sedimentada.

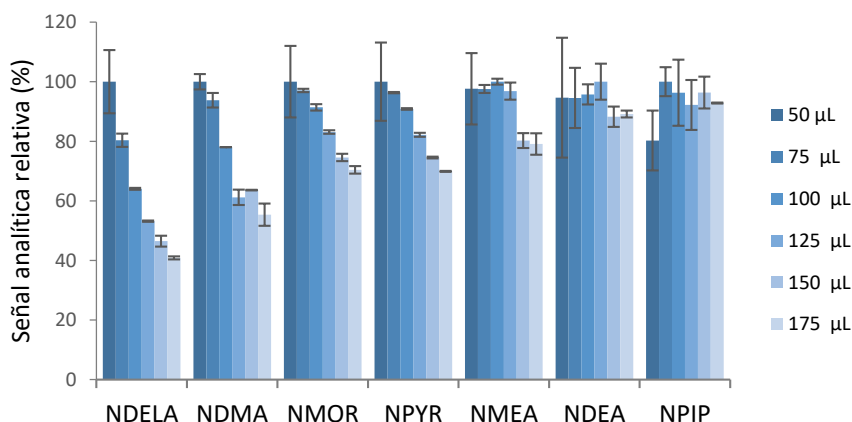


Figura 9.3. Estudio del volumen de disolvente extractante.

Tiempo de extracción

Se ensayaron diferentes tiempos de agitación por vórtice, entre 15 y 120 s, como tiempo de extracción. Como se observa en la *Figura 9.4*, fueron suficientes entre 30 y 45 s de agitación para obtener los mejores resultados, según el analito. Finalmente, se seleccionó un tiempo de extracción de 30 s.

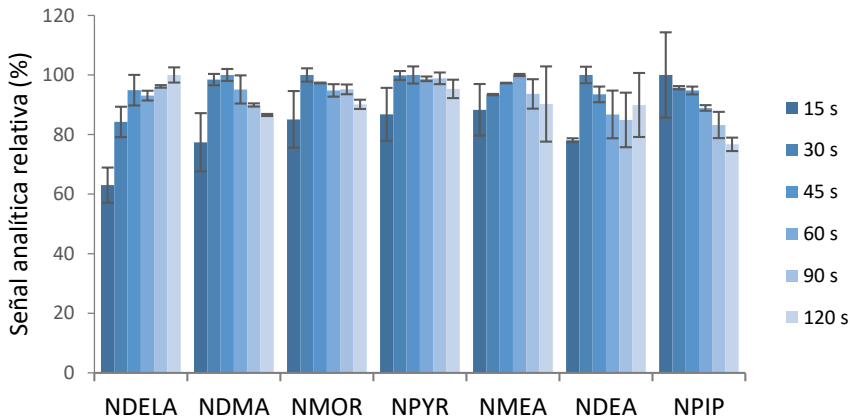


Figura 9.4. Estudio del tiempo de extracción.

Estudio del pretratamiento de la muestra

Se observó que una simple agitación no era suficiente para dispersar eficazmente la muestra cosmética en el disolvente orgánico de soporte, debido a que las muestras contienen agua. Además, de esta forma no se obtendrían resultados fiables, ya que el volumen del extracto obtenido no se correspondería con el volumen de agua empleado como extractante, sino que contendría también el agua procedente de la muestra. Por ello, se propuso el uso de una pequeña cantidad (ca. 0.2-0.5 g) de sulfato de sodio anhidro como desecante.

Parámetros analíticos del método propuesto

Linealidad

La linealidad estudiada alcanzó al menos 50 ng mL⁻¹ para todos los analitos, obteniéndose coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.9990$).

Límites de detección y cuantificación

Los valores obtenidos para los límites de detección ($3 S/N$) y límites de cuantificación ($10 S/N$), siendo S/N la relación señal-ruido, se muestran en la *Tabla 9.3*. Los límites de detección instrumentales estuvieron comprendidos entre 0.04 y 1.0 ng mL^{-1} , lo que corresponde con unos límites de detección del método entre 1.8 y 50 ng g^{-1} en muestra. Estos resultados satisfacen los límites contemplados por el CCSC.

Tabla 9.3. Límites de detección y cuantificación.

Analito	Límites instrumentales		Límites del método ^c	
	LOD ^a (ng mL^{-1})	LOQ ^b (ng mL^{-1})	LOD ^a (ng g^{-1})	LOQ ^b (ng g^{-1})
NDELA	0.04	0.12	1.8	6
NDMA	0.7	2	30	120
NMOR	0.06	0.2	3	10
NPYR	0.05	0.2	3	9
NMEA	0.7	2	40	120
NDEA	1	3	50	170
NPIP	0.2	0.8	10	40

^a LOD: límite de detección ($3 S/N$).

^b LOQ: límite de cuantificación ($10 S/N$).

^c Límites del método calculados para una masa de 0.1 g .

Factores de enriquecimiento

La *Tabla 9.4* contiene los valores obtenidos para los factores de enriquecimiento, definidos como $EF = C_{ext}/C_0$ donde C_{ext} es la concentración de analito en el extracto y C_0 es la concentración en la disolución inicial antes de la extracción, que estuvieron comprendidos entre 2.2 y 65 .

Rendimientos de extracción

Considerando los factores de enriquecimiento y teniendo en cuenta el procedimiento experimental ($EF_{m\acute{a}x} = 66.7$), los valores obtenidos para los rendimientos de extracción estuvieron comprendidos entre 3.3 y 97% (*Tabla 9.4*).

Tabla 9.4. Factores de enriquecimiento y rendimientos de extracción.

Analito	EF ^a	RE (%) ^b
NDELA	65 ± 2	97 ± 3
NDMA	30.7 ± 1.5	46 ± 2
NMOR	26.5 ± 1.4	40 ± 2
NPYR	26.5 ± 1.3	40 ± 2
NMEA	13.2 ± 0.8	19.8 ± 1.2
NDEA	2.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1
NPIP	2.6 ± 0.1	3.9 ± 0.1

^a EF: factor de enriquecimiento.^b RE: rendimiento de extracción.

Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada aplicando el procedimiento completo a diez réplicas de disoluciones patrón conteniendo los analitos a dos niveles de concentración (10 y 25 ng mL⁻¹) en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, que se muestran en la *Tabla 9.5*, indican que se alcanzó una buena precisión (RSD <9.8 %).

Tabla 9.5. Estudio de la repetibilidad.

Analito	Repetibilidad (RSD, %) ^a			
	Intra-día		Inter-día	
	10 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹
NDELA	2.1	1.9	8.9	4.4
NDMA	4.9	2.9	8.2	4.1
NMOR	3.8	2.3	9.5	4.2
NPYR	1.5	1.9	5.4	5.0
NMEA	5.4	2.5	9.2	5.6
NDEA	5.2	4.8	9.8	3.2
NPIP	4.2	2.3	5.1	4.5

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), n = 10.

Análisis de muestras

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras cosméticas se muestran en la *Tabla 9.6*. Se encontraron cantidades significativas de varias nitrosaminas en algunas de las muestras analizadas.

Tabla 9.6. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras cosméticas.

Analito	Concentración (ng g ⁻¹)			
	A ^a	B ^a	C ^a	D ^a
NDELA	66 ± 3	n.d.	180 ± 30	30 ± 3
NDMA	600 ± 80	1100 ± 110	620 ± 70	300 ± 30
NMOR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NPYR	n.d.	n.d.	40 ± 2	n.d.
NMEA	n.d.	n.d.	1800 ± 170	n.d.
NDEA	n.d.	n.d.	2700 ± 300	n.d.
NPIP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a A, B: cremas hidratantes; C, D: geles de baño.
n.d.: no detectado.

Estudio del efecto matriz

Para validar la exactitud del método propuesto se fortificaron disoluciones de las muestras a dos niveles de concentración (10 y 25 ng mL⁻¹) y se analizaron. Los coeficientes de recuperación obtenidos (Tabla 9.7), estuvieron comprendidos entre 80 y 113 %, mostrando que no existió un efecto matriz significativo.

Tabla 9.7. Estudio del efecto matriz.

Analito	Concentración fortificada (ng mL ⁻¹)	Coeficiente de recuperación (%)			
		A ^a	B ^a	C ^a	D ^a
NDELA	10	88 ± 9	95 ± 8	95 ± 1	100 ± 9
	25	92 ± 5	92 ± 2	100 ± 6	106 ± 2
NDMA	10	85 ± 6	106 ± 4	99 ± 2	102 ± 8
	25	106 ± 3	98 ± 9	83 ± 7	95 ± 6
NMOR	10	84 ± 6	108 ± 8	102 ± 8	96 ± 6
	25	96 ± 1	90 ± 2	97 ± 6	100 ± 1
NPYR	10	80 ± 3	84 ± 6	91 ± 6	89 ± 6
	25	86 ± 2	83 ± 1	86 ± 2	94 ± 6
NMEA	10	89 ± 4	90 ± 5	92 ± 4	98 ± 3
	25	94 ± 3	95 ± 6	98 ± 7	102 ± 5
NDEA	10	99 ± 8	107 ± 3	81 ± 2	105 ± 7
	25	101 ± 1	100 ± 1	113 ± 3	110 ± 2
NPIP	10	91 ± 5	98 ± 3	102 ± 3	103 ± 1
	25	91 ± 1	100 ± 3	99 ± 1	98 ± 9

^a A, B: cremas hidratantes; C, D: geles de baño.

CONCLUSIONES

Las nitrosaminas son una familia de compuestos altamente cancerígenos, por lo que su presencia se encuentra prohibida en los productos cosméticos desde 1992. Sin embargo, aún pueden encontrarse en los cosméticos a nivel de trazas ya que se forman con relativa facilidad por reacción entre aminas y compuestos nitrosantes. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para la determinación simultánea a nivel de trazas de siete nitrosaminas prohibidas en productos cosméticos.
- El método propuesto se basa en la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa asistida por vórtice (VA-RP-DLLME) seguida de cromatografía de LC-MS.
- Con la técnica de microextracción propuesta no se requiere disolvente dispersante para formar la microemulsión, sino que se forma mediante agitación por vórtice.
- El método propuesto se ha aplicado al análisis de muestras cosméticas hidrofílicas y lipofílicas, satisfaciendo los límites contemplados por el CCSC.
- El método propuesto es útil para el control de calidad de los productos cosméticos, asegurando la seguridad de los consumidores y el cumplimiento de la legislación vigente.

CAPÍTULO 10

DETERMINACIÓN DE NITROSAMINAS EN PRODUCTOS COSMÉTICOS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA POR SORCIÓN SOBRE BARRA AGITADORA MEDIADA POR UN COMPOSITE MAGNÉTICO Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo *Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-metal organic framework composite: determination of N-nitrosamines in cosmetic products*, **Journal of Chromatography A** 1604 (2019) 460465; y presentado en forma de cartel en la *XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica*, Valladolid (2019).

INTRODUCCIÓN

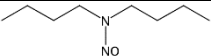
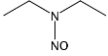
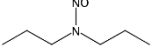
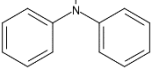




Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido desarrollar y validar un método analítico para la determinación simultánea de ocho nitrosaminas en productos cosméticos, empleando la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME) mediada por un composite magnético seguida de LC-MS/MS.

Compuestos estudiados

- N-nitrosodibutilamina (NDBA)
- N-nitrosodietilamina (NDEA)
- N-nitrosodipropilamina (NDPA)
- N-nitrosodifenilamina (NDPhA)
- N-nitrosoetilmetilamina (NMEA)
- N-nitrosomorfolina (NMOR)
- N-nitrosopiperidina (NPIP)
- N-nitrosopirrolidina (NPYR)

Tabla 10.1. Información sobre los compuestos estudiados.

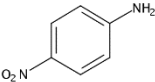
Analito	Estructura química	Número CAS	M_r (g mol ⁻¹)	pK _a ^a	log K _{o/w} ^a
NDBA		924-16-3	158.24	-3.14	2.56
NDEA		55-18-5	102.14	-3.14	0.52
NDPA		621-64-7	130.19	-3.18	1.54
NDPhA		86-30-6	198.22	-5.83	3.13
NMEA		10595-95-6	88.11	-3.39	0.01
NMOR		59-89-2	116.12	-5.72	-0.59
NPIP		100-75-4	114.15	-3.18	0.44
NPYR		930-55-2	100.12	-3.14	-0.09

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs)* V11.02 (©1994-2019 ACD/Labs).

Patrón interno

- 4-Nitroanilina (4NA)

Tabla 10.2. Información sobre el patrón interno.

Estructura química	Número CAS	M_r (g mol^{-1})	pK_a^a	$\log K_{o/w}^a$
	100-01-6	138.12	1.01	1.19

^a Calculado mediante el software *Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs) V11.02 (©1994-2019 ACD/Labs).

Resumen

En este capítulo se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea a nivel de trazas de ocho nitrosaminas prohibidas en productos cosméticos. El método propuesto se basa en SBS-DME, cuyo fundamento se ha descrito en el [Capítulo 2](#), mediada por un composite de nanopartículas magnéticas-red organometálica (MOF), $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$, seguido de LC-MS/MS. Se estudiaron las variables experimentales y se validó el método con las condiciones seleccionadas, obteniendo límites de detección entre 3 y 13 ng g^{-1} , factores de enriquecimiento entre 4 y 62, y buena repetibilidad ($\text{RSD} < 17.0\%$). Finalmente, se aplicó al análisis de tres muestras cosméticas con coeficientes de recuperación cuantitativos (96-109 %) empleando la calibración por adición de patrón para corregir el efecto matriz. Este trabajo expande la aplicabilidad analítica de la SBS-DME a nuevos tipos de matrices y al uso de nuevos materiales.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.
- Agitadores magnéticos y barras agitadoras de neodimio (12 x 3 mm).
- Evaporador por corriente de nitrógeno.
- Agitador de vórtice, centrífuga, baño de ultrasonidos y pH-metro.

Reactivos

- Mezcla de nitrosaminas EPA 8270/Appendix IX conteniendo los compuestos estudiados ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol) como patrón.
- 4-Nitroanilina como patrón interno.
- Cloruro de cobalto(II) hexahidrato ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloruro de hierro(III) hexahidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sodio, ácido tereftálico y dimetilformamida (DMF) como reactivos para la síntesis del composite magnético.
- Acetona, hexano y agua desionizada como disolventes y cloruro de sodio para ajustar la fuerza iónica en la preparación de muestras y patrones.
- Agua grado-MS, metanol grado-MS y ácido fórmico como disolventes en la preparación de la fase móvil.

Muestras

Un gel de baño (muestra A) y dos cremas hidratantes (muestras B, C).

Síntesis del composite magnético

La síntesis del composite $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$ consistió en dos etapas: la síntesis de las nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto por coprecipitación y la síntesis solvotermal del MOF en presencia de las nanopartículas magnéticas para la obtención *in situ* del composite.

Síntesis de las nanopartículas magnéticas

Se mezclaron 100 mL de disolución acuosa 0.4 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 100 mL de disolución acuosa 0.2 M de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A continuación, se añadieron lentamente 100 mL de disolución acuosa NaOH 3 M con agitación continua a 80°C durante 1 h. Después, el precipitado se dejó enfriar a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante mediante decantación magnética. Finalmente, el producto de color negro se lavó varias veces con agua y etanol, se secó a 100°C y se pulverizó.

Síntesis del composite

Se dispersaron 50 mg de las nanopartículas magnéticas sintetizadas en 25 mL de una disolución 0.125 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en DMF, mediante ultrasonidos durante 10 min. A continuación, la mezcla se dispersó en 50 mL de una

disolución 0.062 M de ácido tereftálico en DMF, mediante ultrasonidos durante otros 10 min. Posteriormente, la mezcla se transfirió a un reactor de teflón y se calentó a 110 °C durante 20 horas en un horno. Finalmente, el producto de color marrón se separó de la mezcla por decantación magnética, se lavó varias veces con etanol caliente, se secó a 70 °C y se pulverizó.

Método propuesto

Preparación de muestras y patrones

Se preparó una disolución patrón de 10 µg mL⁻¹ de los analitos y una disolución de 10 µg mL⁻¹ de 4-nitroanilina como patrón interno en agua desionizada.

A partir de éstas se prepararon las disoluciones del calibrado por adición de patrón: se pesaron 0.5 g de muestra en una serie de matraces aforados de 25 mL y se fortificaron con diferentes alícuotas de la disolución patrón, alcanzando concentraciones fortificadas entre 0 y 100 ng mL⁻¹. Se añadieron 10 ng mL⁻¹ de patrón interno a todas estas disoluciones. A continuación, se enrasaron con una disolución acuosa de NaCl (1 % m/v) y se homogeneizaron mediante agitación por vórtice. Después, cada una de las mezclas se transfirió a un tubo de punta cónica y se añadió 1 mL de hexano en cada uno de ellos. A continuación, se agitaron por vórtice durante varios segundos y se centrifugaron (6000 rpm, 15 min) para eliminar la fracción lipofílica insoluble de la matriz cosmética. Finalmente, se recogieron las fases acuosas (25 mL), se filtraron y se transfirieron a viales para la SBS DME.

Procedimiento de extracción

Para acondicionar y recubrir las barras agitadoras, se dispersaron 30 mg del composite, CoFe₂O₄/MIL-101(Fe), en un vial con 10 mL de agua desionizada. Se introdujo una barra agitadora de neodimio y se agitó a alta velocidad durante 5 min para solvatar el composite. Al detener la agitación, el material magnético fue atraído por la barra agitadora.

Para llevar a cabo la extracción en cada una de las disoluciones, se introdujo la barra agitadora recubierta con el material magnético en 25 mL de disolución y se dispersó a alta velocidad durante 30 min. Al finalizar la agitación, la barra agitadora recubierta se retiró de la disolución, se enjuagó suavemente con agua desionizada para eliminar restos de la muestra y se

transfirió a un vial conteniendo 1 mL de acetona para la desorción de los analitos mediante agitación durante 5 min. Finalmente, el extracto se filtró, se evaporó mediante corriente de nitrógeno y se reconstituyó con 50 μ L de agua desionizada.

En la *Figura 10.1* se muestra un diagrama del procedimiento experimental propuesto.

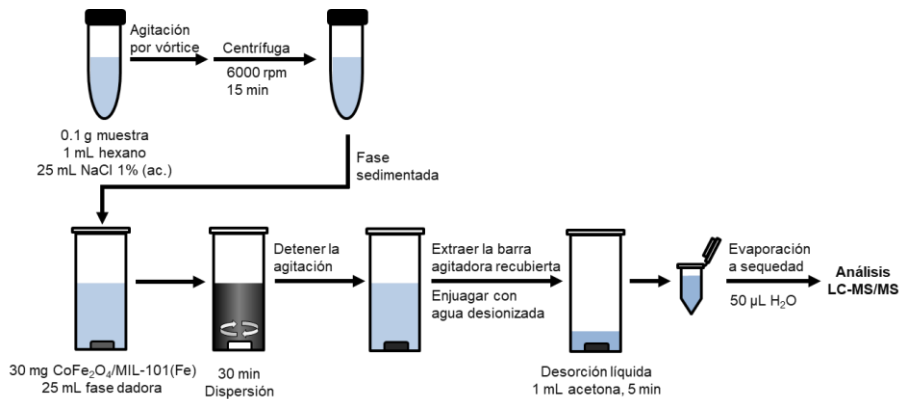


Figura 10.1. Esquema del procedimiento experimental propuesto.

Análisis cromatográfico

- Volumen de inyección: 10 μ L
- Columna: Zorbax SB-C18 (50 mm, 2.1 mm d.i., 1.8 μ m)
- Temperatura de la columna: 35 °C
- Fase móvil:
 - Fase A: agua (ácido fórmico 0.1 % v/v)
 - Fase B: metanol (ácido fórmico 0.1 % v/v)
- Modo: gradiente (*Tabla 10.3*)
- Caudal: 0.3 mL min⁻¹

Tabla 10.3. Programa de elución en gradiente.

Tiempo (min)	Fase A (% v/v)	Fase B (% v/v)
0	90	10
0.1	90	10
2	40	60
4	10	90
6	10	90
6.1	90	10
8	90	10

La ionización de los analitos en el sistema de espectrometría de masas se llevó a cabo mediante electronebulización (ESI) en modo positivo con los siguientes parámetros: caudal de gas de secado, 10 L min⁻¹; temperatura de gas de secado, 250 °C; presión del nebulizador, 50 psi; voltaje del capilar, 3500 V. La detección se llevó a cabo por monitorización de reacción múltiple (MRM, del inglés *multiple reaction monitoring*) con los parámetros mostrados en la *Tabla 10.4*.

Tabla 10.4. Parámetros en la adquisición por MRM.

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)
NDBA	159	103	110	8
	159	57*	110	10
NDEA	103	75*	80	8
	103	47	80	14
NDPA	131	89*	90	5
	131	43	90	11
NDPhA	199	169*	85	8
	199	66	90	27
NMEA	89	61	75	7
	89	43*	75	9
NMOR	117	87	105	9
	117	73*	100	11
NPIP	115	69	105	14
	115	41*	90	24
NPYR	101	55*	110	15
	101	41	110	28
4NA	139	122*	100	10
	139	92	100	20

* Transición de cuantificación.

RESULTADOS

Caracterización del composite

Se estudiaron algunas propiedades del composite sintetizado, $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$, como la magnetización, el tamaño de partícula, el potencial zeta, la morfología, el área superficial específica, el tamaño de poro y la eficiencia en la extracción. Además, se obtuvo su patrón de difracción de rayos X (XRD, del inglés *X-ray powder diffraction*), su espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS, del inglés *energy dispersive X-ray spectroscopy*) y su análisis termogravimétrico.

Magnetización

En la *Figura 10.2* se muestra la curva de magnetización obtenida. Como puede observarse, la saturación magnética fue de 11.9 emu g^{-1} . Se obtuvo un magnetismo residual de 7.2 emu g^{-1} y una fuerza coercitiva de 4770 Oe .

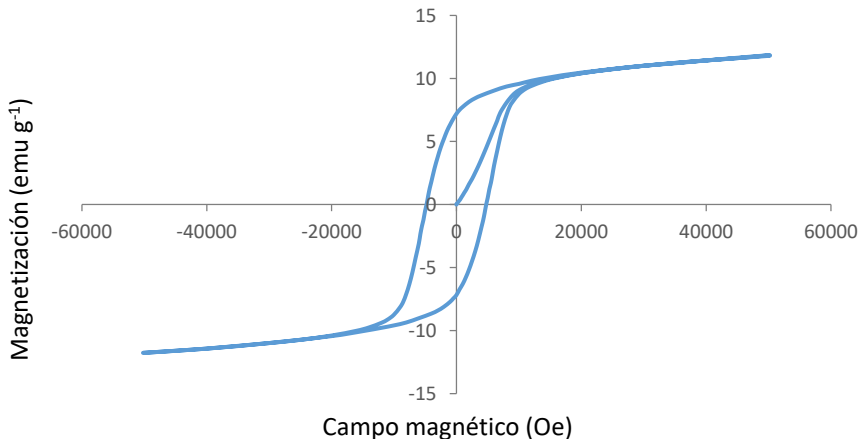


Figura 10.2. Curva de magnetización de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$.

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *dynamic light scattering*). En la *Figura 10.3* se muestra la curva de distribución del tamaño de partícula en número de una suspensión (10 mg mL^{-1}) del material. El tamaño de partícula más frecuente fue de $0.48 \mu\text{m}$.

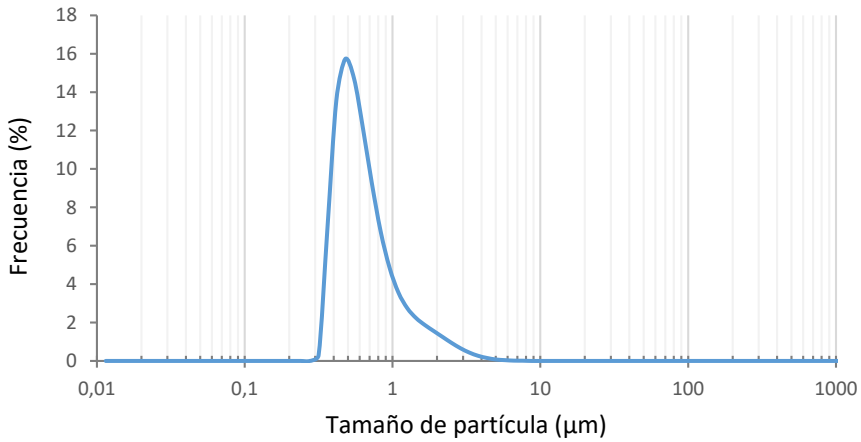


Figura 10.3. Distribución del tamaño de partícula en número de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$.

Potencial zeta

El potencial zeta es un indicador de la estabilidad de una dispersión y depende de la química superficial del material. Uno de los parámetros más importantes que afectan al potencial zeta es el pH y, por tanto, se estudió la influencia del pH sobre el potencial zeta del composite sintetizado. En la *Figura 10.4* se muestra la curva de potencial zeta frente a pH de una suspensión (10 mg mL^{-1}) del material a diferentes valores de pH, entre 2 y 12. Como puede observarse, el potencial zeta del composite no se vio significativamente afectado en el rango de pH 2-9, mostrando su estabilidad.

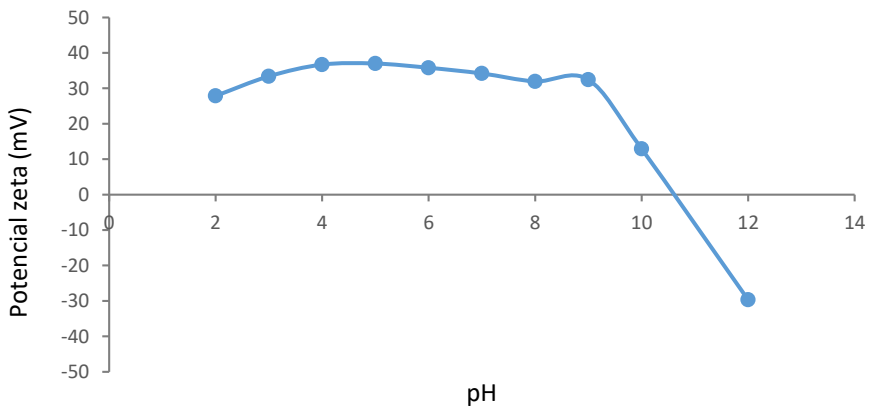


Figura 10.4. Curva de potencial zeta frente a pH de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$.

Morfología

La morfología del composite se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *scanning electron microscopy*) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*). En la *Figura 10.5* se muestran algunas micrografías representativas. Como puede observarse, el MOF presentó una morfología octaédrica mientras que las nanopartículas magnéticas estuvieron embebidas en su estructura y decorando su superficie. Además, el tamaño de partícula observado en las micrografías estuvo de acuerdo con el obtenido a partir de la distribución del tamaño de partícula.

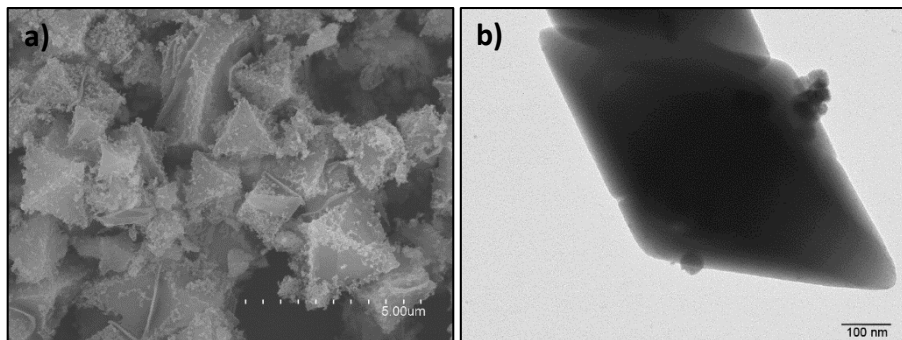


Figura 10.5. Micrografías SEM (a) y TEM (b) de $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$.

Área superficial y porosidad

Se determinó el área superficial específica y la porosidad del composite para demostrar su capacidad de adsorción. En la *Figura 10.6* se muestran la isotermas de absorción-desorción de N_2 obtenidas, que pueden considerarse esencialmente de tipo-II. El tamaño de poro promedio fue de 10.6 nm, mostrando que se trata de un material mesoporoso. Sin embargo, la histéresis observada en las isotermas puede deberse a la presencia de microporos (<2 nm). El área superficial específica, estimada mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET), fue $230 \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$.

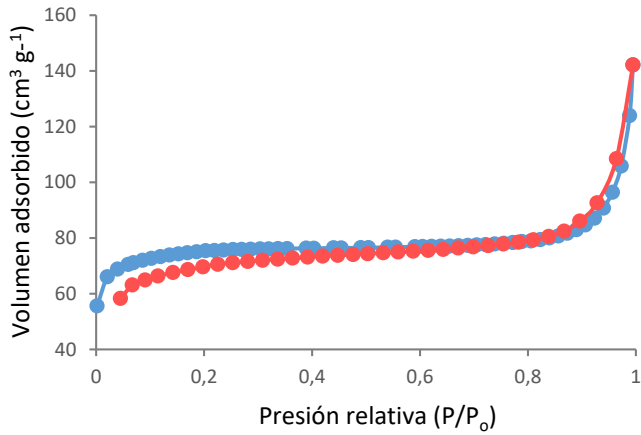


Figura 10.6. Isothermas de adsorción (línea azul)-desorción (línea roja) de N_2 de $CoFe_2O_4/MIL-101(Fe)$.

Microanálisis EDS

En la *Figura 10.7* se muestran los espectros EDS de $CoFe_2O_4$, MIL-101(Fe) y $CoFe_2O_4/MIL-101(Fe)$, observándose una buena coincidencia entre los materiales involucrados. En el MOF y en el composite se observa la señal C K_{α} (0.28 keV), que está ausente en las MNPs. Por otro lado, la señal Co K_{α} (6.93 keV) sólo aparece en los espectros del composite y las MNPs.

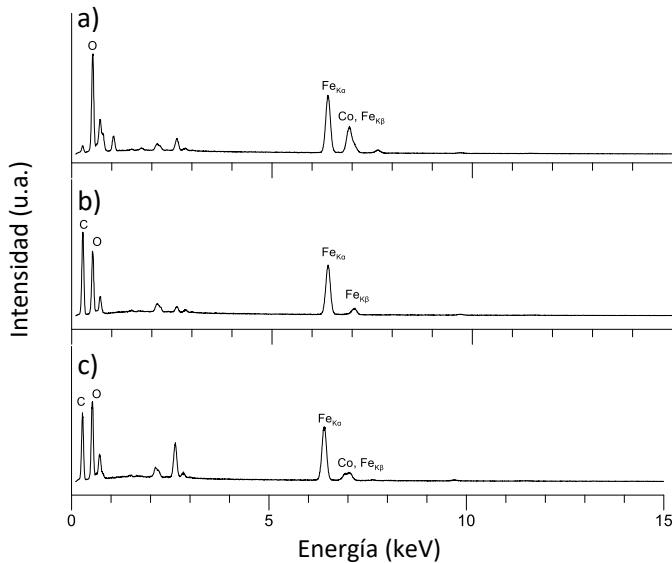


Figura 10.7. Espectros EDS de: (a) $CoFe_2O_4$, (b) MIL-101(Fe), (c) $CoFe_2O_4/MIL-101(Fe)$.

Difracción de rayos X

En la *Figura 10.8* se muestran los patrones XRD de CoFe_2O_4 , MIL-101(Fe) y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101(Fe)}$. Como puede observarse, se obtuvo una buena coincidencia entre los materiales involucrados, demostrando que la estructura del MOF no se modificó durante el proceso de síntesis y mostrando la presencia de las MNPs en el composite.

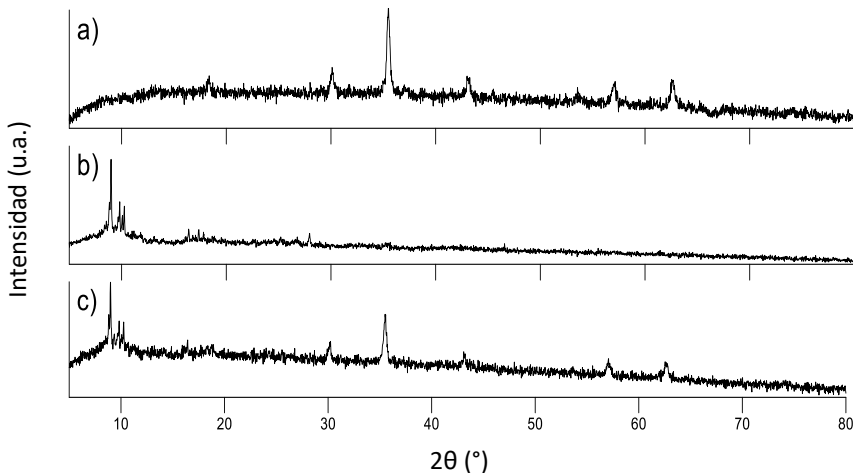


Figura 10.8. Patrones XRD de: (a) CoFe_2O_4 , (b) MIL-101(Fe), (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101(Fe)}$.

Análisis termogravimétrico

En la *Figura 10.9* se muestran las curvas termogravimétricas obtenidas para MIL-101(Fe) y $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101(Fe)}$ bajo atmósfera de N_2 . En ambos casos, la descomposición térmica consta fundamentalmente de cuatro etapas. En la primera etapa, se observa una pérdida de masa entre 50 y 150 °C debida a la eliminación de la humedad contenida en la superficie interna del material y a posibles restos de los disolventes empleados en la síntesis. A continuación, se observa una pérdida de masa entre 150 y 280 °C correspondiente a la eliminación de moléculas de agua estructurales en la red de MIL-101(Fe). Entre 300 y 470 °C se observa una importante pérdida de masa debida a la eliminación de grupos cloruro, hidroxilo y carboxilo. Finalmente, entre 470 y 700 °C se observa la descomposición de la materia orgánica restante, permaneciendo el residuo mineral formado por CoFe_2O_4 y hierro(III), probablemente en forma de Fe_2O_3 .

Resumen de los resultados experimentales

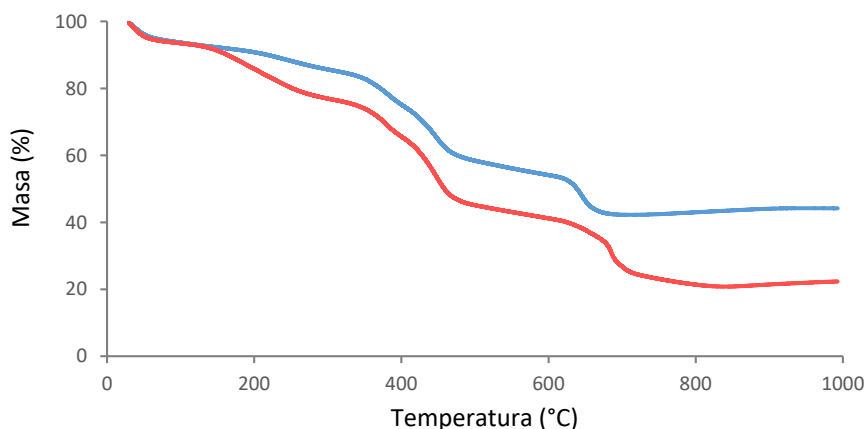


Figura 10.9. Curva termogravimétrica de: CoFe₂O₄/MIL-101(Fe) (línea azul), MIL-101(Fe) (línea roja).

Estudio de variables en la espectrometría de masas

Se estudió la influencia de la polaridad de la ionización (modo positivo o modo negativo), el caudal del gas de secado (entre 1 y 13 L min⁻¹), la temperatura del gas de secado (entre 100 y 350 °C), la presión del nebulizador (entre 10 y 50 psi), el voltaje del capilar (entre 600 y 6000 V), el voltaje de fragmentación (entre 40 y 400 V), la energía de colisión (entre 5 y 50 V) y la relación m/z para los iones precursores e iones producto. Se ensayaron diferentes valores para cada variable y se seleccionaron aquellos que proporcionaron la mayor señal analítica.

Estudio de las variables cromatográficas

Se estudió la influencia de la composición de la fase móvil y la temperatura de la columna.

Composición de la fase móvil

Como fase móvil se usó una mezcla de agua y metanol conteniendo ambos un 0.1 % v/v de ácido fórmico. Se ensayaron diferentes programas de elución en gradiente, obteniéndose los mejores resultados con el programa indicado anteriormente.

Temperatura de la columna

Se ensayaron temperaturas entre 30 y 60 °C. No se observaron diferencias significativas, por lo que se seleccionó una temperatura de 35 °C.

Estudio de variables en la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME)

Se estudió la influencia de la cantidad de composite, el tiempo de extracción, el pH y la fuerza iónica de la fase dadora, la naturaleza del disolvente de desorción y el tiempo de desorción. Para llevar a cabo estos estudios se analizaron disoluciones patrón conteniendo los analitos (100 ng mL⁻¹).

Cantidad de composite

La transferencia de los analitos desde la fase dadora a la fase aceptora (composite) depende de la relación entre la superficie del material y el volumen de la disolución. Se ensayaron cantidades de composite entre 10 y 40 mg, mientras que el volumen de la fase dadora se mantuvo en 25 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 10.10*. Como puede observarse, la señal analítica aumentó al aumentar la cantidad de material hasta 30 mg, mientras que cantidades superiores no proporcionaron una mejora significativa. En base a esta observación, se seleccionaron 30 mg de composite.

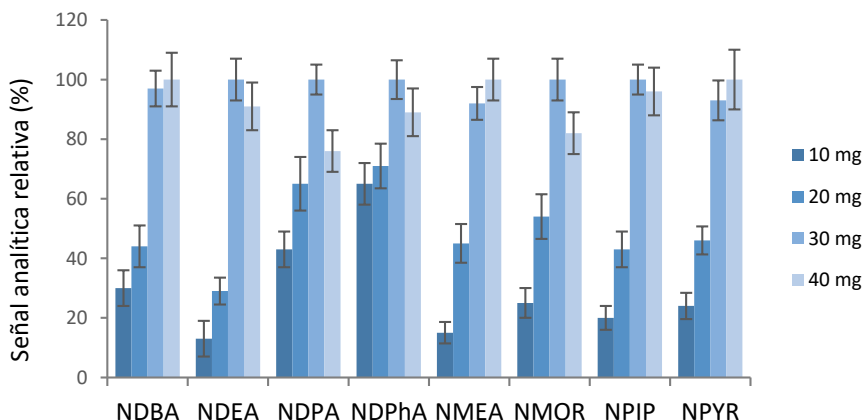


Figura 10.10. Estudio de la cantidad de composite.

Tiempo de extracción

Se estudió la influencia del tiempo de extracción entre 10 y 60 min. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 10.11*. Como puede observarse, la extracción se completó en 30 min, mientras que tiempos mayores no proporcionaron una mejora significativa. Por tanto, se seleccionó un tiempo de extracción de 30 min.

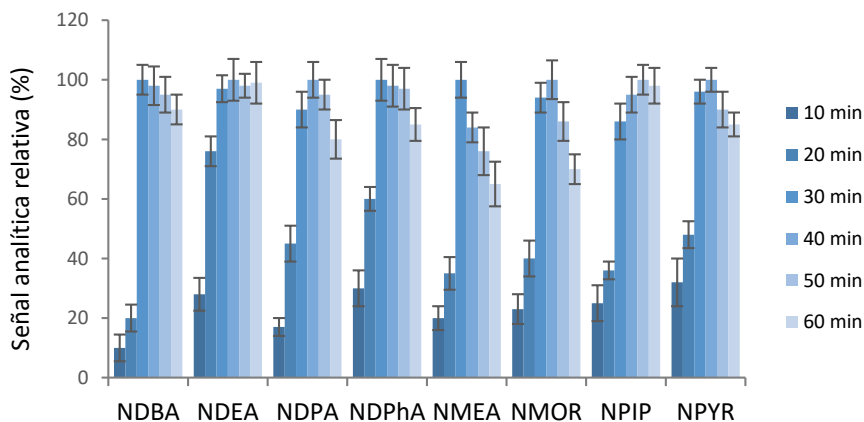


Figura 10.11. Estudio del tiempo de extracción.

pH de la fase dadora

Se estudió la influencia del pH de la fase dadora en el intervalo 2-8. No se observaron diferencias significativas, por lo que no se ajustó el pH en posteriores experimentos. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los esperados en base al estudio del potencial zeta frente al pH, que reveló que los cambios de pH en el intervalo estudiado no afectan a la química superficial del composite. Además, las nitrosaminas objeto de estudio tampoco están influenciadas por los cambios de pH en la disolución acuosa, de acuerdo a sus valores de pK_a (ver *Tabla 10.1*).

Fuerza iónica de la fase dadora

Se estudió la influencia de la fuerza iónica en el proceso de extracción añadiendo diferentes cantidades de NaCl (0-10 % m/v). Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 10.12*. Como puede observarse, los mejores resultados se obtuvieron con un 1 % de NaCl debido al efecto salino ("salting out"), que promueve la extracción de compuestos orgánicos desde

disoluciones acuosas. Contenidos superiores de NaCl no proporcionaron una mejora significativa, probablemente por aumentar la viscosidad de la fase dadora y dificultar la correcta dispersión del composite.

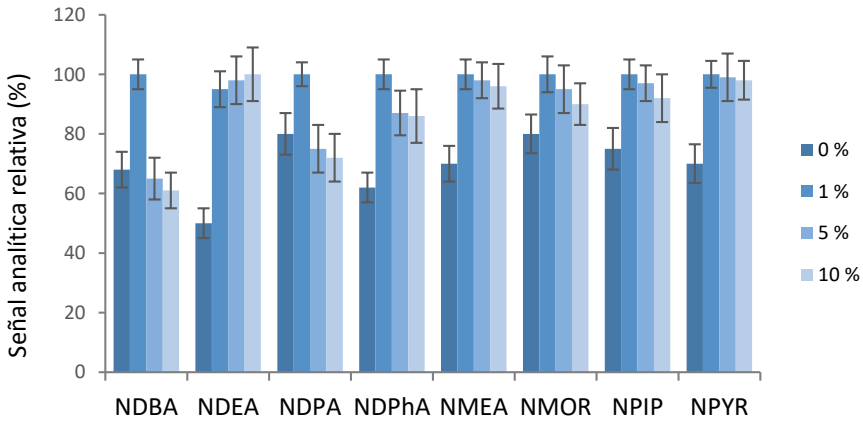


Figura 10.12. Estudio de la fuerza iónica de la fase dadora.

Naturaleza del disolvente de desorción

Se ensayaron etanol, metanol y acetona. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10.13. Como puede observarse, los mejores resultados se obtuvieron al emplear acetona, ya que permitió la evaporación rápida de los extractos, reduciendo las pérdidas de analito por volatilización.

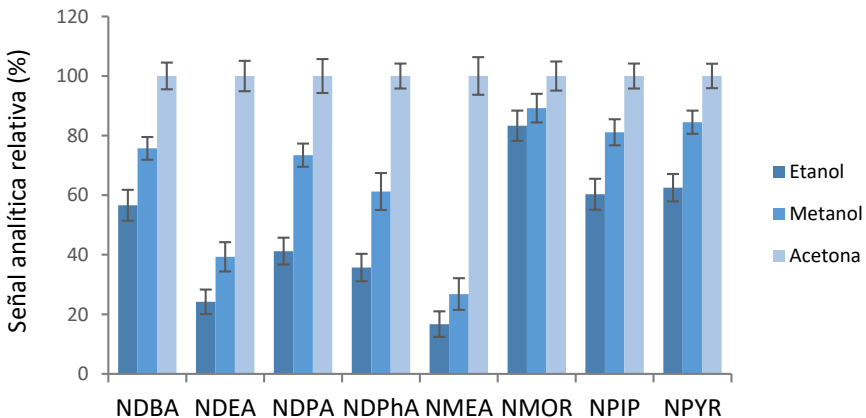


Figura 10.13. Estudio de la naturaleza del disolvente de desorción.

Tiempo de desorción

Se estudió la influencia del tiempo de desorción entre 1 y 10 min. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 10.14*. Como puede observarse, la desorción de los analitos se completó en 5 min.

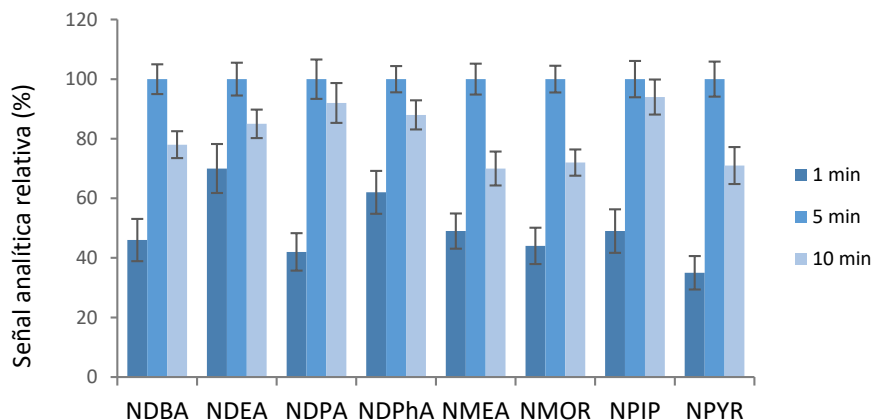


Figura 10.14. Estudio del tiempo de desorción.

Estudio de la eficiencia de extracción

Se comprobó la eficiencia de extracción (capacidad para extraer los analitos de la fase dadora) de las MNPs, el MOF y el composite, comparando la señal analítica de una disolución patrón conteniendo los analitos (100 ng mL^{-1}) antes y después de la extracción. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 10.15*. Como puede observarse, las MNPs de CoFe_2O_4 apenas presentan capacidad para extraer los analitos en comparación con el MOF MIL-101(Fe). Finalmente, el composite $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101(Fe)}$ mantiene la capacidad extractante del MOF, al mismo tiempo que las nanopartículas le confieren el magnetismo necesario para facilitar su manipulación.

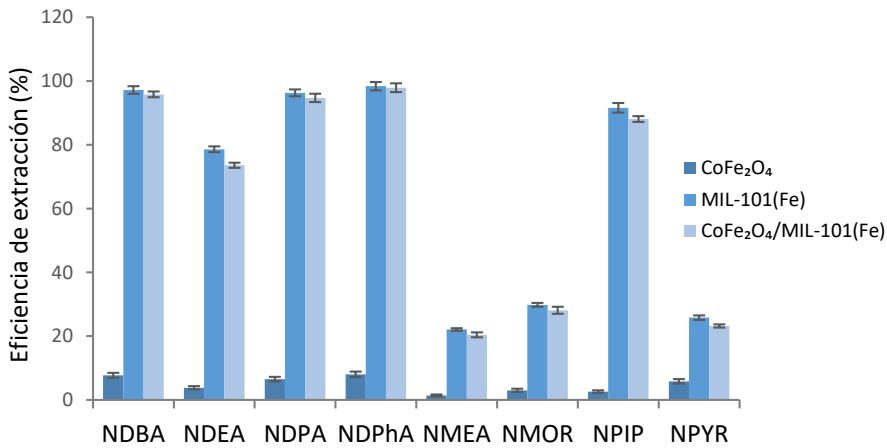


Figura 10.15. Estudio de la eficiencia de extracción.

Estudio de la eficiencia de desorción

Se comprobó la eficiencia de desorción (cantidad de analito recuperado durante la desorción) en el procedimiento propuesto mediante el análisis de una disolución patrón conteniendo los analitos (100 ng mL⁻¹) aplicando dos ciclos consecutivos de desorción. Se comparó la señal analítica de los extractos obtenidos y se calculó la eficiencia de la primera desorción. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 10.5*. Como puede observarse, la desorción de los analitos se produce de manera cuantitativa (84 - 98 %) en el primer ciclo de desorción.

Tabla 10.5. Estudio de la eficiencia de desorción.

Análito	Eficiencia de desorción (%)
NDBA	95 ± 2
NDEA	89 ± 4
NDPA	91 ± 5
NDPhA	98 ± 1
NMEA	87 ± 4
NMOR	84 ± 5
NPIP	85 ± 5
NPYR	86 ± 3

Estudio de la repetibilidad en la síntesis del composite

La *Figura 10.16* contiene los resultados obtenidos en el estudio de la repetibilidad en la síntesis del composite, que se evaluó en términos de eficiencia de extracción para cinco lotes del composite. Como puede observarse, se obtuvo una buena repetibilidad (RSD <10.8 %).

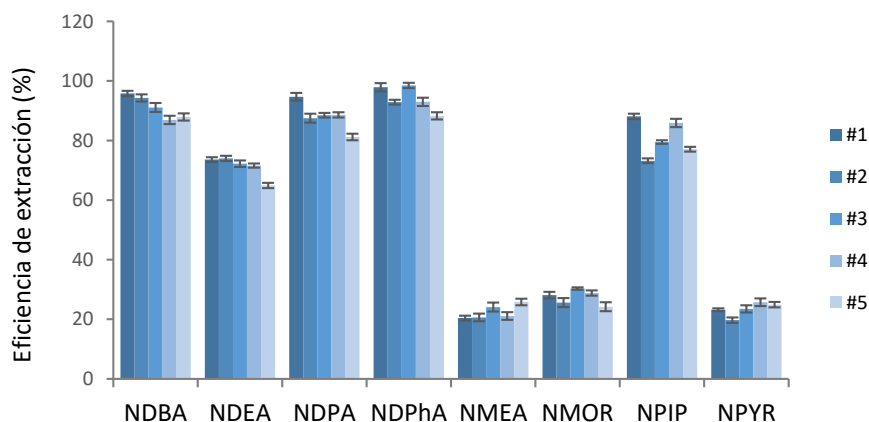


Figura 10.16. Estudio de la repetibilidad en la síntesis del composite (# indica los diferentes lotes).

Estudio del pretratamiento de la muestra

Se observó que dispersar una muestra cosmética en agua desionizada no resultó adecuado para llevar a cabo la SBSME, ya que la presencia de compuestos lipofílicos insolubles evitó la correcta dispersión del composite en la fase dadora. Por este motivo, se adoptó una etapa de limpieza previa a la extracción. En este sentido, la adición de un pequeño volumen de hexano (1 mL) en la dispersión de la muestra facilitó la eliminación de los compuestos lipofílicos insolubles. Además, la adición de NaCl (a partir del estudio de la fuerza iónica) ayudó a reducir la formación de emulsiones en el proceso.

Se evaluaron las pérdidas de analito en el pretratamiento de la muestra debido al uso de hexano. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 10.6*. Como puede observarse, se produjeron pérdidas significativas de las nitrosaminas menos polares (NDBA, NDPhA), mientras que el resto no se vieron afectadas significativamente. En cualquier caso, el pretratamiento fue

necesario para que SBS/DME se pueda llevar a cabo correctamente, por lo que debería aplicarse tanto a muestras como a patrones.

Tabla 10.6. Estudio del pretratamiento de la muestra.

Analito	Pérdidas de analito (%)
NDBA	70 ± 1
NDEA	4.3 ± 0.5
NDPA	7.1 ± 0.9
NDPhA	86 ± 1
NMEA	2.9 ± 0.1
NMOR	0.9 ± 0.1
NPIP	2.7 ± 0.6
NPYR	0.7 ± 0.1

Estudio del efecto matriz

Se estudió el efecto matriz mediante el análisis de muestras fortificadas aplicando la SBS/DME con calibración externa. Se evaluaron los coeficientes de recuperación que estuvieron comprendidos entre 34 y 430 %, mostrando la existencia de un importante efecto matriz en la determinación. Para verificar la exactitud empleando la calibración por adición de patrón se analizaron disoluciones de una muestra en la que no se detectaron los analitos (muestra C) fortificadas con una concentración conocida de los analitos (10 ng mL^{-1}). Los resultados obtenidos (*Tabla 10.7*) mostraron que la calibración por adición de patrón permitió corregir el efecto matriz.

Tabla 10.7. Estudio de la exactitud.

Analito	Coficiente de recuperación (%)
NDBA	109 ± 7
NDEA	96 ± 8
NDPA	102 ± 9
NDPhA	101 ± 8
NMEA	96 ± 2
NMOR	107 ± 9
NPIP	99 ± 2
NPYR	98 ± 3

Parámetros analíticos del método propuesto

Linealidad

La linealidad estudiada alcanzó al menos 100 ng mL⁻¹ para todos los analitos, obteniéndose coeficientes de determinación elevados ($R^2 > 0.990$).

Límites de detección y cuantificación

Los valores obtenidos para los límites de detección ($3 S/N$) y límites de cuantificación ($10 S/N$), siendo S/N la relación señal-ruido, se muestran en la *Tabla 10.8*. Los límites de detección instrumentales estuvieron comprendidos entre 0.06 y 0.3 ng mL⁻¹, lo que corresponde con unos límites de detección del método entre 3 y 13 ng g⁻¹ en la muestra cosmética.

Tabla 10.8. Límites de detección y cuantificación.

Analito	Límites instrumentales		Límites del método ^c	
	LOD ^a (ng mL ⁻¹)	LOQ ^b (ng mL ⁻¹)	LOD ^a (ng g ⁻¹)	LOQ ^b (ng g ⁻¹)
NDBA	0.2	0.5	8	30
NDEA	0.2	0.7	10	30
NDPA	0.1	0.4	7	20
NDPhA	0.2	0.7	11	40
NMEA	0.2	0.8	12	40
NMOR	0.1	0.4	5	18
NPIP	0.06	0.2	3	10
NPYR	0.3	0.8	13	40

^a LOD: límite de detección ($3 S/N$).

^b LOQ: límite de cuantificación ($10 S/N$).

^c Límites del método calculados para una masa de 0.5 g.

Factores de enriquecimiento

La *Tabla 10.9* contiene los valores obtenidos para los factores de enriquecimiento, definidos como $EF = C_{ext}/C_0$ donde C_{ext} es la concentración de analito en el extracto y C_0 es la concentración en la disolución inicial antes de la extracción, que estuvieron comprendidos entre 4 y 62.

Rendimientos de extracción

Considerando los factores de enriquecimiento y teniendo en cuenta el procedimiento experimental ($EF_{m\acute{a}x} = 500$), los valores obtenidos para los

rendimientos de extracción estuvieron comprendidos entre 0.8 y 12.4 % (Tabla 10.9).

Tabla 10.9. Factores de enriquecimiento y rendimientos de extracción.

Analito	EF ^a	RE (%) ^b
NDBA	37 ± 2	7.4 ± 0.4
NDEA	20 ± 2	4 ± 0.4
NDPA	62 ± 2	12.4 ± 0.4
NDPhA	47 ± 3	9.4 ± 0.6
NMEA	4 ± 1	0.8 ± 0.2
NMOR	6 ± 1	1.2 ± 0.2
NPIP	46 ± 3	9.2 ± 0.6
NPYR	13 ± 1	2.6 ± 0.2

^a EF: factor de enriquecimiento.

^b RE: rendimiento de extracción.

Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada aplicando el procedimiento completo a cinco réplicas de disoluciones patrón conteniendo los analitos a dos niveles de concentración (10 y 100 ng mL⁻¹) en una misma sesión de trabajo para la repetibilidad intra-día y en diferentes sesiones de trabajo para la repetibilidad inter-día. Los resultados obtenidos, que se muestran en la *Tabla 10.10*, indican que se alcanzó una buena precisión (RSD <17.0 %).

Tabla 10.10. Estudio de la repetibilidad.

Analito	Repetibilidad (RSD, %) ^a			
	Intra-día		Inter-día	
	10 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹
NDBA	13.9	5.9	17.0	6.2
NDEA	6.3	7.0	11.0	9.5
NDPA	8.5	6.2	13.9	7.6
NDPhA	5.6	8.7	8.8	9.7
NMEA	6.2	6.9	13.2	8.5
NMOR	9.0	7.9	10.4	10.8
NPIP	6.3	7.1	9.6	10.5
NPYR	9.8	8.1	10.5	9.8

^a Desviación estándar relativa (RSD, %), n = 5.

Análisis de muestras

Los resultados obtenidos en el análisis de las tres muestras cosméticas revelaron que NDBA (muestra A, <LOQ; muestra B, $160 \pm 30 \text{ ng g}^{-1}$) y NDEA (muestra A, $440 \pm 20 \text{ ng g}^{-1}$; muestra B, $240 \pm 50 \text{ ng g}^{-1}$) estuvieron presentes en concentraciones significativas en dos de las muestras analizadas. Además, NDPhA (muestra A, <LOQ) y NPIP (muestra B, <LOQ) también se detectaron en concentraciones inferiores al límite de cuantificación. En la muestra C no se detectó ninguna de las nitrosaminas estudiadas. En la *Figura 10.17* se muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido en el análisis de una crema cosmética (muestra B) fortificada con 100 ng mL^{-1} de los analitos.

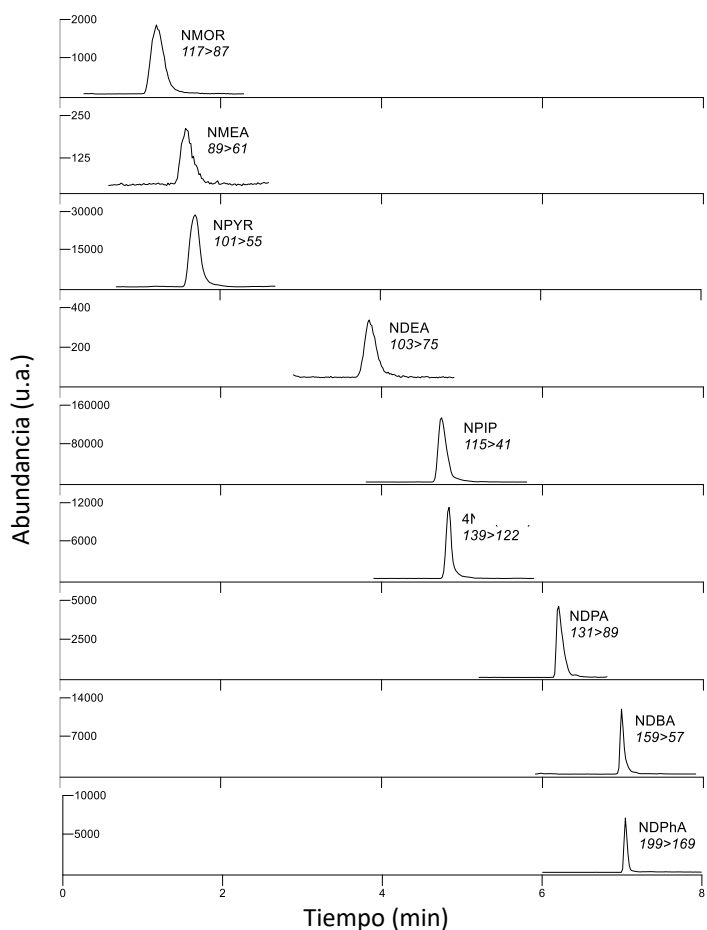


Figura 10.17. Cromatograma obtenido aplicando el método propuesto a una crema cosmética (muestra B) fortificada con 100 ng mL^{-1} de los analitos.

CONCLUSIONES

Como se ha indicado, las nitrosaminas son una familia de compuestos altamente cancerígenos, por lo que su presencia en los productos cosméticos se encuentra prohibida desde 1992. Sin embargo, aún pueden encontrarse en los cosméticos a nivel de trazas ya que se forman con relativa facilidad por reacción entre aminas y compuestos nitrosantes. En este capítulo:

- Se ha desarrollado y validado un nuevo método analítico para la determinación simultánea a nivel de trazas de ocho nitrosaminas prohibidas en productos cosméticos.
- El método se basa en la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME) seguida de LC-MS/MS.
- Se ha empleado un novedoso material composite de MNPs-MOF, $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$, como sorbente magnético.
- El método propuesto se ha aplicado al análisis de muestras cosméticas con matrices hidrofílicas y lipofílicas.
- Se ha expandido la aplicabilidad analítica de la SBSDME, en el análisis de nuevas matrices empleando nuevos materiales.
- El método propuesto es útil para llevar a cabo el control de calidad de los productos cosméticos, para garantizar la seguridad de los consumidores y el cumplimiento de la legislación vigente.

CONCLUSIONES FINALES

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado y validado diferentes métodos analíticos para la determinación de sustancias relacionadas con la eficacia y la seguridad de los productos cosméticos, teniendo en cuenta las necesidades y demandas del actual **Reglamento Europeo sobre los productos cosméticos**. Durante el desarrollo de los trabajos presentados se ha prestado especial atención a las directrices de la denominada *Química Analítica Ecológica*, proponiendo en la medida de lo posible métodos inocuos para el operador y respetuosos con el medio ambiente. En este sentido, se han propuesto y/o adoptado diferentes estrategias de (micro)extracción con el objetivo de reducir el volumen necesario de disolventes orgánicos, seleccionando en cada caso las alternativas de menor toxicidad.

Así pues, en relación a la determinación de ingredientes activos:

- Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de dos compuestos antioxidantes procedentes del olivo, hidroxitirosol y tirosol, en diferentes extractos naturales empleados como ingredientes cosméticos y en los productos acabados que los contienen. La preparación de la muestra es sencilla y la determinación se lleva a cabo mediante LC-UV/Vis, por lo que el procedimiento descrito y la instrumentación necesaria es accesible para las industrias cosméticas.

Este trabajo permite mostrar la utilidad de la Química Analítica para el control de las materias primas, de los procesos de producción y de los productos acabados en la industria cosmética.

En relación a la determinación de conservantes:

- Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de bronopol, un conservante autorizado cuya concentración máxima permitida en los cosméticos se encuentra restringida al 0.1 % y que puede actuar como agente nitrosante en la formación de nitrosaminas. Para ello, se propone la VAEsME seguida de LC-UV/Vis, siendo un procedimiento rápido, sencillo y útil para llevar a cabo el control de calidad en las industrias cosméticas.
- Además, se ha desarrollado un método analítico para la determinación de formaldehído libre en presencia de conservantes dadores de formaldehído, que de acuerdo al Reglamento Europeo se permite una concentración máxima del 0.1 % en productos bucales y del 0.2 % en el

resto de productos. El uso de formaldehído como conservante en los productos cosméticos se ha relacionado con una mayor incidencia de la dermatitis de contacto. Para llevar a cabo la determinación, se propone la RP-DLLME seguida de LC-UV/Vis con derivatización post-columna, lo que permite el análisis de formaldehído a nivel de trazas.

- Por otro lado, se han desarrollado dos métodos analíticos para la determinación de varios “conservantes alternativos”, sustancias que teniendo otra función se emplean como conservantes debido a su actividad antimicrobiana, y pese a ello todavía no se encuentran reguladas.
 - En el primero de ellos se lleva a cabo la determinación de hidroxietoxifenil butanona (HEPB) mediante LC-UV/Vis tras una etapa de lixiviación asistida por ultrasonidos.
 - En el segundo método se lleva a cabo la determinación de cinco conservantes alternativos, alcohol fenílico, metilpropanodiol, fenilpropanol, caprilil glicol y etilhexilglicerina, aplicando una derivatización seguida de VALLsME y LC-UV/Vis.

Aunque no exista actualmente legislación que lo demande, el control analítico de los conservantes alternativos es de gran importancia ya que podrían tener implicaciones sobre la salud humana debido a la actividad biológica que presentan.

Finalmente, en relación a la determinación de sustancias prohibidas:

- Se ha propuesto un método analítico para la determinación de bisphenol A y tres alquifenoles, n-octilfenol, t-octilfenol y n-nonilfenol, en productos cosméticos y materias primas. Estos compuestos son perjudiciales para la salud humana por su actividad como disruptores endocrinos. Para su análisis, se propone la determinación directa mediante LC-MS tras la dilución de las muestras empleando la calibración por adición de patrón.
- Se han desarrollado dos métodos analíticos para la determinación de diferentes nitrosaminas, sustancias que presentan actividad

cancerígena y cuya presencia en los productos cosméticos se encuentra prohibida desde 1992.

- En el primer método se propone la técnica de microextracción VA-RP-DLLME seguida de LC-MS para la determinación de siete nitrosaminas en productos cosméticos.
- En el segundo método se lleva a cabo la microextracción de ocho nitrosaminas mediante SBSDME empleando un novedoso material magnético, $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{MIL-101}(\text{Fe})$, como sorbente seguida de la determinación mediante LC-MS/MS.

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

BP

Bronopol

BPA

Bisfenol A

CAS

Chemical Abstracts Service

CCSC

Comité Científico de Seguridad de los Consumidores

CE

Comunidad Europea

CEE

Comunidad Económica Europea

CEN

Comité Europeo de Normalización

CENELEC

Comité Europeo de Normalización Electrotécnica

CG

Caprilil glicol

CTN

Comité Técnico de Normalización

DEA

Dietanolamina

DLLME

Microextracción líquido-líquido dispersiva

DLS

Dispersión dinámica de luz

DMDM hidantoína

1,3-dimetilol-5,5-dimetil hidantoína

DMF

Dimetilformamida

DSPE

Extracción en fase sólida dispersiva

EDQM

Dirección Europea de Calidad del Medicamento y la Asistencia Sanitaria

EDX

Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X

EF

Factor de enriquecimiento

EG

Etilhexilglicerina

EPA

Agencia de Protección del Medio Ambiente

EN

Norma Europea

ETSI

Instituto Europeo de Normas de Telecomunicaciones

ESI

Ionización por electronebulización

EU

Unión Europea

FID

Detector de ionización en llama

GC

Cromatografía de gases

GT

Grupo de Trabajo

HEPB

Hidroxietoxifenil butanona

HPLC

Cromatografía de líquidos de alto rendimiento

HS

Espacio de cabeza

HS-SPME

Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza

HTYR

Hidroxitirosol

INCI

Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos

IPBC

3-iodo-2-propinil butilcarbamato

IRMM

Institute for Reference Materials and Measurements

ISO

Organización Internacional de Normalización

JRC

Joint Research Center

LC

Cromatografía de líquidos

LLE

Extracción líquido-líquido

LOD

Límite de detección

LOQ

Límite de cuantificación

MNPs

Nanopartículas magnéticas

MOFs

Redes organometálicas

MP

Metilpropanodiol

MRM

Monitorización de reacción múltiple

MS

Espectrometría de masas

MS/MS

Espectrometría de masas en tándem

4NA

4-Nitroanilina

NDBA

N-nitrosodibutilamina

NDEA

N-nitrosodietilamina

NDELA

N-nitrosodietanolamina

NDMA

N-nitrosodimetilamina

NDPA

N-nitrosodipropilamina

NDPhA

N-nitrosodifenilamina

NMEA

N-nitrosoetilmetilamina

NMOR

N-nitrosomorfolina

NP

Nonilfenol

NPIP

N-nitrosopiperidina

NPYR

N-nitrosopirrolidina

OCCLs

Red europea de Laboratorios
Oficiales de Control de Cosméticos

OP

Octilfenol

PA

Alcohol fenetílico

PP

Fenilpropanol

PTFE

Politetrafluoroetileno (teflón)

RE

Rendimiento de extracción

RP

Fase reversa

RP-DLLME

Microextracción líquido-líquido
dispersiva en fase reversa

RSD

Desviación estándar relativa

SBSE

Extracción por sorción sobre barra
agitadora

SBSDME

Microextracción dispersiva por
sorción sobre barra agitadora

SC

Subcomité

SEM

Microscopía electrónica de barrido

SIM

Monitorización de iones
seleccionados

S/N

Relación señal-ruido

SPE

Extracción en fase sólida

SPME

Microextracción en fase sólida

TC

Comité Técnico

TEA

Analizador térmico de energía

TEM

Microscopía electrónica de
transmisión

TYR

Tirosol

UNE

Asociación Española de
Normalización,

Una Norma Española

USAEME

Microextracción con formación de
emulsión asistida por ultrasonidos

UV

Ultravioleta

UV/Vis

Ultravioleta-visible

VA

Asistido por vórtice

VAEME

Microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice

VAEsME

Semi-microextracción con formación de emulsión asistida por vórtice

VALLME

Microextracción líquido-líquido asistida por vórtice

VALLsME

Semi-microextracción líquido-líquido asistida por vórtice

VA-RP-DLLME

Microextracción dispersiva en fase reversa asistida por vórtice

VsLLME

Microextracción líquido-líquido con formación de emulsión mediante surfactantes asistida por vórtice

WG

Grupo de Trabajo

XRD

Difracción de rayos X

ANEXO

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN LA TESIS DOCTORAL

Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 102 (2015) 157-161

Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.016>

Vortex-assisted emulsification semimicroextraction for the analytical control of restricted ingredients in cosmetic products: determination of bronopol by liquid chromatography

Analytical and Bioanalytical Chemistry 408 (2016) 1929-1934

Disponible en:

<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9306-5>

Determination of free formaldehyde in cosmetics containing formaldehyde-releasing preservatives by reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with post-column derivatization

Journal of Chromatography A 1543 (2018) 34-39

Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.031>

A green and rapid analytical method for the determination of hydroxyethoxyphenyl butanone in cosmetic products by liquid chromatography

Cosmetics 5 (2018) 44

Disponible en:

<https://doi.org/10.3390/cosmetics5030044>

Determination of alternative preservatives in cosmetic products by chromophoric derivatization followed by vortex-assisted liquid-liquid semimicroextraction and liquid chromatography

Talanta 154 (2016) 1-6

Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.033>

Determination of phenolic endocrine disruptors in cosmetics by high-performance liquid chromatography mass spectrometry

Analytical Letters 51 (2018) 717-727

Disponible en:

<https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1352593>

Determination of N-nitrosamines in cosmetic products by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with mass spectrometry

Journal of Separation Science 41 (2018) 3143-3151

Disponible en:

<https://doi.org/10.1002/jssc.201800388>

Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-metal organic framework composite: determination of N-nitrosamines in cosmetic products

Journal of Chromatography A 1604 (2019) 460465

Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460465>

