

ARTIGO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01265>

Otimização e validação intralaboratorial de método analítico por CLAE/UV para identificação e quantificação de p-fenilenodiamina em tinturas de hena para cabelos e sobrancelhas

Optimization and intralaboratorial validation of an analytical method by HPLC/UV for identification and quantification of p-phenylenediamine in henna dye hair and eyebrows

Maria Cristina Santa Bárbara* Helena Miyoco Yano Fernanda Fernandes Farias Luiz Fernando Ortiz Gasparin Edilene Afonso Vieira Luz Marina Trujillo Valeria Adriana Pereira Martins Lígia Luriko Miyamaru Blanca Elena Ortega Markman 

RESUMO

Introdução: O p-fenilenodiamina (PPD), amina aromática sensibilizante, vem sendo adicionado ao pó de hena para modificar sua cor natural para preta, aumentando seu tempo de fixação, prática proibida em tinturas para cílios e sobrancelhas. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi otimizar e validar, em níveis intralaboratoriais, um método analítico por CLAE/UV para identificação e quantificação de PPD em tinturas de hena para cabelos e sobrancelhas. **Método:** Foi utilizada coluna em fase reversa C8, fase móvel trietanolamina 1% (pH 8,4) e acetonitrila (99:1, v/v), detecção a 280 nm, volume de injeção de 10 µL, fluxo 1,0 mL/min, temperatura da coluna 32°C, tempo de corrida 10 min, linearidade 5-45 µg/mL (n = 5) com coeficiente de correlação de 0,9982. Para o teste de Cochran (homocedasticidade), 0,3350 e o $C_{\text{crítico}}$ (0,3934), com 99% de confiança. Limites de detecção, 1,17 µg/mL e quantificação, 3,54 µg/mL. O coeficiente de variação da repetibilidade 0,12% e na precisão intermediária pelo teste F obteve-se p-valor de 0,283 com 95% de confiança. **Resultados:** Os resultados da exatidão compreenderam os critérios de aceitação (90%-107%). Das 19 amostras analisadas, 14 apresentaram teor de PPD entre 1,74% a 3,65% p/p, em desacordo com a Legislação. **Conclusões:** O método proposto poderá contribuir com o monitoramento da qualidade e segurança de uso destes produtos.

PALAVRAS-CHAVE: PPD; Hena; Validação de Método

ABSTRACT

Introduction: p-Phenylenediamine (PPD), aromatic sensitizing amine, has been added to henna powder to modify its natural color to black, increasing its fixation time, a practice that is prohibited in eyelash and eyebrows dyes. **Objective:** The objective of this study was to optimize and validate, at an intra-laboratory level, an analytical method by HPLC/UV for identification and quantification of PPD in hen dyes for hair and eyebrows. **Method:** In the method, C8 reverse phase column, mobile phase 1% triethanolamine (pH 8.4) and acetonitrile (99: 1, v/v), detection 280nm, injection volume: 10µL, flow 1.0 mL/min, column temperature 32°C, run time 10 min, linearity 5-45 µg/mL (n = 5) with correlation coefficient 0.9982, were used. For Cochran test (homoscedasticity): 0.3350 and Critical (0.3934) with 99% confidence. Limits of detection 1.17 µg/mL and quantification 3.54 µg/mL. The coefficient of variation of repeatability was 0.12% and the intermediate precision by F-test yielded p value of 0.283 with 95% of confidence. Accuracy results comprised acceptance criteria of 90%-107%. **Results:** Of the 19 analyzed samples, 14 presented PPD content between 1.74 and 3.65% w/w, in disagreement with Legislation. **Conclusions:** The proposed method can contribute to monitoring of quality and safety of use of these products.

Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, SP, Brasil

* E-mail: maria.barbara@ial.sp.gov.br

Recebido: 01 fev 2019
Aprovado: 07 maio 2019

KEYWORDS: p-fenilenodiamina; Henna; Method Validation



INTRODUÇÃO

O p-fenilenodiamina (PPD) é uma amina aromática, considerada pelo Comitê Científico de Segurança do Consumidor (CCSC) da União Europeia um dos cinco compostos químicos identificados como potentes sensibilizantes¹. Foi sintetizado na Alemanha por Hofmann em 1863, com o objetivo de desenvolver uma substância com propriedades antioxidante e corante². É um prohapteno, sua oxidação intraepidérmica produz benzoquinona, que é a substância responsável pela alergia de contato³.

Em 1883 iniciou-se o uso desses pigmentos em tinturas para cabelos e, a partir dessa data, houve um crescimento no tingimento de cabelos tanto por mulheres, como por homens³. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), 26% da população adulta utiliza tinta para cabelo, dos quais 85% são mulheres e 15% são homens.

Nos Emirados Árabes Unidos (EAU), o uso da hena faz parte da tradição e da cultura. Mulheres de todas as idades usam hena na pele como decoração, que é considerada uma parte essencial das cerimônias de casamento e outras celebrações⁴. Um estudo realizado em 2010 neste país mostrou que amostras de hena adquiridas em salões foram analisadas e continham altas concentrações de PPD. As pessoas envolvidas no estudo desenvolveram dermatite de contato devido ao seu uso, fazendo com que pesquisadores recomendassem ainda que a adição de PPD a hena natural fosse proibida nos EAU⁴.

O pó da hena natural é de cor marrom-avermelhada e apresenta sensibilidade à luz⁵. O seu uso é relativamente seguro, devido a seu baixo potencial alergênico. Existem ainda poucos relatos na literatura sobre o surgimento de reações alérgicas, embora haja estudos *in vitro* e *in vivo* sobre o potencial de apresentar genotoxicidade/mutagenicidade^{6,7,8}.

A adição do PPD ao pó de hena tem o intuito de modificar a coloração marrom-avermelhada dos seus pigmentos para coloração preta ou cor de ébano, aumentando o tempo da tatuagem em até 6 semanas, embora esta prática seja proibida em tinturas para cílios e sobrancelhas, conforme disposto na RDC nº 03, de 20 de janeiro de 2012⁹. Esta Resolução apenas estabelece o limite máximo de até 6% de PPD em formulações de tinturas corantes para cabelos.

O PPD usado em tinturas apresenta características moleculares que fornecem resultados estéticos satisfatórios, no entanto, por ser facilmente absorvido pela pele, pode causar sensibilização promovendo a dermatite de contato alérgica¹⁰. Em estudos realizados com pessoas submetidas a testes de contato com PPD, o percentual de dermatite alérgica obtido foi em torno de 4%. A literatura reporta reações adversas relacionadas à exposição de produtos que contenham PPD, em tinta de cabelo e em tatuagens de hena³.

Concentrações elevadas de PPD e de outros componentes constituintes das tinturas para tatuagem, ao entrarem em contato com a pele durante o processo de tatuagem, também podem induzir

uma intensa resposta imunológica que favorece a sensibilização concomitante⁷. O PPD pode ocasionar lesões sistêmicas e induzir hipersensibilidade imediata, provocando urticária, angioedema e dificuldade respiratória. Pode agir ainda por mecanismos de hipersensibilidade tardia, com reações que às vezes aparecem anos após a tatuagem¹¹.

Produtos para tingir sobrancelhas estão se tornando cada vez mais populares, consequentemente, dermatites alérgicas de contato nessa área tornaram-se um problema emergente ao longo da última década. O PPD e seus derivados são os alérgenos mais comuns em cílios e tinturas de sobrancelhas¹². A literatura ainda reporta reações adversas relacionadas à exposição de produtos que contenham PPD em tinta de cabelo e para tatuagens de hena^{13,4}.

Devido à crescente incidência de casos alérgicos ao produto, vários procedimentos analíticos foram desenvolvidos para separar, identificar e quantificar aminas intermediárias e o PPD em tinturas para cabelos e pele. A literatura reporta técnicas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a diversos detectores: CLAE/ultravioleta (UV), CLAE/espectrometria de massas (MS), CLAE/arranjo de fotodiodos (DAD)¹⁴. Além de métodos como CLAE/DAD combinada à cromatografia iônica¹⁵, cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas (CG/MS)¹⁶. Algumas destas técnicas envolvem processos complexos para a extração e derivatização química dos pigmentos das tinturas de cabelo, além de serem técnicas de alto custo e que requerem longo tempo de análise.

Neste cenário, o objetivo do presente estudo foi otimizar e validar, em nível intralaboratorial, um método analítico por CLAE/UV para identificação e quantificação de PPD em tinturas de hena para cabelos e sobrancelhas.

A aplicação do método foi efetuada no doseamento de produtos adquiridos no mercado, pela Vigilância Sanitária e pelo Instituto de Criminalística de São Paulo.

MÉTODO

Padrão de p-fenilenodiamina da Sigma - Aldrich, lote #WXBC1642V, com 99,4% de pureza. Acetonitrila e metanol grau cromatográfico (Merck). Trietanolamina, ácido fosfórico PA (Merck) e sulfato de sódio grau de pureza analítico (Vetec), soluções tampão Material de Referência Certificado 4,0, 7,0 e 10,0 (Digimed) e água ultrapura. Membranas HV em PVDF com poros de 0,45 µ de diâmetro e unidades filtrantes de 0,45 µm de poro (ambas da marca Durapore, Millipore®). As colunas cromatográficas utilizadas foram em fase reversa e capeadas, coluna Purospher Star® RP8 (Merck) com partículas de 5 µm, de 125 x 4 mm de comprimento e de diâmetro interno, Poroshell HPH-C18 da Agilent e a coluna X-Terra C18, de 5 µm, com 25 x 4 mm, da Waters. Utilizou-se vidraria calibrada constituída de balões volumétricos âmbar, pipetas volumétricas, *vials* âmbar e tubos Falcon. Para a matriz de hena, sem o



analito, foi adquirida no comércio uma amostra de hena natural incolor sem a adição de PPD.

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica Mettler Toledo MT5, pHmetro Metrohm, centrífuga refrigerada Quimis®, ultrassom Unique Ultrasonic Cleaner, sistema Purilab Classic (Elga), cromatógrafo líquido Waters modelo Alliance e 2695 (Mildford, MA, USA), com desgaseificador, forno de colunas, bomba quaternária, detector com arranjo de diodos e controlado pelo *software* Empower.

Dentre as 19 amostras de hena em pó avaliadas neste trabalho, sete foram adquiridas aleatoriamente em comércio regular na cidade de São Paulo (SP), duas foram encaminhadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e dez pelo Instituto de Criminalística de São Paulo. As amostras eram tinturas de hena para sobrancelhas e cabelos de diferentes marcas, procedentes de quatro fabricantes, com tonalidades e lotes diferentes. Após a realização de diversos testes analíticos, obteve-se a condição final do método: coluna cromatográfica em fase reversa C8, a fase móvel trietanolamina 1% em água (pH ajustado a 8,4 com ácido fosfórico) e acetonitrila (99:1, v/v), detecção em 280 nm, volume de injeção de 10 µL, fluxo 1 mL/min, temperatura da coluna 32 °C, tempo de corrida de 10 min. O padrão de PPD foi preparado com solução aquosa de Na₂SO₃ a 0,1% (p/v) na concentração de 30 µg/mL.

Concluída a otimização do método, este foi submetido ao teste de verificação do sistema (*system suitability*) conforme estabelecido na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017¹⁷. Foram avaliados os parâmetros cromatográficos de fator cauda, resolução, eficiência do sistema (número de pratos teóricos) e desvio-padrão.

Foram realizados alguns testes para verificar a estabilidade da solução padrão PPD com o método otimizado, em três concentrações diferentes, armazenadas em vidro âmbar e em geladeira. A seguir, verificou-se a pureza de pico na solução padrão de PPD por meio do detector de arranjo de diodos na faixa de comprimento de onda entre 210 a 295 nm, e na matriz (hena sem analito PPD)¹⁸.

As amostras de hena foram processadas de forma que 200 mg foram solubilizados com 10 mL da solução de sulfito de sódio a 0,1% p/v em tubos falcon, agitados manualmente por 1 min, centrifugados a 4.000 rpm por 30 min e filtrados em unidades filtrantes para *vials* âmbar.

A validação do método foi realizada de acordo com a RDC nº 166/2017¹⁷ e com o estabelecido no documento DOQ-CGCRE-008 do Inmetro¹⁹. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão (intermediária e repetibilidade), exatidão (recuperação), limite de detecção, limite de quantificação.

Seletividade: foi determinada utilizando-se solução de hena (matriz sem analito de PPD). Preparou-se dois grupos de soluções, grupo 1 e grupo 2. Ambos com 6 replicatas independentes, e adição de 1 nível de concentração de 40 µg/mL de PPD.

- Grupo 1: branco do ensaio + adição de padrão do analito.

- Grupo 2: matriz sem analito (amostra - branco) + adição de padrão do analito.

Curva analítica de calibração: preparada com cinco concentrações de PPD: 5, 15, 25, 30 e 45 µg/mL, em triplicatas independentes, divididas em dois grupos.

- Grupo 1: branco (solução de sulfito de sódio a 0,1%) mais a adição do padrão de PPD.
- Grupo 2: matriz sem analito (amostra de hena sem PPD) mais a adição do padrão de PPD.

O tratamento estatístico da curva utilizado foi o teste t pareado. Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por meio da curva analítica.

Precisão: avaliada em relação à repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada com mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento sob as mesmas condições de ambiente. As repetições foram independentes com nove determinações de 35 µg/mL de uma amostra (A) contendo o analito PPD e foi calculado o coeficiente de variação (CV%).

A precisão intermediária foi realizada na mesma amostra, utilizando-se mesmas condições analíticas e variando o analista e o dia. O parâmetro foi avaliado utilizando o teste F e análise de variância.

Exatidão: realizada nos termos de recuperação pelo método de adição padrão a matriz isenta do analito (PPD) com três níveis de concentração: 15, 30 e 45 µg/mL (baixa, média e alta) do padrão de PPD em triplicata.

Após a validação do método, este foi aplicado na identificação e quantificação de PPD em 19 amostras de hena com diversas finalidades de uso e diferentes marcas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições cromatográficas descritas no método de Fu e Lei¹⁴ e Almeida et al.⁶ apresentaram tempo de retenção do pico principal de PPD menor que 2 min e fator cauda maior que 2. Esse tempo de retenção reflete pouca interação entre o analito e os sítios ativos da coluna, devido a desvios em relação à dispersão normal do analito na fase estacionária. Por consequência, a pouca efetividade da coluna impactou no fator cauda. A otimização do método envolveu várias etapas: utilização de colunas C18 de diversos fabricantes e coluna C8; alteração do pH de 7,7 para 8,4 minimizando assim a ionização do analito; testes de fases móveis de polaridades diferentes, até a obtenção de resultados satisfatórios que atendessem a adequabilidade do sistema.

O diluente descrito no método de Fu e Lei¹⁴ e Almeida et al.⁶, foi alterado para a solução de sulfito de sódio 0,1%, o qual apresentou excelentes resultados na solubilidade do PPD, tanto no padrão como nas amostras de hena contendo PPD, avaliados no teste de recuperação de amostras isentas de PPD e com PPD.



A matriz, hena natural incolor, foi avaliada na mesma concentração das soluções das amostras e não apresentou pico no mesmo tempo de retenção da solução padrão.

Após otimização do método, os resultados dos estudos de estabilidade da solução do padrão de PPD demonstraram que nas condições estabelecidas, a estabilidade não foi maior que 8 h.

Os resultados do teste de adequabilidade do sistema cromatográfico do método otimizado foram: 1,26 de fator cauda, 4.375,4 número de pratos teóricos e desvio-padrão de 1,28%. Desta forma, o método otimizado atendeu aos parâmetros estabelecidos na adequabilidade do sistema.

Foi verificada a seletividade do método por meio da análise da solução padrão e das amostras por absorção molecular na região UV com auxílio do DAD. Para a verificação da pureza de pico, foram extraídos os espectros de varredura na região UV (240-400 nm) do sinal do ativo, nos respectivos tempos de retenção nos cromatogramas do padrão e das amostras analisadas, conforme apresentados na Figura 1. Obteve-se pelo *software* Empower, tanto para a solução padrão quanto para a amostra, valores de *purity angle* inferior ao *purity threshold*, confirmando a pureza dos picos. Determinou-se a similaridade entre os espectros de 0,99, considerando adequada a seletividade.

Na Figura 2 estão demonstrados os cromatogramas A, B e C desenvolvidos no método otimizado e validado. O cromatograma A corresponde ao desenvolvimento de uma amostra de hena (matriz) isenta de PPD e, no tempo de 2,65 min, não é observada a presença de possível interferente da matriz na determinação do PPD no sistema cromatográfico. O cromatograma B corresponde ao desenvolvimento da solução padrão de PPD, no qual o tempo de retenção de 2,65 min evidencia boa interação entre os sítios ativos da coluna e o analito PPD. O cromatograma C é de uma amostra de hena acrescentada de solução de PPD. Desta

maneira está demonstrado que o método é adequado para os fins analíticos pretendidos.

A literatura reporta vários procedimentos para *clean-up* de vegetais, como o uso de mistura de sais de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* (QuEChERS). Foram realizados testes de purificação de amostras de hena com a presença de PPD. Com estes sais, os resultados apresentados foram insatisfatórios devido à adsorção dos pigmentos de PPD pelo carvão ativo, componente dos QuEChERS²⁰.

A validação do método foi iniciada com o teste de seletividade para garantir que os componentes da hena, assim como de outros pigmentos presentes na formulação, não interferissem na identificação e quantificação do PPD. Os resultados obtidos na comparação do grupo 1 e 2, mediante o teste estatístico de Grubbs com 99% de confiança, não apresentaram valores dispersos e os testes F e t com 95% de confiança apresentaram variâncias heterogêneas e médias equivalentes respectivamente, demonstrando que não há interferência da matriz de hena.

O método apresentou linearidade na faixa de 5 a 45 µg/mL (n = 5) com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9982 e equação da reta $y = 4350,2x + 2077,5$. O tratamento estatístico da curva de calibração feito pelo teste de Cochran apresentou resultados para homocedasticidade de 0,3350 e o $C_{\text{crítico}}$ (0,3934) com 99% de confiança. Concluiu-se que as variâncias são homogêneas.

O limite de detecção (LD) de 1,17 µg/mL e o limite de quantificação (LQ) 3,54 µg/mL foram obtidos através do tratamento estatístico da curva analítica. Baseou-se no desvio-padrão residual da curva analítica (S_x/y) e na inclinação da curva analítica. O valor de LQ equivalente ao menor nível de concentração da curva foi determinado com precisão e exatidão aceitáveis.

Os resultados da precisão do método foram obtidos através do coeficiente de variação (CV%), sendo menor que 1% (0,12%). Este

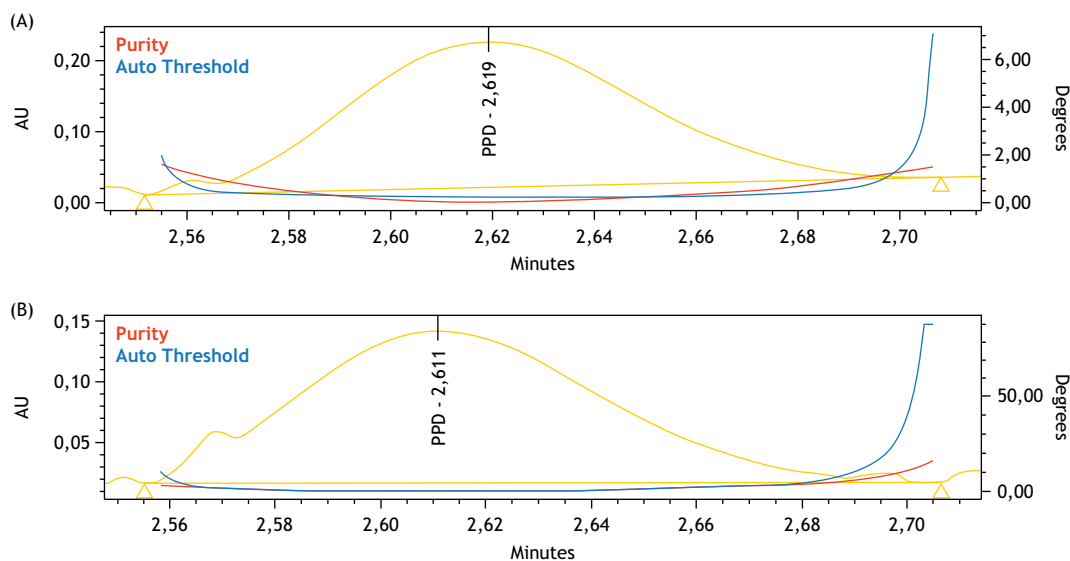


Figura 1. Os cromatogramas A e B de pureza de pico, desenvolvidos no método otimizado e validado, representam respectivamente soluções de padrão de PPD e amostra.

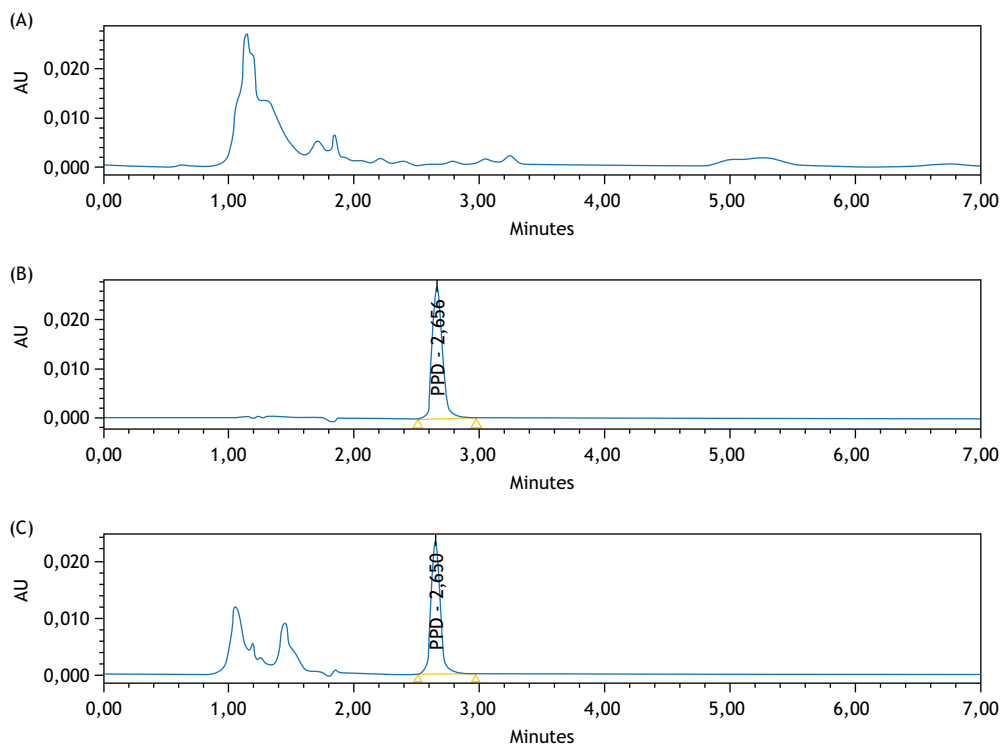


Figura 2. Os cromatogramas A, B e C, desenvolvidos no método otimizado e validado, representam respectivamente soluções de hena (matriz) sem adição de PPD; padrão de PPD e amostra adicionada do padrão de PPD.

foi calculado pela razão do desvio-padrão com a média dos valores obtidos, evidenciando que o método é preciso.

Os resultados da precisão intermediária avaliados pelo teste F para seis determinações foram equivalentes, p-valor = 0,283 com 95% de confiança.

Os resultados do teste de exatidão foram obtidos mediante o ensaio de recuperação de amostras fortificadas com o padrão de PPD, em três níveis de concentração, conforme demonstrado na Tabela 1. Eles atenderam ao critério de aceitação de 90% a 107%, estabelecido DOQ-CGCRE-008 do Inmetro, por tratar-se de um produto cosmético de uso tópico, considerando que a legislação admite o uso de PPD em tinturas capilares e proíbe o seu uso para tinturas em cílios e sobrancelhas¹⁹.

Os resultados dos parâmetros de validação demonstraram ser este método apropriado para aplicação na determinação qualitativa e quantitativa de PPD em produtos de hena para cabelos e sobrancelhas (pelo e pele), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 1. Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise do PPD.

Exatidão			
n (triplicata)	3	3	3
Concentração teórica µg/mL	15,0	30,0	45,0
Concentração obtida µg/mL	14,9	27,5	40,5
% Recuperação	99,8	91,8	90,1
Coefficiente de variação (%)	2,4	2,4	1,2

Conforme os resultados expressos na Tabela 2, 14 amostras analisadas constituídas de hena para sobrancelhas apresentaram valores de teor de PPD entre 1,74% a 3,65% p/p, estando, assim, em desacordo com o estabelecido na RDC nº 03/2012⁶, que proíbe o uso de PPD em tinturas de hena para sobrancelhas, bem como não

Tabela 2. Determinação de PPD em amostras de hena.

Amostras de hena	Indicação de uso	Cor	Teor PPD (% p/p)
A	Sobrancelhas (pelo e pele)	Castanho claro	2,95
B	Sobrancelhas (pelo e pele)	Castanho claro	3,28
C	Sobrancelhas (pelo e pele)	Castanho claro	3,23
D	Sobrancelhas (pelo e pele)	Marrom	1,80
E	Sobrancelhas (pelo e pele)	Louro	2,52
F	Sobrancelhas (pelo e pele)	Castanho escuro	2,96
G	Sobrancelhas (pelo e pele)	Castanho médio	2,96
H	Sobrancelhas (pelo e pele)	Louro escuro	2,93
I	Sobrancelhas (pelo e pele)	Marrom	1,80
J	Sobrancelhas (pelo e pele)	Castanho médio	3,39
K	Sobrancelhas (pelo e pele)	Castanho claro	2,96
L	Sobrancelhas (pelo e pele)	Marrom	1,80
M	Sobrancelhas (pelo e pele)	Marrom	1,74
N	Sobrancelhas (pelo e pele)	Preto	3,65
O	Sobrancelhas (pelo e pele)	Vinho	0
P	Cabelos	Preto	0
Q	Cabelos	Acinzentado	0
R	Cabelos	Natural	0

PPD: p-fenilenodiamina.



regulamenta o seu uso em tinturas de hena para cabelos. Dentre as amostras analisadas, uma declarava no rótulo a presença de PPD em sua formulação, porém não indicava o seu teor, refletindo o não cumprimento da legislação por parte do fabricante.

Nas amostras de hena analisadas (Tabela 2) não se observou uma maior concentração do teor de PPD nas tinturas de hena, independentemente das tonalidades, em contradição ao relatado na literatura por pesquisadores que encontraram altas concentrações de PPD em hena de cor negra²¹. Enquanto, para as amostras analisadas de hena de uso capilar, não foi encontrado PPD em sua formulação.

CONCLUSÕES

O método otimizado e validado é simples, rápido e sensível para identificar e quantificar PPD por CLAE/UV. Esta técnica,

por ser versátil, permitiu a alteração das condições cromatográficas para se obter um método que atendeu aos requisitos estabelecidos na adequabilidade do sistema, mostrando eficácia na sua aplicação para determinar PPD nas amostras de hena para cabelos e sobrancelhas. Os resultados das amostras avaliadas sugerem a necessidade de se estabelecer programas de monitoramentos destes produtos junto à Vigilância Sanitária, por possuir o risco de conter PPD, conhecido como um potente alérgeno e estar relacionado ao desencadeamento da dermatite alérgica.

Considerando que o papel da Vigilância Sanitária é reduzir a exposição da população a produtos fora das especificações, que possam acarretar danos ou agravos à saúde, futuros resultados obtidos em programas de monitoramento servirão de subsídios na comercialização destes produtos e, até mesmo, ao aprimoramento da legislação.

REFERÊNCIAS

1. Moro PA, Morina M, Milani F, Pandolfi M, Guerriero F, Bernardo L. Sensitization and clinically relevant allergy to hair dyes and clothes from black henna tattoos: do people know the risk? An uncommon serious case and a review of the literature. *Cosmetics*. 2016;3(23):1-13. <https://doi.org/10.3390/cosmetics3030023>
2. Oliveira RA, Zanoni TB, Bessegato GG, Oliveira DP, Umbuzeiro GA, Zanoni MVB. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. *Quim Nova*. 2014;37(6):1037-46. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140143>
3. McFadden JP, Yeo L, White JL. Clinical and experimental aspects of allergic contact dermatitis to para-phenylenediamine. *Clin Dermatol*. 2011;29(3):316-24. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.11.011>
4. Al-Suwaidi A, Ahmed H. Determination of para-phenylenediamine (PPD) in henna in the United Arab Emirates. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(4):1681-93. <https://doi.org/10.3390/ijerph7041681>
5. Ortiz Salvador JM, Esteve Martínez A, Subiabre Ferrer D, Victoria Martínez AM, Cuadra Oyanguen J, Zaragoza Ninet V. Para-phenylenediamine allergic contact dermatitis due to henna tattoos in a child and adolescent population. *An Pediatr*. 2017;86(3):122-6. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2016.02.005>
6. Almeida PJ, Borrego L, Pulido-Melián E, González-Díaz O. Quantification of p-phenylenediamine and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone in henna tattoos. *Contact Derm*. 2011;66(1):33-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.01992.x>
7. Borrego L, Hernández-Machín B, Gonzalez O, Hernández B. Sensitization to para-phenylenediamine in a street side temporary tattoo artisan. *Contact Derm*. 2005;52(5):288-9. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.0573e.x>
8. Scientific Committee on Consumer Products - SCCP. Opinion on P-phenylenediamine. In: 9th plenary meeting Public Health and Risk Assessment, Brussels, Belgium. Brussels: Scientific Committee on Consumer Products; 2006.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC N° 3, de 20 de janeiro de 2012. Dispõe sobre os requisitos técnicos "Listas de substâncias que os produtos de Higiene Pessoal, cosméticos e Perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas". *Diário Oficial União*. 21 jan 2015.
10. Durán BE, Pérez DR, Salvador JFS. Allergic contact dermatitis due to paraphenylenediamine: an update. *Actas Dermosifiliogr*. 2018;109(7):602-9. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2017.12.007>
11. Bassi A, Campolmi P, Cannarozzo C, Conti R, Brusino N, Gola M et al. Tattoo-associated skin reaction: the importance of an early diagnosis and proper treatment. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/354608>
12. Romita P, Foti C, Mascia P, Guida S. Eyebrow allergic contact dermatitis caused by m-aminophenol and toluene-2,5-diamine secondary to a temporary black henna tattoo. *Contact Derm*. 2018;79(1):51-2. <https://doi.org/10.1111/cod.12987>
13. Scientific Committee on Consumer Products - SCCP. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Products concerning the p-Phenylenediamine COLIPA N° A7. In: 9th Plenary Meeting Public Health and Risk Assessment, Brussels, Belgium. Brussels: Scientific Committee on Consumer Products; 2006.
14. Fu R, Lei Q. Fast analysis of oxidative hair dyes at high pH with Poroshell HPH-C18 and other phases. Shanghai: Agilent Technology; 2014.
15. Franco JH, Silva BF, Zanoni MVB. Using ionic liquid combined with HPLC-DAD to analyze semi-permanent hair dyes commercial formulations. *Anal Methods*. 2015;7(3):1115-22.



16. Ahmed HAM, Maaboud RMA, Latif FA, El-Dean AMK, El-Shaie KM, Vilanova E et al. Different analytical methods of para-phenylenediamine base hair dye. JCDSA. 2013;3(3):17-25. <https://doi.org/10.4236/jcdsa.2013.33A1003>
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, Resolução RDC Nº 166. de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Diário Oficial União. 25 jul 2017.
18. European Medicines Agency - EMA. ICH Topic Q1 A (R2) Stability Testing of new drug substances and products. Londres: European Medicines Agency; 2003.
19. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2018.
20. Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEhERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. Scientia Chromatographica. 2011;3(1):51-64. <https://doi.org/10.4322/sc.2011.004>
21. Ministério da Saúde (PT). Controlo laboratorial de produtos para coloração capilar: análise de p-Fenilenodiamina (PPD). Lisboa: Ministério da Saúde; 2012[acesso 23 jan 2019]. Disponível em: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Relatorio_PPD_0.pdf/bc080cde-3a87-4f4b-92c6-ddfbd8dfe7be?version=1.0

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.