



OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE CAPTURA E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DERIVATIZAÇÃO COM DNPH PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS CARBONILADOS VOLÁTEIS NA FUMAÇA DE CIGARRO

Arthur F. Sbardelotto¹, Letícia A. Natividade¹, Juliana S. Munaretto¹, Maria E. L. Travi¹, Thaís Ferreira¹.

¹British American Tobacco (BAT), BAT Brazil Labs, Cachoeirinha, RS, Brazil
arthur_francisco_sbardelotto@bat.com

Palavras-Chave: Otimização multivariada, Superfície de resposta, Derivatização.

Introdução

Os compostos carbonilados voláteis presentes na fumaça de cigarro constituem uma importante classe de analitos devido à sua relevância toxicológica e à sua contribuição para a caracterização química dos produtos derivados do tabaco (Ding, et al. 2016; Fujioka, Shibamoto, 2006). Entre esses compostos destacam-se aldeídos e cetonas de baixa massa molecular, cuja determinação quantitativa é frequentemente exigida em estudos de desenvolvimento, monitoramento de qualidade e atendimento a requisitos regulatórios (FDA, 2026). Dessa forma, métodos analíticos capazes de fornecer resultados precisos, exatos e robustos são fundamentais para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

A derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), seguida de análise por HPLC ou LC-MS/MS, constitui uma das abordagens mais utilizadas para a determinação de compostos carbonilados (U.S. EPA, 1996; Ding et al., 2016, CORESTA, 2019; ISO 21160, 2018). Em meio ácido, aldeídos e cetonas reagem com o DNPH formando hidrazonas estáveis e adequadas à detecção cromatográfica, possibilitando sua quantificação com elevada sensibilidade e seletividade (U.S. EPA, 1996; Naguschewski; Marten, 2010). No entanto, a eficiência da derivatização, a estabilidade dos derivados formados e a recuperação dos analitos podem ser significativamente influenciadas pela composição da solução de captura, incluindo fatores como concentração de DNPH, acidez do meio, teor de água e proporção de solventes orgânicos (Wang et al., 2005; Jeong; Miller; Shah, 2019). Essas variáveis tornam necessária a avaliação e otimização sistemática das condições de captura e derivatização para garantir resultados quantitativos confiáveis, especialmente para compostos carbonilados mais reativos (Wang et al., 2005; Jeong; Miller; Shah, 2019).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e otimizar uma metodologia de captura e derivatização com DNPH para a determinação de compostos carbonilados voláteis na fumaça de cigarro. Para isso, foi avaliado o efeito da concentração de ácido, da proporção de acetonitrila na solução de captura e do tempo de reação sobre a eficiência



da derivatização, a estabilidade dos derivados formados e a resposta analítica dos diferentes compostos carbonilados. A otimização desses parâmetros visa aumentar a recuperação dos analitos e assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos.

Material e Métodos

A otimização da solução de captura foi realizada por meio de um Planejamento Composto Central (PCC), empregando como fatores independentes a concentração de ácido perclórico (0,03 a 1,17% v/v) e a proporção de acetonitrila (53,79 a 96,21% v/v) na solução de captura. A concentração de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) foi mantida constante em 0,25% (m/v) em todos os experimentos. Como variáveis resposta, foram avaliadas as concentrações de formaldeído, acetaldeído, acetona, propionaldeído, acroleína, metil-etil-cetona (MEK), crotonaldeído e butiraldeído, selecionados por sua relevância como compostos carbonilados voláteis presentes na fumaça de cigarro. O delineamento experimental compreendeu pontos fatoriais, pontos axiais e réplicas no ponto central para estimativa do erro experimental e avaliação da reprodutibilidade do modelo, totalizando nove condições experimentais.

Para a etapa de otimização, amostras de fumaça de cigarros de referência 1R6F foram geradas em máquina de fumar linear SM450 (Cerulean, Reino Unido), operada de acordo com o regime ISO (ISO 3308:2012). A fumaça foi coletada em dois *traps* contendo 35 mL da solução de captura, totalizando 70 mL por amostra. Após a coleta, o conteúdo dos *traps* foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e a reação de derivatização foi interrompida pela adição de solução de Trizma[®] a 2,0% (m/v), completando-se o volume final.

Após a definição da composição otimizada da solução de captura, foi conduzido um estudo cinético para avaliar a evolução da formação das hidrazonas de DNPH ao longo do tempo. Para esse estudo, amostras de fumaça de cigarros de referência 1R6F foram coletadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a coleta, alíquotas de 7 mL da solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, sendo a reação interrompida mediante adição de 3 mL de solução de Trizma[®] a 2,0% (m/v) nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min após o término do processo de fumada. Para cada intervalo de tempo, foram preparadas e analisadas três replicatas independentes.

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema HPLC Agilent 1260 Infinity I equipado com detector de comprimento de onda variável (VWD), operado a 365 nm. A separação dos analitos foi realizada em coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (50 × 4,6 mm; 1,8 μm), mantida a 25°C. A fase móvel A foi composta por água contendo 30% de acetonitrila, 10% de tetrahidrofurano (THF) e 1% de isopropanol (IPA), enquanto a fase móvel B consistiu de água contendo 65% de acetonitrila, 1% de THF e 1% de IPA. A eluição foi conduzida em gradiente de 100% A para 100% B ao longo de 11 min, utilizando vazão de 1,25 mL min⁻¹.

Os resultados obtidos no PCC foram avaliados por metodologia de superfície de resposta. Os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores estudados foram estimados por regressão múltipla, sendo a significância dos coeficientes determinada por análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para o estudo cinético, as diferenças entre os tempos de reação foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Dentre os oito compostos avaliados, apenas formaldeído, acroleína e crotonaldeído apresentaram influência significativa das variáveis estudadas no Planejamento Composto Central (Figura 1). Os modelos ajustados apresentaram coeficientes de determinação (R^2) entre 0,907 e 0,962, indicando boa capacidade de descrição dos dados experimentais. Para os demais analitos, as alterações na concentração de ácido perclórico e na proporção de acetonitrila não resultaram em variações estatisticamente significativas da resposta analítica.

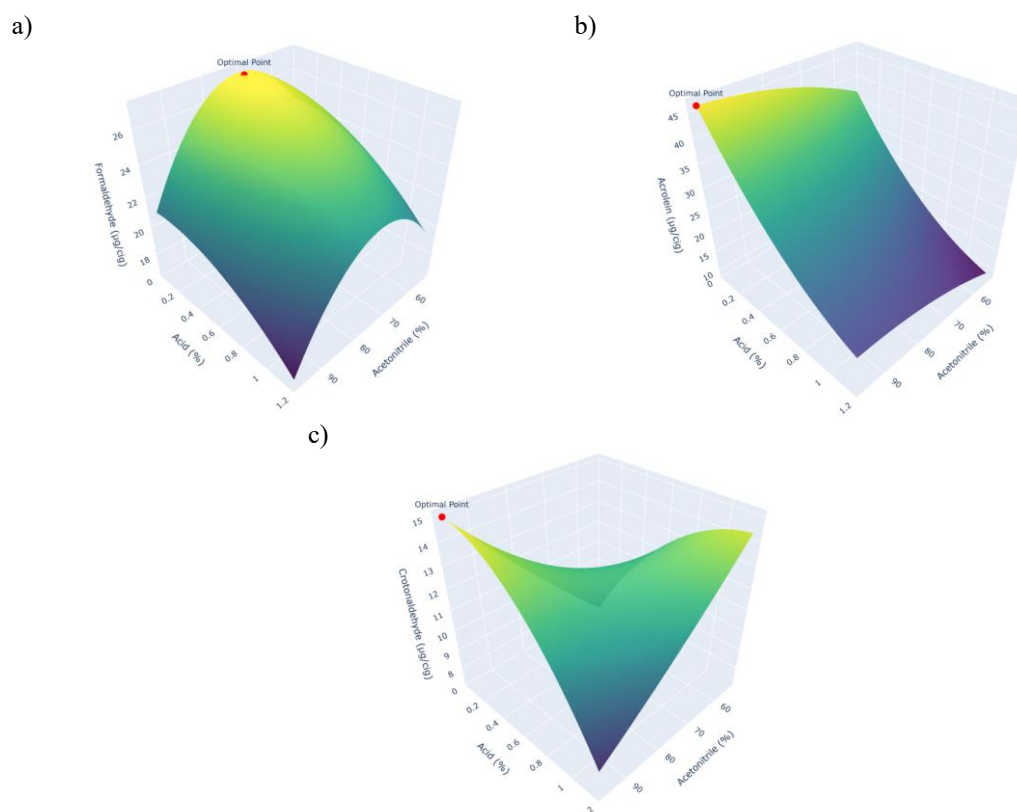


Figura 1. Superfícies de resposta obtidas para a concentração dos derivados de (a) formaldeído, (b) acroleína e (c) crotonaldeído em função da porcentagem de acetonitrila e da concentração de ácido na solução de captura. O ponto vermelho indica a condição experimental predita pelo modelo como ótima para maximização da resposta analítica de cada composto.



Para o formaldeído (Figura 1a), observa-se comportamento quadrático da resposta em função da composição da solução de captura. Os maiores valores foram obtidos em concentrações reduzidas de ácido e proporções intermediárias a elevadas de acetonitrila. A presença de uma região bem definida de máximo indica que concentrações excessivas de ácido ou desvios na composição orgânica da solução podem comprometer a eficiência da captura ou a estabilidade da hidrazona formada. Esse comportamento sugere a existência de um ponto ótimo operacional para maximizar a resposta analítica do formaldeído.

Para a acroleína (Figura 1b), observa-se efeito predominante da concentração de ácido, com redução progressiva da resposta analítica à medida que o teor ácido aumenta. O efeito da proporção de acetonitrila mostrou-se menos pronunciado dentro da faixa estudada. Os maiores sinais foram obtidos em condições de elevada proporção de acetonitrila associada a baixas concentrações de ácido. Esse comportamento pode estar relacionado à elevada reatividade da acroleína, cuja estabilidade em meio fortemente ácido pode ser inferior à observada para outros compostos carbonilados. Além disso, a presença de uma dupla ligação conjugada à carbonila pode estar associada à ocorrência de reações secundárias, incluindo processos de poliderivatização, contribuindo para a redução da resposta analítica em condições de maior acidez (Zhang et al. 2022).

O crotonaldeído apresentou comportamento dependente da interação entre os fatores avaliados (Figura 1c). Observa-se que o aumento da concentração de ácido provoca redução da resposta analítica, especialmente em condições de elevada proporção de acetonitrila. Em contraste, baixos teores de ácido associados a elevadas proporções de solvente orgânico favorecem a obtenção dos maiores sinais analíticos. A superfície obtida sugere que a estabilidade do derivado e a eficiência da derivatização são influenciadas simultaneamente pelos dois fatores, resultando em uma região ótima localizada próxima à menor concentração de ácido investigada.

Embora os compostos avaliados tenham apresentado comportamentos distintos, observou-se uma tendência geral de melhores respostas analíticas em condições de baixa concentração de ácido e elevada proporção de acetonitrila. Com base nas superfícies de resposta, foi selecionada a solução contendo 80% de acetonitrila e 0,10% de ácido perclórico, por proporcionar altas respostas analíticas e maior robustez frente a pequenas variações experimentais, sendo adotada como condição otimizada para os experimentos subsequentes.

A Figura 2 apresenta a variação percentual da concentração dos compostos carbonilados em função do tempo de reação. As letras indicam os agrupamentos obtidos pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$). De modo geral, observaram-se diferenças na cinética de formação das hidrazonas de DNPH entre os analitos avaliados, evidenciando comportamentos dependentes da estrutura química dos compostos.

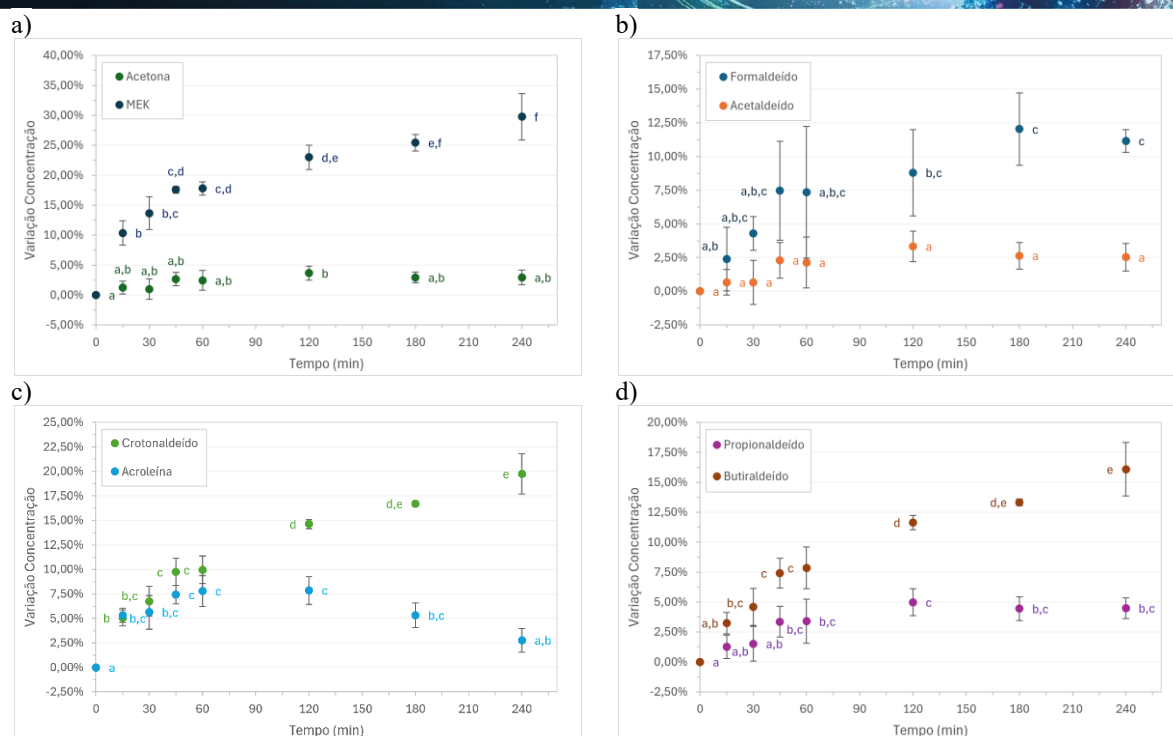


Figura 2. Evolução da variação percentual da concentração dos compostos carbonilados ao longo do tempo: (a) acetona e MEK; (b) formaldeído e acetaldeído; (c) crotonaldeído e acroleína; (d) propionaldeído e butiraldeído. As barras de erro representam o desvio-padrão (n=3). Letras distintas indicam diferenças significativas entre os tempos avaliados de cada analito ($p < 0,05$).

Conforme apresentado na Figura 2a, a acetona apresentou variações inferiores a 4% ao longo do período avaliado, enquanto a MEK exibiu aumento contínuo da resposta analítica, atingindo aproximadamente 30% após 240 min. Os resultados do teste de *Tukey* indicaram diferenças significativas entre os tempos iniciais e finais para a MEK, sugerindo uma cinética de derivatização mais lenta.

Na Figura 2b, o acetaldeído manteve resposta praticamente constante ao longo do experimento, enquanto o formaldeído apresentou aumento gradual da concentração até cerca de 12%, com diferenças significativas observadas após 120 min, indicando continuidade da derivatização ao longo do período avaliado.

Para os aldeídos insaturados (Figura 2c), o crotonaldeído apresentou aumento progressivo da resposta, alcançando aproximadamente 20% ao final do estudo. Em contraste, a acroleína apresentou incremento máximo próximo de 8% em 120 min, seguido de redução nos tempos posteriores. Esse comportamento pode estar associado à elevada reatividade da molécula e à ocorrência de reações secundárias, como a poliderivatização, que reduzem a concentração do derivado monitorado.

Comportamento semelhante foi observado para os aldeídos saturados (Figura 2d). O propionaldeído apresentou pequenas variações ao longo do tempo, enquanto o butiraldeído



exibiu aumento contínuo de aproximadamente 16%, com diferenças significativas entre os tempos iniciais e finais.

Em conjunto, os resultados demonstram que a influência do tempo de reação é dependente do analito. Enquanto acetona, acetaldeído, propionaldeído e acroleína atingiram rapidamente condições próximas ao equilíbrio, formaldeído, butiraldeído, crotonaldeído e, principalmente, MEK apresentaram cinética de derivatização mais lenta. Esses resultados corroboram observações da literatura de que a velocidade de formação e a estabilidade das hidrazonas de DNPH variam entre os compostos carbonilados (WANG et al., 2005; JEONG; MILLER; SHAH, 2019). Considerando os resultados obtidos, foi adotado o tempo de reação de 60 min antes da adição de Trizma®, pois nesse intervalo a maioria dos analitos já havia atingido condições próximas ao equilíbrio. Além disso, observou-se redução da resposta analítica da acroleína após esse período, indicando possível ocorrência de reações secundárias. Assim, a escolha de 60 min representou um compromisso entre a formação adequada dos derivados dos analitos mais lentos e a manutenção da estabilidade dos compostos mais reativos, uma vez que não foi possível estabelecer um único tempo ótimo para todos os analitos avaliados.

Conclusões

A otimização da solução de captura por planejamento experimental demonstrou que a composição do meio reacional influencia significativamente a determinação de formaldeído, acroleína e crotonaldeído, sendo as maiores respostas analíticas obtidas em condições de baixa concentração de ácido e elevada proporção de acetonitrila. Com base nos resultados obtidos, foi selecionada uma solução contendo 80% de acetonitrila e 0,10% de ácido, por apresentar elevada resposta analítica e adequada robustez operacional. O estudo cinético evidenciou diferenças na velocidade de formação das hidrazonas de DNPH entre os compostos avaliados, com MEK, crotonaldeído, butiraldeído e formaldeído apresentando derivatização mais lenta, enquanto acetona, acetaldeído, propionaldeído e acroleína atingiram rapidamente condições próximas ao equilíbrio. Com base nesses resultados, foi adotado um tempo de reação de 60 minutos, considerado adequado para a determinação simultânea dos compostos avaliados. Os resultados demonstram que tanto a composição da solução de captura quanto o tempo de derivatização influenciam a determinação de compostos carbonilados específicos, ressaltando a necessidade de controle desses parâmetros para garantir resultados confiáveis e comparáveis em análises de fumaça de cigarro.

Agradecimentos

Os autores agradecem à BAT Brasil pelo suporte técnico e estrutural disponibilizado para a realização deste estudo. Em especial, agradecem à equipe do Laboratório de Análises Regulatórias (LAR) pela colaboração, compartilhamento de conhecimento, apoio nas atividades experimentais e contribuição para a condução das etapas analíticas, fundamentais para o desenvolvimento e execução deste trabalho.



Referências

CORESTA. *CORESTA Recommended Method No. 74: Determination of Selected Carbonyls in Mainstream Cigarette Smoke by HPLC*. 5. ed. Paris: CORESTA, 2019.

DING, Y. S.; YAN, X.; WONG, J.; CHAN, M.; WATSON, C. H. In Situ Derivatization and Quantification of Seven Carbonyls in Cigarette Mainstream Smoke. **Chemical Research in Toxicology**, 29(1), 125-131, 2016.

FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Determination of Toxic Carbonyl Compounds in Cigarette Smoke. **Environmental Toxicology**, 21(1), 47-54, 2006.

INTORP, M.; PURKIS, S.; WAGSTAFF, W. Determination of Carbonyl Compounds in Cigarette Mainstream Smoke: The CORESTA 2010 Collaborative Study and Recommended Method. **Beiträge zur Tabakforschung International**, 25(2), 361-374, 2012.

ISO. *ISO 3308:2012. Routine Analytical Cigarette-Smoking Machine: Definitions and Standard Conditions*. Geneva: International Organization for Standardization, 2012.

ISO. *ISO 21160:2018. Cigarettes: Determination of Selected Carbonyls in the Mainstream Smoke of Cigarettes: Method Using High Performance Liquid Chromatography*. Geneva: International Organization for Standardization, 2018.

JEONG, L.; MILLER, J. H.; SHAH, N. Optimization and Comparison of 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) Derivatization Conditions for the Determination of Carbonyl Compounds. In: **CORESTA Tobacco Science Research Conference**, 2019.

NAGUSCHEWSKI, M.; MARTEN, S. Rapid Determination of DNPH Derivatized Carbonyl Compounds by UHPLC. **LCGC Asia Pacific**, 13(2), 2010.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Harmful and Potentially Harmful Constituents (HPHCs)*. Silver Spring, MD: FDA, 2026. Disponível em: [FDA Harmful and Potentially Harmful Constituents](#). Acesso em: 29 ago. 2026.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Method 8315A: Determination of Carbonyl Compounds by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Washington, DC: U.S. EPA, 1996. Disponível em: [EPA Method 8315A](#). Acesso em: 30 ago. 2026.

WANG, T. L.; TONG, H. W.; YAN, X. Y.; SHENG, L. Q.; YANG, J.; LIU, S. M. Determination of Volatile Carbonyl Compounds in Cigarette Smoke by LC-DAD. **Chromatographia**, 62, 631-636, 2005.

ZHANG, H. et al. Acid-Catalyzed Isomerization of Carbonyls-2,4-Dinitrophenylhydrazone in Mainstream Smoke of Heat-Not-Burn Tobacco Product for HPLC Analysis. **LCGC North America**, 40(1), 2022.