

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM COSMÉTICOS E
IMUNOBIOLOGICOS (VACINAS)**

MARIA JANAÍNA DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970 - Maceió - AL

MARIA JANAÍNA DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM COSMÉTICOS E
IMUNOBIOLÓGICOS (VACINAS)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências, com área de concentração em Química Analítica e Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Coorientador: Prof. Dr. Wander Gustavo Botero

Maceió – AL
2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- O48d Oliveira, Maria Janaína de.
Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de mercúrio total em cosméticos e imunobiológicos (vacinas) / Maria Janaína de Oliveira. – 2022.
147 f. : il., grafs., tabs. color.
- Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Coorientador: Wander Gustavo Botero.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.
- Bibliografia: f. 144.
Apêndices: f. 145-147.
1. Compostos organomercúricos. 2. Conservantes - Mercúrio. 3. Preparações farmacêuticas. 4. Produtos para maquiagem facial. 5. Água micelar. I. Título.

CDU: 661.849:615.371



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



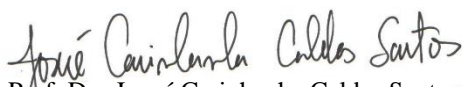
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió - AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
E-mail: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO


Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Maria Janaína de Oliveira** intitulada: “DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM COSMÉTICOS E IMUNOBIOLOGÍCOS (VACINAS)”, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 7 de março de 2022, às 14h, por meio de videoconferência.


Maceió, 7 de março de 2022.


Comissão Examinadora:

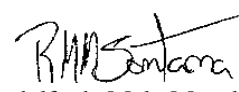

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
Orientador – (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
SIAPE 143.133.38
Reg. UFAL 1250044


Prof. Dr. Wander Gustavo Botero
Coorientador - (PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes
(PPGQ/ICEx/UFMG)


Prof. Dr. Felipe Silva Semaan
(PPGQ/IQ/UFF)


Prof. Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana
(PPGQ/IQ/UFBA)


Profa. Dra. Janaína Heberle Bortoluzzi
(PPGQB/IQB/UFAL)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Luiz Manoel e Francisca Luiza que me ensinaram a visualizar a beleza da vida, mesmo diante das maiores adversidades, pelo apoio incondicional e empenho na minha formação. Gratidão por todas as renúncias e orações, como forma de proteção. Esta é uma conquista nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção, inspiração, providência em todas as circunstâncias e força concedida nesta trajetória. "Por tudo que passa, passou e está por vir".

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por terem sido meu sustentáculo e apoio incalculável. Obrigada por dedicarem suas vidas a proporcionar todo necessário para realização deste sonho.

Aos meus irmãos Janiele, Jaqueline e Jailson pelo incentivo constante, por me impulsionarem nesta caminhada árdua, pela acolhida, por entenderem minhas ausências e pelo amor incondicional.

Aos meus sobrinhos Alícia, Miguel e Heitor, minha inspiração, minha alegria de viver e meu combustível para concretização de todos os meus ideais!

Aos meus avós, José Manoel (*in memoriam*) e Rita Glória, por todo amor, apoio e dedicação.

Ao meu cunhado Júnior Moraes (*in memoriam*), por acreditar na minha capacidade, pelo suporte por meio de palavras e orações.

A todos os colegas do LINQA, pelo companheirismo e ajuda mútua.

Aos amigos da UFAL, em especial, Amanda, Ary, Ari, Francisco, Wood, Jaelson, Reginaldo, Marina, Fátima, Karol, Emerson, Guimaraes, Tatielle, Alexandra, Andreia, e Cristian. Gratidão pelo compartilhamento de conhecimento, pelos momentos de alegria, pelo convívio agradável, pela companhia durante as madrugadas e finais de semana no LINQA e Central Analítica, pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis em Maceió.

Ao Professor Josué Carinhonha, pela orientação, incentivo e amizade, minha eterna gratidão e admiração! Sua inteligência e competência são imensuráveis. Profissional que honra docência! Obrigada por aprimorar meus conhecimentos e aceitar todos os desafios no decorrer deste trabalho.

Às Professoras Ísis e Daniela, pelas valiosas sugestões nas reuniões de grupo.

Aos membros da banca examinadora, pela generosidade ao disponibilizar tempo para avaliação deste trabalho e valiosas sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia e toda comunidade acadêmica do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À unidade de saúde de Jequiá da Praia e a coordenadora municipal de imunização de Campina Grande, Miralva Cruz pela doação das amostras de vacinas.

À CAPES pela bolsa concedida e aos demais órgãos de fomento CNPq e FAPEAL pelo apoio aos projetos de pesquisa desenvolvidos no LINQA.

Aos meus amigos da UEPB, Lígia, Vanusia, Enivaldo, Vera, Mary, Ceíça, Mérgia, Simone, Sayonara, Helionalda, Kaline e Juracy, por me incentivarem desde o início da seleção de doutorado e no decorrer de todo processo. Obrigada por tudo!

Ao Professor Valderi Leite, que iniciou meus primeiros passos na área científica. Agradeço o compartilhamento de conhecimento, incentivo e amizade. Gratidão por acreditar em mim!

Aos meus alunos da UEPB, os quais me motivaram a me tornar uma profissional mais qualificada, para disseminar o conhecimento de forma mais significativa, por meio desta titulação.

Aos amigos Varzealegrenses e Campinenses, Kátia, Michelle, Silvana, Cris, Laize, Danuza, Edilma, Nadejda e Dagoberto que me apoiaram em incontáveis momentos e me impulsionaram a seguir com meus objetivos desde a graduação.

Enfim, a todos e a todas que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta tese.

Os meus sinceros agradecimentos!

“É justo que muito custe, o que muito vale.”

Santa Teresa D'Ávila

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos, é o inatingível. Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, é a oportunidade.”

Victor Hugo

RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidas diferentes estratégias analíticas para determinação de mercúrio total em amostras de vacinas e cosméticos. Para as amostras de vacinas um método simples, rápido, sensível e passível de ser aplicado em análises de rotina foi desenvolvido baseado na oxidação direta de timerosal (TH), um composto orgânico de mercúrio, a mercúrio inorgânico por meio da ação de diferentes oxidantes, empregando espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (CV AFS), como técnica de detecção. A oxidação direta do TH a Hg(II) foi avaliada frente a quatro sistemas oxidantes: (1) KBr/KBrO₃; (2) KMnO₄; (3) KI/KIO₃ e (4) Na₂S/KMnO₄ empregando-se ácidos minerais diluídos (HCl ou HNO₃). Somente os sistemas (1) e (2) apresentaram eficiência de oxidação quantitativa do TH a Hg(II) ($\geq 80\%$). A influência de solventes orgânicos (ácido fórmico e 2-propanol) foi avaliada e a eficiência de oxidação variou de 102 a 114%. Sob condições otimizadas o método apresentou elevada sensibilidade com limite de detecção (LOD) de 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$, e mostrou-se preciso com desvio padrão relativo (RSD) $\leq 4,59\%$ ($n = 10$). A ausência do efeito de matriz foi comprovada a partir dos ensaios de adição e recuperação aplicados nas amostras de vacinas, as quais foram fortificadas com TH obtendo-se recuperações de 80,1 a 106% (sistema 1) e 92,5 a 101% (sistema 2) ($n = 3$). A aplicabilidade do método foi avaliada em cinco amostras de vacinas com diferentes concentrações de TH, e os resultados obtidos foram concordantes com o procedimento de digestão assistida por micro-ondas (método de referência), indicando assim, a acurácia do método proposto. No segundo trabalho duas estratégias analíticas foram aplicadas: a digestão assistida por micro-ondas e a oxidação direta (reação de bromação) com auxílio de antiespumantes empregando ácido diluído (HCl) para determinação de TH, fenilmercúrio (FM) e Hg(II) (como Hg_{total}) em amostras de cosméticos micelares. Para a oxidação direta do mercúrio orgânico a inorgânico, cinco antiespumantes foram avaliados: (1) álcool amílico (AA); (2) álcool isoamílico (AI); (3) A; (4) B e (5) 204. O processo de oxidação foi quantitativo apenas para os antiespumantes A, B e 204. A eficiência da digestão assistida por micro-ondas foi avaliada nas amostras de cosméticos micelares quanto ao perfil dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) e aos teores de carbono orgânico dissolvido total nos sistemas originais e nos respectivos digeridos. Nas condições otimizadas, as curvas analíticas foram validadas de 0,1 a 2,0 μL^{-1} (micro-ondas) e 0,5 a 20 μL^{-1} (oxidação direta). O método de digestão assistida por micro-ondas apresentou LOD de 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ e RSD $\leq 4,66\%$ ($n = 10$). Para o ensaio de recuperação as amostras de cosméticos micelares foram fortificadas com TH, FM e Hg(II) e resultados obtidos variaram de 95,8 a 112% (TH), 89,9 a 112% (FM) e 91,8 a 113% para o Hg (II), respectivamente. Para o método de oxidação direta, os limites de detecção foram 0,038; 0,043 e 0,045 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os antiespumantes A, B e 204, respectivamente, com RSD $\leq 4,81\%$. As recuperações obtidas foram quantitativas para as amostras avaliadas, independente da espécie de mercúrio empregada nas fortificações e variaram entre 96,3 a 117% (antiespumante A); 97,1 a 118 % (antiespumante B) e 82,3 a 110% (antiespumante 204), confirmando a exatidão do método proposto. Por fim, o método foi aplicado a três amostras de cosméticos micelares e os resultados foram concordantes com o procedimento de digestão assistida por micro-ondas (método de referência). Ambos os métodos apresentaram parâmetros analíticos que permitem a determinação de Hg_{total} em níveis traço e mostraram-se viáveis para análises de controle de qualidade de cosméticos micelares e produtos utilizados para *skincare*.

Palavras-chave: Compostos organomercuriais. Conservante a base de Hg. Produtos farmacêuticos. Demaquilante. Água micelar.

ABSTRACT

In the present work, different analytical strategies were developed for the determination of total mercury in vaccine and cosmetic samples. For vaccine samples, a simple, fast, sensitive method that can be applied in routine analysis was developed based on the direct oxidation of thimerosal (TH), an organic mercury compound, to inorganic mercury through the action of different oxidants, employing cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CV AFS) as a detection technique. The direct oxidation of TH to Hg(II) was evaluated against four oxidizing systems: (1) KBr/KBrO₃; (2) KMnO₄; (3) KI/KIO₃ and (4) Na₂S/KMnO₄ using diluted mineral acids (HCl or HNO₃). Only systems (1) and (2) showed quantitative TH oxidation efficiency to Hg(II) ($\geq 80\%$). The influence of organic solvents (formic acid and 2-propanol) was evaluated, and the oxidation efficiency ranged from 102 to 114%. Under optimized conditions, the method showed high sensitivity with a limit of detection (LOD) of 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$ and proved to be accurate with a relative standard deviation (RSD) $\leq 4.59\%$ ($n = 10$). The absence of the matrix effect was confirmed from the addition and recovery tests applied to the vaccine samples, which were fortified with TH, obtaining recoveries of 80.1 to 106% (system 1) and 92.5 to 101% (system 2) ($n = 3$). The applicability of the method was evaluated in five vaccine samples with different concentrations of TH, and the results obtained agreed with the microwave-assisted digestion procedure (reference method), thus indicating the accuracy of the proposed method. In the second work, two analytical strategies were applied: microwave-assisted digestion and direct oxidation (bromination reaction) with the aid of antifoams using diluted acid (HCl) to determine TH, phenylmercury (FM) and Hg(II) (as Hg_{total}) in micellar cosmetic samples. For the direct oxidation of organic to inorganic mercury, five defoamers were evaluated: (1) amyl alcohol (AA); (2) isoamyl alcohol (AI); (3) A; (4) B and (5) 204. The oxidation process was quantitative only for antifoams A, B and 204. The efficiency of microwave-assisted digestion was evaluated in micellar cosmetic samples in terms of the magnetic resonance spectra profile (1H NMR) and total dissolved organic carbon content in the original systems and in the respective digested systems. Under optimized conditions, the analytical curves were validated from 0.1 to 2.0 μL (microwave) and 0.5 to 20 μL^{-1} (direct oxidation). The microwave-assisted digestion method showed LOD of 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$ and RSD $\leq 4.66\%$ ($n = 10$). For the recovery test, micellar cosmetic samples were fortified with TH, FM and Hg(II) and the results obtained ranged from 95.8 to 112% (TH), 89.9 to 112% (FM) and 91.8 to 113% for Hg(II), respectively. For the direct oxidation method, the LODs were 0.038; 0.043 and 0.045 $\mu\text{g L}^{-1}$ for antifoams A, B and 204, respectively, with RSD $\leq 4.81\%$. The recoveries obtained were quantitative for the samples evaluated, regardless of the species of mercury used in the fortifications and ranged from 96.3 to 117% (antifoam A); 97.1 to 118% (antifoam B) and 82.3 to 110% (antifoam 204), confirming the accuracy of the proposed method. Finally, the method was applied to three samples of micellar cosmetics and the results agreed with the microwave-assisted digestion procedure (reference method). Both methods presented analytical parameters that allow the determination of Hg_{total} at trace levels and proved to be viable for quality control analysis of micellar cosmetics and products used for skincare.

Keywords: Organomercury Compounds. Hg based preservative. Pharmaceutical products. Makeup remover. Micellar water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do timerosal (TH) e produtos de degradação em meio aquoso, ácido tiosalicílico (ATS) e Etilmercúrio (EtHg ⁺) e subsequente reação do EtHg ⁺ com grupos tióis livres	26
Figura 2 -	Número de publicações ao longo dos últimos 34 anos, referentes aos critérios na plataforma ISI	31
Figura 3 -	Etapas de preparo de amostras para decomposição direta do TH em vacinas, aplicando os sistemas (1) e (2) para determinação do mercúrio por CV AFS	55
Figura 4 -	Comparação do sinal analítico após digestão por micro-ondas da solução de TH (20 µg L ⁻¹), utilizando diferentes composições de misturas oxidantes (HNO ₃ / H ₂ O ₂) (n = 3)	58
Figura 5 -	Avaliação da concentração dos sistemas oxidantes (KBr/KBrO ₃ e KMnO ₄) na sensibilidade analítica e eficiência da oxidação de TH a Hg _{ino}	59
Figura 6 -	Avaliação de sinais analíticos empregando os sistemas oxidantes (1 e 2) e sonicação para determinação de mercúrio total em diferentes soluções padrão (Hg(II), TH e etilmercúrio) e determinação de TH em vacinas	60
Figura 7 -	Comparação da eficiência de oxidação do TH a Hg _{ino} e avaliação da concentração e tipo de ácido [(A) HCl ou (B) HNO ₃] na determinação de TH	62
Figura 8 -	Influência de solventes orgânicos na sensibilidade do método proposto	63
Figura 9 -	Efeito da adição de solventes orgânicos na eficiência de oxidação do TH a Hg _{ino}	63
Figura 10 -	Sensibilidade do método proposto utilizando diferentes espécies de mercúrio (Hg(II) e TH) (n = 3)	65
Figura 11 -	Aspectos das amostras cosméticas pré-digeridas	90
Figura 12 -	Perfil dos espectros de RMN ¹ H para amostras de cosméticos micelares sem tratamento e após a digestão assistida por micro-ondas	92

Figura 13 -	Perfil espectral para determinação de Hg_{total} por CV AFS na ausência e na presença de álcool amílico (AA): a) S2, b) S2 + AA 0,8% (v/v), c) S2 + AA 1,6% (v/v), d) S2 + AA 8% (v/v), e) S2 + AA 16% (v/v)	101
Figura 14 -	Avaliação da eficiência de oxidação de TH empregando diferentes tempos reacionais	104
Figura 15 -	Efeito da concentração dos antiespumantes A, B e 204 no sinal analítico da solução padrão de Hg(II)	107
Figura 16 -	Avaliação de diferentes antiespumantes derivados de silicone e éteres.	108
Figura 17 -	Ensaio de adição e recuperação para TH e FM ($20 \mu g L^{-1}$) realizado na amostra S2 empregando diferentes antiespumantes (A, B e 204)	110
Figura 18 -	Modelo proposto do processo dos mecanismos associados a transferência do analito na interface da solução líquido-gás em sistemas micelares na (a) ausência e na (b) presença de antiespumante, considerando as seguintes etapas: (1) expansão da região da interface líquido-gás da solução sem adição de antiespumante, (2) expansão da região da interface líquido-gás da solução com antiespumante, (3) ação do antiespumante (espalhamento) na interface analito e líquido-gás e (4) ação do antiespumante desestabilizando a espuma do meio reacional, com liberação do analito para o sistema de detecção	111
Figura 19 -	Aspecto visual para diferentes concentrações de KBr / $KBrO_3$ empregadas para a oxidação direta na amostra S1 e avaliação comparativa com amostra S2 na ausência do sistema oxidante	118
Figura A1 -	Sistema de fluxo contínuo para determinação de mercúrio total por CV AFS	133
Figura A2 -	Perfil sinal analítico para uma solução padrão de Hg (II) na concentração de $5 \mu g L^{-1}$, empregando os parâmetros de operação: 15s <i>delay</i> , 40s análise e 60s memória	135
Figura A3 -	Parâmetros instrumentais para determinação de mercúrio total por CV AFS empregando três condições: (1) 15 s <i>delay</i> , 40 s análise e 60 s memória, (2) 15 s <i>delay</i> , 40 s análise e 40 s memória e (3) 5 s <i>delay</i> , 40 s análise e 40 s memória	136
Figura A4 -	Estudo estabilidade da solução digerida de TH, empregando diferentes proporções de ácido nítrico $14 mol L^{-1}$ e peróxido de hidrogênio 30 % (m/ m)	137

Figura B1 -	Avaliação preliminar parâmetros instrumentais para determinação de mercúrio total por CV AFS empregando diferentes condições: (1) 15 s <i>delay</i> , 40 s análise e 60 s memória, (2) 15 s <i>delay</i> , 40 s análise e 40 s memória e (3) 5 s <i>delay</i> , 40 s análise e 40 s memória, todas os sistemas no ganho de 100	140
Figura B2 -	Avaliação do efeito do ácido clorídrico na eficiência de oxidação de FM a Hg(II)	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Ranking dos dez países consumidores do setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos	29
Tabela 2 –	Parâmetros instrumentais empregados para determinação de Hg _{total} por CV AFS	53
Tabela 3 –	Programa de aquecimento para digestão em sistema fechado para as amostras de vacinas por radiação micro-ondas	56
Tabela 4 –	Características das amostras de vacinas analisadas e respectivas concentrações de TH declaradas pelo fabricante	57
Tabela 5 –	Acidez residual de soluções digeridas de TH utilizando micro-ondas em sistema fechado	58
Tabela 6 –	Avaliação da influência da concentração dos ácidos (HCl e HNO ₃) para os sistemas oxidantes (KBr/KBrO ₃ e KMnO ₄) quanto a eficiência de oxidação de TH para Hg _{ino}	61
Tabela 7 –	Teste de homocedasticidade das variâncias para as curvas analíticas empregando diferentes métodos	65
Tabela 8 –	ANOVA para o modelo linear obtido para o método proposto (sistemas 1 e 2) e método de referência (digestão assistida por micro-ondas)	66
Tabela 9 –	Parâmetros de desempenho do método proposto e método de referência para determinação de mercúrio por CVAFS	66
Tabela 10 –	Características analíticas de diferentes metodologias para determinação de TH em vacinas em relação ao método proposto	68
Tabela 11 –	Comparação geral dos parâmetros obtidos para os sistemas 1 e 2 e digestão assistida por micro-ondas	69
Tabela 12 –	Ensaio de recuperação, comparação com procedimento de referência e determinação de TH em amostras de vacinas pelo método proposto	71
Tabela 13 –	Parâmetros instrumentais empregados para determinação de mercúrio total por CV AFS	83

Tabela 14 –	Tipos de soluções removedoras de maquiagem e principais conservantes e surfactantes presentes na formulação, utilizadas na otimização do método para determinação de Hg_{total}	85
Tabela 15 –	Programa para digestão das amostras de cosméticos por radiação micro-ondas	86
Tabela 16 –	Concentração de COD e NT para as amostras de cosméticos ($n = 3$)	94
Tabela 17 –	Teste de homocedasticidade das variâncias para as curvas analíticas para o método de referência ($n = 6$)	95
Tabela 18 –	ANOVA para o modelo de regressão linear obtido pelo método de referência	96
Tabela 19 –	Parâmetros de desempenho do método proposto para determinação de mercúrio por CV AFS	97
Tabela 20 –	Ensaio de adição e recuperação para o método proposto aplicado para amostras de cosméticos micelares (média \pm SD, $n = 3$)	98
Tabela 21 –	Avaliação da eficiência de oxidação de TH, empregando diferentes concentrações do reagente de bromação	103
Tabela 22 –	Ensaio de recuperação para determinação de TH em diferentes amostras de cosméticos micelares (S1, S2 e S3) e efeito da matriz em diferentes espécies de mercúrio para o método proposto empregando amostra S2 ($n = 3$)	105
Tabela 23 –	Teste de homocedasticidade das variâncias para as curvas analíticas empregando diferentes antiespumantes ($n = 8$)	112
Tabela 24 –	Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido para o método proposto empregando os antiespumantes A, B e 204	113
Tabela 25 –	Parâmetros de desempenho do método proposto para determinação de Hg_{total} por CV AFS empregando diferentes antiespumantes	113
Tabela 26 –	Características analíticas de diferentes metodologias para determinação de mercúrio total em amostras de cosméticos em relação ao método proposto empregando diferentes antiespumantes	115

Tabela 27 – Características analíticas de diferentes metodologias para determinação de espécies mercúrio em matrizes de alimentícias, biológicas e ambientais empregando diferentes antiespumantes para o preparo da amostra	117
Tabela 28 – Ensaio de adição e recuperação do método proposto aplicado as amostras de cosméticos micelares ($n = 3$) para os antiespumantes A, B e 204 empregando diferentes espécies de mercúrio	120

LISTA DE ABREVIATURA

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BBO	Sonda Multinuclear Direta
BFR	<i>Federal Institute for Risk Assessment</i>
BDHCL	<i>Boosted – Discharge Hollow Cathode Lamps</i>
CDT	Carbono Dissolvido Total
CFR	<i>Code of Federal Regulations</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
CID	Carbono Inorgânico Dissolvido
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COSING	<i>European Commission database for information on cosmetic substances and ingredients contained in the Cosmetics</i>
CRM	Material de Referência Certificado
CV AAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Vapor Frio
CV AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica por Vapor Frio
DP	Voltametria de pulso diferencial com eletrodo à base de prata com filme de mercúrio
AdSVHg(Ag)FE	
DT	Vacina adsorvida Difteria-tétano
DTP/HIB/HB	Vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis/ Haemophilus influenza b/ Hepatite B (conjugada)
DBD-PIV-AFS	Descarga em barreira dielétrica-induzida à vaporização por plasma acoplada à espectrometria de fluorescência atômica
EC	<i>European Commission</i>
ELCAD AES	Espectrometria de emissão atômica com descarga eletrolítica de cátodo brilhante
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EUROMONITOR	<i>International is the world's leading independent provider of strategic market research</i>

HG AAS	Epectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidreto
HG AFS	Epectrometria de Fluorescência Atômica por Geração de Hidreto
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
HPPC	Produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISI	<i>Institute for Scientific Information</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MW	Micro-ondas
NDIR	Infravermelho Não Dispersivo
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSD	Desvio Padrão Relativo
SK	<i>Standard Kit</i>
SWV	Voltametria de onda quadrada
TA	Tempo de Análise
TD	Tempo de Delay
TFM TM	Teflon Quimicamente Modificado
TM	Tempo de Memória
TMN	Analizador de Nitrogênio Total
TOC	Analizador de Carbono Total
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
PVG-DBD-OES	Geração de vapor fotoquímico acoplado à espectrometria de emissão óptica com descarga em barreira dielétrica
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	22
1.1 Mercúrio: características gerais e toxicidade	22
1.2 Aplicações de mercúrio e compostos de mercúrio	24
1.3 Timerosal em vacinas	25
1.4 Cosméticos: panorama geral	27
1.5 Compostos potencialmente tóxicos em cosméticos	29
1.6 Metodologias para determinação de mercúrio total em vacinas e cosméticos.....	33
1.7 Justificativa do estudo e objetivos gerais.....	38
REFERÊNCIAS	39
2 ARTIGO 1: DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO (TIMEROSAL) EM VACINAS USANDO DIFERENTES OXIDANTES E ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA POR VAPOR FRIO EM ÁCIDOS DILUÍDOS.	51
2.1 Introdução	51
2.2 Objetivos específicos.....	52
2.3 Experimental.....	53
2.3.1 Instrumentação	53
2.3.2 Reagentes e soluções.....	53
2.3.3 Determinação de TH em vacinas por CV AFS.....	54
2.3.4 Digestão das amostras de vacina por micro-ondas (método de referência) para determinação de TH por CV AFS	55
2.3.5 Amostras de vacinas	56
2.3.6 Tratamento estatístico dos dados.....	57
2.4 Resultados e Discussão	57
2.4.1 Estudos preliminares	57
2.4.2 Avaliação da oxidação de TH por micro-ondas (método de referência)	57
2.4.3 Avaliação dos sistemas oxidantes	59
2.4.4 Influência do ácido (HCl ou HNO ₃) na determinação de TH	60
2.4.5 Efeito do solvente e cinética reacional.....	62
2.4.6 Parâmetros de desempenho e curva analítica	64
2.4.7 Análise das amostras de vacinas	69
2.5 Conclusão	72
REFERÊNCIAS	74

4	ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM AMOSTRAS DE COSMÉTICOS MICELARES EMPREGANDO CV AFS.....	79
3.1	Introdução	79
3.2	Objetivos específicos.....	81
3.3	Experimental.....	82
3.3.1	<i>Instrumentação</i>	82
3.3.2	<i>Reagentes, soluções e amostras</i>	83
3.3.3	<i>Amostras de cosméticos micelares</i>	84
3.3.4	<i>Preparo de amostra para análise de COD e NT</i>	85
3.3.5	<i>Preparo das amostras para análise por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) ...</i>	85
3.3.6	<i>Digestão das matrizes cosméticas.....</i>	86
3.3.7	<i>Determinação de mercúrio total em cosméticos micelares por CV AFS.....</i>	87
3.3.7.1	<i>Álcool amílico e isoamílico como agentes antiespumantes.....</i>	87
3.3.7.2	<i>Compostos derivados de éteres e a base de silicone como agentes antiespumantes ...</i>	88
3.3.8	<i>Tratamento estatístico dos dados.....</i>	88
3.4.	Resultados e Discussão	89
3.4.1.	<i>Estudos preliminares</i>	89
3.4.2	<i>Avaliação da pré-digestão e digestão das amostras cosméticas</i>	89
3.4.3	<i>Avaliação da eficiência da digestão assistida por micro-ondas para as amostras de cosméticos micelares.....</i>	91
3.4.3.1	<i>Uso de RMN ¹H na avaliação da eficiência do processo de digestão</i>	91
3.4.3.2	<i>Teor de carbono orgânico dissolvido (COD) e nitrogênio total (NT) na avaliação da eficiência do processo de digestão</i>	94
3.4.4	<i>Parâmetros de desempenho e curva analítica para digestão por micro-ondas</i>	95
3.4.5	<i>Análise das amostras de cosméticos micelares empregando digestão por micro-ondas (método de referência).....</i>	97
3.4.6	<i>Método oxidativo direto para determinação espécies de mercúrio em cosméticos micelares</i>	100
3.4.6.1	<i>Álcoois de cadeia curta como agentes antiespumantes.....</i>	100
3.4.6.2	<i>Antiespumantes derivados de silicone (A e B) e éteres (204).....</i>	106
3.4.7	<i>Parâmetros de desempenho e curva analítica</i>	112
3.4.7.1	<i>Comparação com diferentes métodos.....</i>	114
3.4.7.2	<i>Análise das amostras cosméticas.....</i>	118

3.5 Conclusão	123
3.6 Perspectivas.....	124
REFERÊNCIAS.....	125
APÊNDICE A – ARTIGO 1	133
A.1 Determinação de mercúrio (timerosal) em vacinas usando diferentes oxidantes e espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio em ácidos diluídos	133
<i>A.1.1 Procedimento de medições analíticas por CV AFS</i>	<i>133</i>
<i>A.1.2 Avaliação dos parâmetros instrumentais</i>	<i>134</i>
A.2 Estudo da estabilidade da solução de TH digerida.....	136
REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICE B – ARTIGO 2	139
B.1 Avaliação de diferentes estratégias de preparo de amostra para determinação de mercúrio total em amostras de cosméticos micelares empregando CV AFS.....	139
<i>B.1.1 Avaliação de parâmetros instrumentais</i>	<i>139</i>
<i>B.1.2 Método oxidativo direto para soluções de FM.....</i>	<i>140</i>
<i>B.1.3 Digestão assistida por micro-ondas para soluções de FM</i>	<i>141</i>
<i>B.1.4 Avaliação da sensibilidade para determinação de mercúrio total após preparo de amostra por micro-ondas nas amostras de cosméticas micelares por CV AFS</i>	<i>142</i>
<i>B.1.5 Avaliação do volume das amostras de cosméticos micelares para o método de oxidação direta.....</i>	<i>143</i>
REFERÊNCIAS.....	144
APÊNDICE C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO	145
C.1 Trabalhos científicos publicados em periódicos e anais de congressos.....	145

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Mercúrio: características gerais e toxicidade

Diariamente a população está exposta a diferentes tipos de substâncias potencialmente tóxicas, as quais podem causar diversos efeitos deletérios à saúde humana. Dentre estas substâncias destaca-se o mercúrio, presente amplamente em matrizes antropogênicas e naturais (GAUTAM, *et al.*, 2016) e disponível em formas distintas: elementar, inorgânico e orgânico, que inclui compostos nos quais o mercúrio está ligado a uma estrutura contendo átomos de carbono (NAYFEH *et al.*, 2018).

As exposições humanas ao mercúrio, decorrem especialmente da inalação do vapor de mercúrio ou por meio da sua ingestão quando ligado às frações orgânicas (metil, dimetil ou etilmercúrio), provenientes principalmente de fontes alimentares aquáticas (EKINCI, *et al.*, 2014). Todas as formas de mercúrio induzem efeitos tóxicos em mamíferos e sua toxicidade varia de acordo com a dose, grau de exposição e espécie química. Dentre os efeitos deletérios decorrentes da exposição a essas espécies, pode-se citar doenças neurológicas, neurodegenerativas, cardiovasculares, entre outras (YANG *et al.*, 2020). Sabe-se que exposições agudas aos vapores de Hg^0 induzem a pneumonite grave, podendo ser fatal. Enquanto a exposição crônica ao mercúrio e suas diferentes formas induzem sintomas mais brandos (BERNHOF, 2012). Esses sintomas incluem dispneia, distúrbios visuais, falta de coordenação motora, alterações neuromusculares, dores de cabeça, insônia, perdas de memória, náuseas e vômitos (EPA, 2021).

Ademais, o mercúrio elementar difunde-se facilmente por meio das membranas celulares, barreiras hematoencefálicas e placentárias até os órgãos-alvo, isso decorre das suas características solúveis. Uma vez que, presente na corrente sanguínea pode ser facilmente oxidado a mercúrio inorgânico, que possui baixa lipofilicidade e conseqüentemente, capacidade limitada de transpor as membranas celulares, tendo como órgão alvo os rins (PARK; ZHENG, 2012). Referente ao Hg (II), quando presente na corrente sanguínea liga-se a grupos sulfidrilos ou é transportado suspenso no plasma, sendo absorvido principalmente pelo trato respiratório (GENCHI, *et al.*, 2017; VIANNA *et al.*, 2019). Vale ressaltar que, os sais de Hg (I) e Hg (II) danificam majoritariamente o revestimento do intestino e os rins, enquanto, o metilmercúrio é amplamente distribuído por todo o corpo (BERNHOF, 2012).

Os compostos alquilados são consideravelmente mais tóxicos e suscitam mais preocupações que a forma elementar e sais inorgânicos, por exemplo, o metilmercúrio pode entrar rapidamente na corrente sanguínea, causando danos irreparáveis ao sistema nervoso

central. No entanto, a exposição a outras espécies de organomercúricos, como o fenilmercúrio, timerosal e principalmente etilmercúrio, que se acredita ter toxicidade semelhante ao metilmercúrio, é frequentemente negligenciada (PICHICHERO *et al.*, 2002; CARRASCO, *et al.*, 2009; BERLIN, *et al.*, 2015; MAHBUB *et al.*, 2017).

Evidências relatam que o órgão principal relacionado a toxicidade dos compostos de mercúrio é o cérebro, uma vez que, estes compostos acumulam-se, devido sua ligação às cisteínas, decorrente da afinidade do mercúrio com o enxofre presente nos grupos sulfidrilas (tiol, -SH) (AJSUVAKOVA *et al.*, 2020; LEERMAKERS *et al.*, 2005). A elevada afinidade entre essas espécies pode ser justificada levando-se em consideração que os cátions de mercúrio são ácidos moles, enquanto os grupos tióis são bases moles (GONZALEZ-RAYMAT *et al.*, 2017; GAJDOSECHOVA *et al.*, 2018). Tal afinidade é um fator importante subjacente às propriedades bioquímicas dos íons deste elemento, tendo em vista que, concentrações de mercúrio em níveis traço, absorvidas pelo organismo podem se ligar aos grupos tióis nas proteínas e enzimas, interferindo na estrutura, função celular e na atividade (SPILLER, 2018; STROHMIDEL *et al.*, 2018; AJSUVAKOVA *et al.*, 2020).

Acerca disso, estudos realizados pelas agências americanas, EPA (*Environmental Protection Agency*) e ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*), disponibilizaram publicações que elencam as substâncias classificadas como perigosas, de acordo com a toxicidade associada, risco potencial à saúde e exposição humana e na lista prioritária dessas substâncias o mercúrio ocupa a terceira posição (ATSDR, 2017).

Nesta linha de abordagem, diferentes estudos foram realizados buscando-se investigar os efeitos causados pelo timerosal, composto organomercurial, empregado como conservante em diversos produtos. Ijaz *et al.* (2021), avaliaram a nefrotoxicidade induzida pelo timerosal (TH) em ratos machos e os resultados obtidos comprovaram, que além do TH possivelmente causar estresse oxidativo, adicionalmente reduz a atividade de enzimas antioxidantes, aumenta a inflamação renal e induz danos ao DNA. Silva *et al.* (2020) observaram efeitos adversos ocasionados pelo TH na hemoglobina, e como consequência o composto organomercúrico induziu a glicação da proteína em questão e houve formação de amiloide, o que pode facilitar a manifestação de distúrbios conformacionais, além de efeitos nocivos à saúde humana. Mais recentemente, Sales *et al.* (2022), constataram que o TH se liga a hemoglobina causando alterações conformacionais, culminando em efeitos nocivos relacionados ao transporte de oxigênio.

Por fim, outros estudos visaram entender o papel de compostos mercuriais em processos celulares. Lee *et al.* (1997), avaliaram a frequência de trocas de cromátides irmãs (TCI) para

monitorar possíveis efeitos genotóxicos em linfócitos humanos, causados por diferentes compostos de mercúrio, dentre eles o acetato de fenilmercúrio (FMA). Como resultado observou-se que o FMA comparado a outros compostos de mercúrio (HgCl_2 e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$), foi capaz de induzir um maior número dessas trocas, sendo observado do mesmo modo, uma menor taxa de proliferação celular, inclusive na presença de enzimas antioxidantes, a TCI não foi inibida, concluindo-se que esse evento causado pelo acetato de fenilmercúrio não foi ocasionado pela geração de espécies reativas. Adicionalmente, Amaral *et al.* (2020), confirmaram os efeitos tóxicos do FMA, utilizando como organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Neste sentido, torna-se uma questão de extrema importância, do ponto de vista de saúde pública, avaliar a utilização dos compostos de mercúrio em diferentes matrizes.

1.2 Aplicações de mercúrio e compostos de mercúrio

No controle de qualidade de produtos comercializados de forma geral, esforços oriundos de vários pesquisadores têm sido dedicados ao desenvolvimento de estratégias, tanto no âmbito teórico quanto no experimental, visando à melhoria dos processos industriais a fim de potencializar a seguridade do produto acabado, uma vez que, o conhecimento de efeitos indesejáveis e toxicidade desses insumos, ao nível de população, é bem limitado. O mercúrio e seus compostos têm sido empregados, em uma gama de produtos utilizados para vários objetivos comerciais. As principais aplicações incluem: conservante para madeira, extração de ouro, curtimento para couro, catalisador na fabricação de produtos químicos, como cloroetano e desinfetantes, lâmpadas fluorescentes, amálgamas dentárias, baterias, reagentes laboratoriais, dispositivos elétricos, feltagem, tintas, produtos farmacêuticos e cosméticos, são alguns exemplos (BROUSSARD *et al.*, 2002; EUROPEAN COMMISSION, 2017; HU *et al.*, 2018; GANGULY *et al.*, 2018; HSDB, 2019; IBAMA, 2021).

Essas aplicações fornecem um panorama da variação de exposição humana ao mercúrio e seus compostos. Em 2020, a produção mundial de mercúrio foi de 3700 toneladas e a China foi apontada como maior produtor (GARSIDE, 2021). Com relação aos produtos industrializados, com a expansão mundial e consumo crescente, principalmente nos países em desenvolvimento, é provável que essa demanda resulte em efeitos negativos para a saúde pública, se não for garantido um gerenciamento adequado dos produtos químicos, empregados no processo de fabricação (WHO, 2020). Dessa forma, se faz necessário um controle de qualidade mais abrangente das matérias-primas para minimizar essa problemática.

A organização mundial de saúde (WHO, 2018) fornece recomendações para o gerenciamento e aborda os riscos para 10 produtos ou grupos de produtos químicos, os quais

podem causar impactos de diferentes magnitudes para a saúde pública e o mercúrio está entre os dez principais produtos químicos, de grande preocupação referente aos aspectos supramencionados. Dentre esses produtos ou grupo de produtos químicos, além do mercúrio estão inseridos arsênio, chumbo, cádmio, benzeno, dioxina, amianto, poluentes atmosféricos, pesticidas perigosos e flúor em excesso.

Diante do exposto, vale ressaltar que as indústrias cosmética e farmacêutica utilizam nos processos industriais diversos conservantes, visando a obtenção de produtos com multifuncionalidades que ofereçam versatilidade nas suas aplicações e minimizem a contaminação por microrganismos. Neste contexto, destacam-se os conservantes que contêm mercúrio na sua composição, como o timerosal e sais de fenilmercúrio, os quais foram foco deste trabalho e serão abordados seguidamente em matrizes de vacinas e cosméticos micelares.

1.3 Timerosal em vacinas

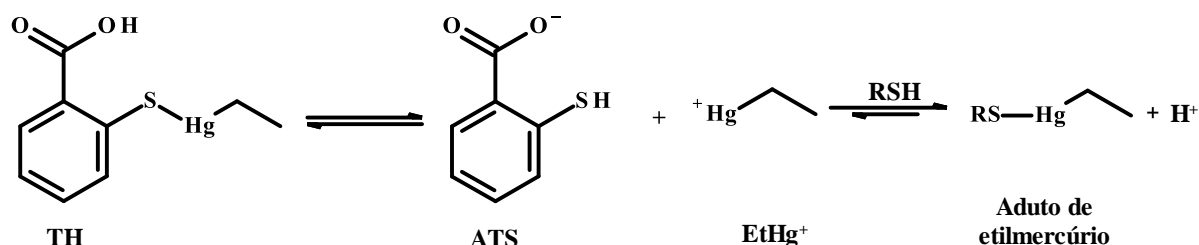
As vacinas são profiláticos empregados para prevenir, controlar e erradicar doenças infectocontagiosas. No processo de fabricação das vacinas, a contaminação por microrganismos deve ser inibida na linha de produção, durante o manuseio, transporte e aplicação da bioformulação, conseqüentemente, se faz necessário a adição de um conservante, frente a isso, algumas vacinas multidoses contêm o conservante timerosal (GEIER *et al.*, 2018; DÓREA, 2017). Em vacinas o timerosal é o conservante mais utilizado, seguido pelo fenoxietanol e fenol (KAUR *et al.*, 2021).

O timerosal é um composto organomercúrico, contendo 49,6% de mercúrio em massa, amplamente utilizado como conservante em formulações cosméticas, farmacêuticas, incluindo, removedores de maquiagem (demaquilante e água micelar), máscaras para cílios, dermocosméticos, cremes farmacêuticos tópicos, soluções oftalmológicas, nasais e antissépticas, e devido a sua atividade bactericida e antifúngica, tem sido amplamente empregado em vacinas (GEIER *et al.*, 2015; PÉREZ-CABALLERO *et al.*, 2016; QIN *et al.*, 2019; SANDOVAL *et al.*, 2019). Em vacinas o TH pode ser adicionado durante o processo de produção e/ou incorporado ao diluente da vacina liofilizada (BALL *et al.*, 2001).

Dentre as vacinas que utilizam timerosal em sua composição, alguns exemplos são: hepatite B, difteria, coqueluche e tétano, influenza e tríplice viral, onde a concentração relatada é da ordem de 25 µg de Hg por 0,5 mL (HURLEY *et al.*, 2010; GEIER *et al.*, 2016). No entanto, preocupações sobre a neurotoxicidade em crianças expostas ao TH, a partir das doses de vacinas administradas, foram levantadas por autoridades médicas ou governamentais, somente a partir de 1990, em decorrência aos possíveis efeitos adversos à longo prazo (ZAHIR, *et al.*, 2005;

BAKER, 2008). A eficácia da ação inibitória de microrganismos pelo conservante, bem como seus efeitos deletérios, estão associados aos seus produtos de degradação em meio aquoso (ácido tiosalicílico e etilmercúrio) (Figura 1) (ZIEMINSKA, *et al.*, 2010; TRÜMPLER, *et al.*, 2009; TRÜMPLER, *et al.*, 2014; GEIER *et al.*, 2015).

Figura 1 - Estrutura química do timerosal (TH) e produtos de degradação em meio aquoso, ácido tiosalicílico (ATS) e Etilmercúrio (EtHg⁺) e subsequente reação do EtHg⁺ com grupos tióis livres.



Fonte: Adaptado de KAUR *et al.*, 2021.

Desta forma, a presença do timerosal em vacinas pode levar a alterações estruturais e funcionais nos antígenos da bioformulação (CHEN *et al.*, 2019). Sendo, portanto, indiscutível que o potencial tóxico do (TH) é maior que qualquer outro componente presente na formulação da vacina e sua interação com a estrutura antigênica e propriedades protetoras das vacinas deve ser mínima (KHANDKE *et al.*, 2011).

Neste sentido, recomendações são sugeridas para identificar conservantes alternativos, embora que, precauções referentes à segurança não estejam tão difundidas, o entendimento da toxicidade dos organomercuriais é algo bem estabelecido, e o etilmercúrio não é uma exceção. Diante disso, alguns países da União Europeia e os Estados Unidos tiveram a iniciativa de reduzir ou substituir o timerosal em formulações multidoses ou eliminá-lo, utilizando formulações monodoses, visando minimizar os possíveis riscos potenciais (SYKES *et al.*, 2014; GEIER, *et al.*, 2018; HASEGAWA *et al.*, 2018). Atualmente, nos Estados Unidos, vacinas destinadas para crianças com idades inferiores a seis anos e em novas formulações monodoses o TH é ausente (FDA, 2020).

Embora a utilização de TH tenha sido minimizada em alguns produtos comercializados e inclusive removido de produtos farmacêuticos tópicos na maior parte do mundo, este conservante, ainda continua sendo empregado em vacinas, seguindo indicações da WHO, principalmente em países subdesenvolvidos, incluindo o Brasil (GEIER, *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2020). No entanto, vários estudos mostram uma relação do uso do TH associado a efeitos deletérios à saúde, principalmente em crianças e gestantes (CLEMENTS, 2004; MARQUES *et al.*, 2010; DÓREA, 2011; GEIER *et al.*, 2016; GEIER *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020) uma

vez que, estes são os grupos mais expostos devido ao número de vacinas administradas na fase pré-natal e nos primeiros anos de vida, fatores que *a priori*, contribuem significativamente para esta afirmação (BALL *et al.*; 2001; BAKER, 2008; DÓREA, 2017; DÓREA, 2018; HASEGAWA *et al.*, 2018).

Neste contexto, a literatura reporta efeitos toxicológicos e epidemiológicos deste conservante, logo, pesquisadores postularam que a exposição precoce ao mercúrio orgânico, aumenta significativamente o risco de distúrbios de desenvolvimento neurológico na infância e casos individuais de reações alérgicas agudas têm sido evidenciados (KERN *et al.*, 2013; HOLTKAMP *et al.*, 2013; SKALNY *et al.*, 2016; GEIER *et al.*, 2017; DÓREA, 2018; GEIER *et al.*, 2018). Em contrapartida ao reportado na literatura, a organização mundial de saúde descreve o etilmercúrio como uma espécie não nociva à saúde humana (WHO, 2017).

A relação dose-resposta deste conservante, referente a toxicidade ainda é incerta, assim da mesma forma que o metilmercúrio, o etilmercúrio tem sido foco de numerosos estudos (CLARKSON e MAGOS, 2006; GIBICAR *et al.*, 2007; LEOPOLD *et al.*, 2010; DÓREA *et al.*, 2013; DÓREA *et al.*, 2018). Todos os aspectos mencionados referentes ao timerosal, são questões que ainda estão em debates e é um tópico de controvérsia na comunidade científica (YEPESEN *et al.*, 2015; GOLDING *et al.*, 2018; KAUR *et al.*, 2021). Deste modo, desenvolver metodologias para determinação deste conservante em amostras de vacinas e cosméticos são essenciais para fins de controle de qualidade e regulamentação destes produtos.

1.4 Cosméticos: panorama geral

Os produtos de higiene pessoal, perfumes e cosméticos (HPPC), são definidos como preparações feitas a partir de substâncias naturais ou sintéticas, as quais são utilizadas externamente nas diversas partes do corpo humano, com a finalidade de limpá-las, perfumá-las, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-las ou mantê-las em bom estado (ANVISA, 2005). Esses produtos abrangem cinco categorias: cuidados com a pele, maquiagem, cuidados capilares, fragrâncias e higiene pessoal e essas categorias são classificadas em dois grupos: produtos grau 1 (demaquilante, loção tônica facial e máscara para cílios) e produtos grau 2 (clareador de pele, maquiagem com fotoprotetor e produto para pele acneica). Vale ressaltar, que os critérios para esta classificação são definidos principalmente, em função da probabilidade de decorrências indesejáveis, devido a utilização inadequada desses produtos, tipo de formulação, finalidades para uso e estão embasados em três aspectos principais: segurança, eficácia e qualidade. Atualmente estão comercialmente disponíveis 52 produtos grau 1 e 63 produtos grau 2 (ANVISA, 2015).

Nos últimos dez anos a indústria de produtos de HPPC teve um crescimento pujante, consequentemente o desenvolvimento de novas matérias-primas, elaboração de formulações inovadoras, foram indispensáveis para a modernização, dos padrões exigidos para o segmento destes produtos, sendo assim, o avanço tecnológico gerou a demanda de produtos específicos para a indústria cosmética (PINTO *et al.*, 2012; CASTRO *et al.*, 2017).

Dessa forma, pesquisas avançadas levaram à formulação de produtos de maquiagem resistentes à água, os quais possuem elevada capacidade de fixação, mesmo diante de variações climáticas e apresentam resistência ao suor e gorduras, deste modo, a permanência dos cosméticos na pele se tornou mais prolongada, não se fazendo necessário reaplicações (PARNSAMUT *et al.*, 2017). Essas características peculiares dos produtos de maquiagem, dificultam a higienização da pele e área dos olhos, portanto, cosméticos específicos para limpeza facial foram desenvolvidos, comumente definido como removedores de maquiagem (demaquilante e água micelar) (JUSTINO e LEITE, 2020; PARNSAMUT *et al.*, 2017). Conseqüentemente, diminuir custos de fabricação para atingir valores competitivos e variedades destes produtos, uma vez que, o preço é um fator importante para decisão de compra do consumidor, foi primordial para que as empresas acompanhassem a ascensão deste mercado (GARCILLÁN, 2008).

No segmento de HPPC, em 2017 o mercado mundial teve um aumento estimado em 5,5% em relação ao ano anterior, constatando-se a maior taxa de crescimento registrada desde 2007 e dentre as categorias dos produtos de HPPC, os produtos *skincare* lideraram o mercado, correspondendo aproximadamente a 36% do segmento mundial (ABIHPEC, 2018; EUROMONITOR, 2018; MENDONÇA, 2018). No Brasil, a categoria de produtos para cuidados com a pele teve um crescimento de vendas de 51% em 2020, quando comparada ao ano de 2015, fazendo com que o país ocupe a 8ª posição no ranking global (MENDONÇA, 2021).

Nesta conjuntura, o setor brasileiro de produtos de HPPC é um mercado potencial, apresentando crescimento a uma taxa média de 8,2% nos últimos 10 anos e a ascensão referente ao ano de 2017 foi de 3,2% (MENDONÇA, 2018). Em 2021 o setor de HPPC teve um aumento de 5,7% em vendas, quando comparado ao ano de 2020. Devido a essa tendência, estima-se que os produtos para cuidados com a pele, mantenham-se sendo a categoria mais lucrativa, com previsão de gerar cerca de 177 bilhões de dólares até 2025 (MENDONÇA, 2019; ABIHPEC, 2021; SABANOGLU, 2022). Outro aspecto a ser considerado é que atualmente o Brasil é o quarto maior mercador consumidor (Tabela 1), representando 4,9% do consumo mundial,

además, com relação a América Latina, corresponde a 14,1% das vendas mundiais de HPPC, liderando esse segmento. (EUROMONITOR, 2018; ABIHPEC, 2021)

Tabela 1 – Ranking dos dez países consumidores do setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.

Posição	País	U\$\$ bilhões	% Participação
1°	EUA	90,9	18,7
2°	China	73,3	15,5
3°	Japão	35,1	7,2
4°	Brasil	23,7	4,9
5°	Alemanha	19,3	4,0
6°	Reino Unido	16,1	3,3
7°	França	14,4	3,0
8°	Índia	14,1	2,9
9°	Coreia do Sul	12,6	2,6
10°	Itália	11,3	2,3

Fonte: ABIHPEC, 2021.

Neste contexto, desenvolver metodologias para o controle de qualidade de produtos cosméticos, visando avaliar a segurança do produto acabado, quanto a presença de substâncias potencialmente tóxicas é de suma importância, frente ao crescimento acentuado deste segmento e utilização diária destes produtos por milhões de pessoas.

1.5 Compostos potencialmente tóxicos em cosméticos

Na composição de produtos cosméticos as principais substâncias ou grupo de substâncias essenciais incluem: ingredientes ativos, excipientes, conservantes e aditivos (AZÍRON *et al.*, 2022). No desenvolvimento de formulações cosméticas, sistemas conservantes são empregados, com objetivo de garantir a qualidade e estabilidade do produto final, no tempo de uso estabelecido pelos fabricantes. Esses sistemas devem apresentar um amplo espectro de atividade e compatibilidade com os ingredientes da formulação, deste modo, aplicação de *blends* é a prática mais comum para esta finalidade (MAGALHÃES, 2011; MURPHY *et al.*, 2021). Os principais sistemas conservantes aplicados na produção de cosméticos, incluem álcoois e fenóis, ácidos orgânicos, aldeídos, isotiazolinonas, biguanidas, sais de amônio quaternário e derivados de substâncias potencialmente tóxicas, como por exemplo, os conservantes organomercuriais (LUNDOV *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2021).

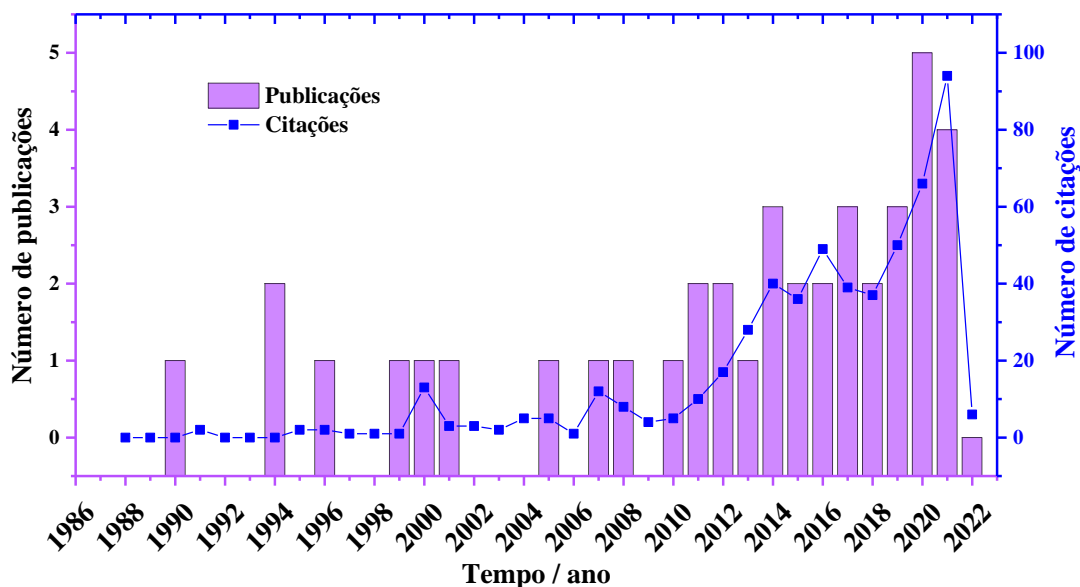
Neste contexto, diretrizes para utilização de conservantes em cosméticos, são definidas por meio de regulamentações específicas referentes a cada país, os quais elencam uma lista de

substâncias permitidas e suas respectivas recomendações. Mundialmente, em torno de sessenta e cinco países, preconizam níveis de concentrações entre 65 a 70 mg L⁻¹ associados a conservantes a base de mercúrio, para produtos cosméticos para área dos olhos (MICHALEK *et al.*, 2019).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2021), existe mais de 12 mil substâncias as quais podem ser empregadas em formulações cosméticas, sendo 60 pertencentes a classe dos conservantes, dentre estes, vale destacar os conservantes organomercuriais como timerosal e o fenilmercúrio e seus sais, os quais podem ser utilizados em cosméticos faciais (RDC nº 29/2012), com limite máximo permissível de 70 mg L⁻¹. Esses cosméticos englobam principalmente sombras para olhos, máscaras de cílios e removedores de maquiagem (demaquilantes/água micelar). Esses produtos são aplicados diretamente na pele, propiciando a exposição direta a toda composição química do produto e alguns tipos de reações adversas e problemas cutâneos, podem ser evidenciados, tais como irritação, alergias e efeito sistêmico (ANVISA, 2003; CHIARI *et al.*, 2012; DRAELOS, 2014; PEREIRA e PEREIRA, 2018).

Uma vez que, o aspecto toxicológico é um parâmetro relevante, associado a efeitos deletérios à saúde dos usuários dos produtos cosméticos, ampliou-se a preocupação por parte da comunidade científica, sobre os tipos de substâncias e níveis de concentrações presentes em formulações cosméticas, visto que, o desenvolvimento de pesquisas, as quais visam o controle e o monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas em matrizes cosméticas, ainda são reduzidas (LAVILLA *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2014). Realizando-se uma busca na base de dados ISI "Web of Science", com as palavras – chaves “*cosmetic and mercury*”, foram identificados 40 trabalhos indexados a partir de 1988 e 542 citações relacionadas a amostra e analito, foco deste trabalho (Figura 2).

Figura 2 - Número de publicações ao longo dos últimos 34 anos, referentes aos critérios na plataforma ISI.



Fonte: Autora, 2021.

O crescente número de estudos e publicações, sobre o uso do mercúrio e suas consequências para a saúde pública, proporcionou diversos avanços. Analisando a Figura 2, pode-se observar uma correlação entre o número publicações e o surgimento de normas e leis que regulamentam a sua utilização na indústria de cosméticos. Em 1993, a Comissão Europeia (EC n° 1539/1993) reconheceu a necessidade de promover a rotulagem de ingredientes cosméticos na União Europeia e implementou a nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI), a qual foi reconhecida e adotada mundialmente. Posteriormente, alguns questionamentos a respeito de produtos contendo mercúrio, suscitaram preocupações sobre os possíveis efeitos deletérios a curto e a longo prazo na saúde humana, assim a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), emitiu um comunicado admitindo que produtos contendo mercúrio podem ser perigosos para saúde humana. Outros acontecimentos notáveis, que podem estar relacionados ao número publicações no período entre 2017 e 2021 foram: a publicação da nota toxicológica sobre mercúrio adicionado para clareamento de pele pela organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, 2017), a qual recomendou a implementação e aplicação de regulamentos apropriados, para estes fins. Adicionalmente a convenção de Minamata (2017) e os planos de ações multissetoriais, para redução dos impactos na saúde a partir do uso de mercúrio, dessa forma, foi sugerido a eliminação gradual da adição de mercúrio em produtos industrializados, incluindo termômetros, antissépticos e cosméticos. Por fim, o número de trabalhos publicados e citações realizadas podem estar associados as implementações de algumas legislações reguladoras para os produtos cosméticos FDA (1944), BfR (2006), EUROPEAN COMMISSION (2009), Health (2012), ANVISA (2012) e respectivas

atualizações dessas normativas, ademais o contexto pandêmico, possivelmente propiciou aumento significativo das publicações nas bases de dados científicas referentes aos anos de 2020 e 2021.

Nesta conjuntura, é notável que a utilização de alguns metais/não-metais de forma deliberada ou não intencional em formulações cosméticas, se configura em um fator preocupante, tendo em vista que, mercúrio, arsênio, chumbo, e cádmio são considerados tóxicos, mesmo em concentrações a nível traço (ARSHAD *et al.*, 2020; MESKO, *et al.*, 2020; ALMAYAH *et al.*, 2021), conseqüentemente o uso destes produtos, contribui fortemente para a exposição da população. Além disso, deve-se considerar que os níveis máximos estabelecidos, para diferentes agências reguladoras tendem a divergir, dificultando no consenso global do que é permitido, em termos de concentrações para substâncias potencialmente tóxicas (SAADATZADEH *et al.*, 2019).

As diretrizes da FDA dos Estados Unidos (U.S. *Food and Drug Administration*, CRF 21/ Parte 700) estabelecem limites permissíveis para o mercúrio como conservante, empregado para cosmético para área dos olhos de 65 ppm (mg L^{-1} ou mg Kg^{-1}) e 1 ppm para impurezas no produto acabado, além disso, para aditivos de cor os níveis máximos aceitáveis são: 1; 3; 15 e 20 mg Kg^{-1} para Hg, As, Cd e Pb, respectivamente. As preconizações referentes a normativa da União Europeia (EC n° 1223/2009) para cosméticos para área dos olhos, permitem concentrações para conservantes mercuriais (TH e fenilmercúrio e seus sais) de 70 ppm, entretanto, proíbe concentrações como impurezas decorrentes do processo de fabricação ou matéria-prima para o Hg e demais elementos supramencionados. As regulamentações do Canadá e Alemanha, determinam concentrações apenas para impurezas no produto final. Para o Canadá (Health, 2012), os limites definidos são: Hg 1 mg Kg^{-1} ; As 3 mg Kg^{-1} ; Cd 3 mg Kg^{-1} e Pb 10 mg Kg^{-1} e para Alemanha (BFR 025/2006), Hg 1 mg Kg^{-1} ; As 5 mg Kg^{-1} ; Cd 5 mg Kg^{-1} e Pb 20 mg Kg^{-1} .

No Brasil, analogamente, os parâmetros normativos da ANVISA baseados nas resoluções da diretoria colegiada (RDC), preconizadas para limites permissíveis relativos à presença de metais/não-metais em HPPC, são amplas e confusas, conseqüentemente podem também, formalizar interpretações imprecisas e comprometer a segurança dos produtos comercializados. A RDC n°48/2006, estabelece a proibição da utilização de compostos de As, Cd, e Pb como matéria-prima para fabricação de produtos de HPPC, contudo, a RDC n° 44/2012, incorpora limites permissíveis para impurezas desses elementos para corantes, não podendo ser superiores a 3 ppm para o arsênio (expresso como As_2O_3), 20 ppm para o chumbo (expresso como Pb total) e 100 ppm para outros metais. De forma geral, as incongruências entre

as legislações para metais/não-metais nos produtos acabados e matérias-primas podem resultar em erros, como também dificultar a interpretação das normativas pelos fabricantes (MESKO *et al.*, 2020).

Recentemente, RDC nº 29/2012 foi revogada e a legislação vigente para a lista de conservantes permitidas para HPPC foi atualizada (RDC nº 528/2021). Na nova RDC, internalizada pela resolução do grupo de mercado comum (MERCOSUL nº 35/20), os conservantes organomercuriais foram excluídos e a reformulação estabeleceu um prazo de 36 (trinta e seis) meses para adequação dos produtos comercializados, no entanto, as normativas preconizadas pela EC e FDA para esses conservantes, ainda estão em vigência.

Neste âmbito, deve-se considerar a necessidade de maior rigor, quanto ao controle de qualidade dos diferentes produtos no mercado, na perspectiva de serem ofertados produtos com maior segurança para a saúde do consumidor de maneira geral e avaliar se os produtos disponíveis, estão em consonância com os parâmetros normativos vigentes. Assim, o desenvolvimento de metodologias para determinação de substâncias potencialmente tóxicas de baixo custo, rápidas e sensíveis, são fundamentais para o controle de qualidade eficaz de produtos cosméticos.

1.6 Metodologias para determinação de mercúrio total em vacinas e cosméticos

Para o desenvolvimento efetivo das estratégias de preparo de amostra, os principais parâmetros avaliados são embasados no tipo de analito, matriz da amostra e técnica de detecção. Para determinação de mercúrio total em diferentes matrizes, o estabelecimento de um protocolo analítico adequado de preparo da amostra é uma etapa fundamental, devido à volatilidade e complexidade do analito e representa em torno de 60 a 80% do tempo empregado nas etapas operacionais (ARAÚJO, 2009; GAO *et al.*, 2012; KRUG e ROCHA 2019). Além disso, na determinação de mercúrio total, o analito deve ser convertido em uma forma compatível para análise instrumental, deste modo, a aplicação de procedimentos de preparo de amostra, para decomposição dos compostos orgânicos presentes na matriz, se faz essencial.

Em amostras de vacinas e cosméticos, as alternativas de preparo de amostras comumente empregadas englobam, a degradação fotoquímica, digestão convencional (aquecimento condutivo) e/ou assistida por micro-ondas com uso de ácidos concentrados (LAZO e KUCUKU, 2012; MESKO *et al.*, 2020; PEDROZO-PENAFIEL *et al.*, 2020; PAPADOPOULOS *et al.*, 2022). A decomposição por via úmida em sistemas abertos, pode ser realizada com aquecimento condutivo (blocos digestores) ou radiação micro-ondas,

empregando ácidos minerais concentrados (HNO_3 , H_2SO_4 e HClO_4), misturas de ácidos concentrados (HNO_3 - H_2SO_4 ; HNO_3 - HClO_4 ; HNO_3 - HCl) ou mistura de um ácido oxidante com oxidante auxiliar para decomposição (peróxido de hidrogênio) (KINGSTON e HASWEL,1997; ORESTE *et al.*, 2013).

Os sistemas abertos possibilitam a decomposição de quantidades (massas/volumes) elevadas da amostra, que os reagentes possam ser inseridos no meio reacional durante o procedimento e a alta frequência analítica. Entretanto, nestes sistemas a decomposição pode ser mais lenta em decorrência da aplicação de temperaturas menos elevadas e com isso tempos mais prolongados são requeridos, além disso, são passíveis de ocorrer perdas de analitos voláteis e contaminações na solução resultante da decomposição (MATUSIEWICZ e STANISZ, 2010; FLORES, 2014; KRUG e ROCHA, 2019). Assim, as principais limitações referem-se à eficiência de digestão, acidez residual e valores dos brancos analíticos (FLORES, 2014). Cabe ressaltar que, para aplicações analíticas visando a determinação de mercúrio total, os sistemas fechados são preferencialmente utilizados (FERREIRA *et al.*, 2013; BARBOSA, *et al.*, 2015; YÁNEZ-JÁCOME *et al.*, 2020).

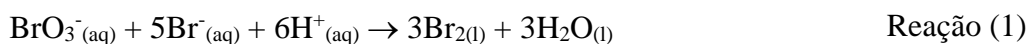
O preparo de amostra em sistemas fechados com aquecimento condutivo, minimizam as perdas de analitos por volatilização, reduzem as contaminações nos digeridos e apresentam maior eficiência de decomposição (menores valores de carbono residual), quando comparados aos sistemas abertos (KRUG e ROCHA, 2019; KINGSTON e HASWEL,1997). Contudo, para matrizes mais complexas como cosméticos e vacinas, observa-se que os sistemas fechados assistidos por micro-ondas, são os mais empregados (PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

A digestão em sistemas fechados assistidos por radiação micro-ondas, é uma alternativa bastante apreciável, à medida que fornece segurança operacional e rapidez (KORN *et al.*, 2008). Esses sistemas utilizam altas temperaturas e pressões, o que proporciona tempos de aquecimento mais reduzidos em comparação aos sistemas com aquecimento condutivo, sendo também considerada uma alternativa mais sustentável (PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020; JOFRE *et al.*, 2021). A irradiação pelas micro-ondas promove um aquecimento rápido e eficiente das amostras, o que acelera a decomposição destas sem promover mudanças em sua estrutura molecular, visto que se trata de uma radiação não-ionizante. Sob irradiação pelas micro-ondas, o aquecimento do meio reacional ocorre em decorrência da interação da radiação eletromagnética com as moléculas polares do solvente e com os íons presentes em solução. Essa interação resulta na movimentação das espécies em solução (fenômenos de migração iônica e rotação dipolo) dadas as oscilações no campo elétrico da radiação. (ARRUDA e SANTELLI, 1997; KRUG e ROCHA, 2019).

A aplicação da digestão por micro-ondas em amostras de cosméticos foi empregada por Alquadami *et al.* (2017), os autores realizaram a determinação de As, Bi, Cd, Hg, Pb e Ti em amostras de cremes clareadores e a digestão completa das amostras foi alcançada utilizando uma mistura de $\text{HNO}_3/\text{HF}/\text{H}_2\text{O}_2$. Liu *et al.* (2013), empregaram a digestão assistida por micro-ondas com a finalidade de determinação mercúrio total em cosméticos, e a digestão completa foi obtida utilizando-se $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ no procedimento. Similarmente, Gámiz-Garcia e Castro (1999) avaliaram a concentração de mercúrio total em amostras de delineadores, lápis e sombras para os olhos, empregando para o preparo de amostra a digestão por micro-ondas, utilizando uma mistura de ácidos e oxidante auxiliar ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$).

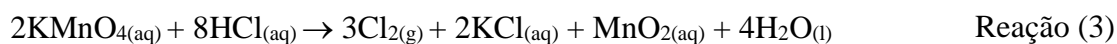
Para amostras de vacinas, Oliveira *et al.* (2021) e Tall *et al.* (2021), utilizaram a digestão assistida por micro-ondas como estratégia de preparo de amostras (método de referência), empregando ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) para determinação de Hg_{total} e para ambos os estudos o procedimento adotado, possibilitou conversões efetivas do composto organomercurial (TH) para Hg(II). Analogamente Malkuci e Lazo (2014), empregaram o sistema de digestão assistida por micro-ondas utilizando ($\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$) para determinação de Hg_{total} em vacinas, e a estratégia utilizada propiciou a análise quantitativa do analito. Embora, os sistemas de digestão assistida por micro-ondas, proporcionem a decomposição das matrizes supramencionadas, para esta estratégia analítica, geralmente é necessário o uso de ácidos concentrados, levando a maior geração de resíduos, além de elevada acidez residual (NÓBREGA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2019; SAVIO *et al.*, 2019).

Neste sentido, a utilização de ácidos diluídos combinado com diferentes oxidantes (KBrO_3 , KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, BrCl) têm sido foco de alguns estudos, apresentando-se como uma abordagem eficaz para decomposição de compostos organomercuriais em diferentes matrizes (FAREY, *et al.*, 1978; TORRES *et al.*, 2009; LEOPOLD, *et al.*, 2012; MARANHÃO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2020). Dessa forma, visando simplificar o preparo de amostra para determinação de TH (como Hg_{total}) em amostras de vacinas, aplicou-se a decomposição direta com diferentes sistemas complexantes e/ou oxidantes (KBr/KBrO_3 , KI/KIO_3 , KMnO_4 e $\text{KMnO}_4/\text{Na}_2\text{S}$) em meio ácido diluído (HCl ou HNO_3). A estratégia foi desenvolvida, considerando o equilíbrio do TH em meio aquoso (Figura 1), originando etilmercúrio no meio reacional, o qual pode ser convertido a mercúrio inorgânico, conforme as reações de bromação (1) e (2):



Para esta sequência de reações, ocorre previamente a oxidação do íon brometo pelo íon bromato, com formação de bromo (reação 1). Posteriormente, a clivagem da ligação do composto orgânico de mercúrio ocorre a temperatura ambiente, em seguida, o mercúrio inorgânico forma um complexo estável com o halogênio (reação 2) (CORNS *et al.*, 1994; GOMES, 2010). Desta maneira, a eficiência de oxidação do composto orgânico de mercúrio, depende essencialmente da concentração do íon brometo no meio de reação (ZHENG *et al.*, 2019), além do tempo reacional aplicado no procedimento.

Para a decomposição direta utilizando o KMnO_4 , as reações do agente oxidante em meio ácido, são representadas a seguir:



Verifica-se que analogamente as etapas da reação de bromação, quando se emprega o KMnO_4 a ruptura da ligação química ocorre devido a formação do cloro gasoso e subsequentemente, a formação do complexo com o halogênio (LENOV, *et al.*, 2006; TAFFAREL e RUBIO, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2016; LUTHER, *et al.*, 2018). É importante destacar, que os compostos formados durante a decomposição dos agentes oxidantes no meio reacional, são os responsáveis pela clivagem da ligação química no composto organomercurial, conforme observado nas reações esquemáticas genéricas (1), (2) (3) e (4). Por fim, após disponibilização do $\text{Hg}(\text{II})$ no meio, ocorre a formação do analito gasoso (Hg^0), a partir da redução pelo SnCl_2 em meio ácido e posteriormente as determinações do Hg_{total} por espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (CV AFS) de forma rápida, sensível, precisa, simples e com baixa geração de resíduos. O desenvolvimento e abordagem desta estratégia aplicada em amostras de vacinas será enfatizado no capítulo 2.

Com relação aos demaquilantes e águas micelares, designados neste trabalho como cosméticos micelares, uma alternativa ao uso da digestão assistida por micro-ondas no preparo de amostras desses produtos, é a utilização de oxidantes com auxílio de antiespumantes. Os agentes antiespumantes são formulações à base de água, óleo, silicone ou mistura de ambos, as quais podem reduzir a tensão superficial da solução (GARRETT, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2007), além de controlar ou suprimir a espuma que pode ser originada devido à presença de

surfactantes ou outros compostos na amostra (JUNKER, 2008; REZENDE *et al.*, 2011; PORTO e CUNHA, 2020). Isto é crucial para minimizar o efeito de matriz durante a geração do vapor de químico, uma vez que, as espumas formadas podem ocasionar a retenção parcial e/ou total do analito na matriz, resultando em recuperações não quantitativas, como também, propiciar variabilidade do sinal analítico (LI *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2019). Com a aplicação de antiespumantes no meio reacional, é possível realizar a decomposição direta na amostra sem necessidade de sistemas micro-ondas. Neste sentido, aplicações de antiespumantes no preparo de amostra têm sido abordadas para diferentes matrizes:

Cava-Montesinos *et al.* (2004), desenvolveram um procedimento analítico de amostragem em suspensão para determinação de Hg_{total} em amostras de leite por CV AFS. Para o preparo da amostra, foi adicionada água régia 8% (v/v) e empregada sonicação por 10 min em banho-maria com ultrassom. Após sonicação, antiespumante A 2% (v/v), solução de cloridrato de hidroxilamina 1% (m/v), reagente de bromação ($KBr-KBrO_3$ /0,1 - 0,02 mol L⁻¹) em meio ácido clorídrico foram adicionados. Os resultados obtidos pelo procedimento desenvolvido, foram concordantes com a digestão assistida por micro-ondas. Rodrigues *et al.* (2009), determinaram Hg_{total} em amostras de sangue por CV AAS e no procedimento experimental, as amostras foram diluídas em HCl 1,0 molL⁻¹, no meio reacional foi adicionado 50µL do antiespumante B, seguidamente e 150 µL de $KMnO_4$ 2,0% (m/v) e um tempo de 2 minutos foi aplicado para decomposição das amostras. Em ambos os estudos, a adição de antiespumantes foi eficaz na supressão de espumas. Assim, a decomposição direta com auxílio de antiespumante, apresenta-se como alternativa promissora para o preparo de amostra de cosméticos micelares e será explorada no Capítulo 3. É relevante destacar que, diferentemente das matrizes supramencionadas, a literatura não reporta a utilização e avaliação diferentes antiespumantes associados aos procedimentos de preparo de amostra, para água micelar e demaquilante, portanto, a metodologia desenvolvida neste trabalho destaca-se pela inovação nesta área.

Por fim, as abordagens distintas de preparo amostra desenvolvidas neste trabalho, são fundamentais para o controle de qualidade eficaz de vacinas e cosméticos, minimizando o risco de perda do analito e potencializando o rendimento da frequência analítica e podem ser aplicadas em diferentes técnicas espectrométricas atômicas (CV AAS, CV AFS, HG AAS, HG AFS, ICP-MS) (CAVA-MONTESINOS *et al.*, 2004, ARANDA *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2016., ZHENG *et al.*, 2019; TALL *et al.*, 2021).

1.7 Justificativa do estudo e objetivos gerais

Os insumos farmacêuticos e biológicos fazem parte da rotina de milhões de pessoas, incluindo-se adultos e crianças e devido a utilização de conservantes a base de mercúrio, nas formulações desses produtos, estes são considerados uma fonte de exposição á espécies potencialmente tóxicas. Desta forma, a importância da determinação de mercúrio total em vacinas e cosméticos micelares está associada à sua elevada toxicidade e efeito biocumulativo, quando presente em concentrações iguais ou inferiores aos valores preconizados nas legislações vigentes. Neste sentido, diante deste cenário, ter um produto no mercado, o qual pode causar diversos efeitos deletérios de diferentes magnitudes, torna-se um problema de saúde pública e se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas para avaliação da segurança e eficácia.

Adicionalmente, o presente trabalho, fornecerá subsídios para estudos epidemiológicos e toxicológicos, voltados para gestantes e crianças, principalmente em países em desenvolvimento, nos quais a utilização de conservantes a base de mercúrio é mais recorrente. Ademais, referente a aplicabilidade, à exploração de novas estratégias analíticas para determinação de mercúrio em níveis traço é de suma importância, para ações de caráter preventivo e corretivo por parte dos órgãos reguladores, nas matrizes avaliadas e em matrizes mais complexas. Neste contexto, desenvolver protocolos para o controle de qualidade de vacinas e cosméticos micelares, que sejam rápidos, de baixo custo, sensíveis e de acordo com os parâmetros ecológicos da química analítica é o diferencial do método proposto. Complementarmente a utilização de ácidos diluídos, a metodologia é inovadora, quando comparada aos estudos reportados na literatura e utilização de antiespumantes. Neste trabalho para decomposição direta, foi avaliado o efeito da desestabilização de espumas por diferentes antiespumantes em níveis distintos de concentrações, acerca disso, a literatura não aborda maiores detalhes nos procedimentos analíticos, adotados frente a estes estudos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como principal objetivo, desenvolver métodos analíticos, empregando diferentes estratégias de preparo de amostras em matrizes de vacinas e cosméticos micelares para determinação de Hg_{total} por CV AFS.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos., 2021. Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos apresenta crescimento de 5,7% no primeiro quadrimestre de 2021. Disponível em: < <https://abihpec.org.br/comunicado/setor-de-higiene-pessoal-perfumaria-e-cosmeticos-apresenta-crescimento-de-57-no-primeiro-quadrimestre-de-2021/> >. Acesso em: 21 de julho de 2021.

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Panorama do Setor 2018. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>>. Acesso em: 10 de agosto de 2018.

AJSUVAKOVA, O. P. *et al.* Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 417, p. 213343, 2020.

ALEMANHA BfR. BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG. Kosmetische Mittel: BfR empfiehlt Schwermetallgehalte über Reinheitsanforderungen der Ausgangsstoffe zu regeln, Stellungnahme n°. 025, de 5 de abril de 2006. Disponível em: http://www.bfr.bund.de/cm/343/kosmetische_mittel_bfr_empfiehl_schwermetallgehalte_ueber.pdf. Acesso em: 21 de julho de 2020

ALMAYAH, B. A. Alpha particle rates and heavy metal concentrations in cosmetics available in the Najaf markets. **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07067, 2021.

AMARAL, L. DE O.; LIMA, V. S.; SOARES, S. M.; BORNHORST, J.; LEMOS, S. S.; GATTO, C. C.; BURROW, R. A.; GUBERT, P. Synthesis, structural characterization and evaluation of the chelating potential in *C. elegans* involving complexes of mercury (II) with Schiff bases derived from amino acids. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 926, p. 121500, 2020.

ALMEIDA, I. L. S.; OLIVEIRA, M. D. R.; SILVA, J. B. B.; COELHO, N. M. M. Suitable extraction of soils and sediments for mercury species and determination combined with the cold vapor generation atomic absorption spectrometry technique. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 326–330, 2016.

ARANDA, P. R.; GIL, R. A.; MOYANO, S.; VITO, I. DE; MARTINEZ, L. D. Slurry sampling in serum blood for mercury determination by CV-AFS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2–3, p. 1399–1403, 2009.

ARSHAD, H.; MEHMOOD, M. Z.; SHAH, M. H.; ABBASI, A. M. Evaluation of heavy metals in cosmetic products and their health risk assessment. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 7, p. 779–790, 2020.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. MECANIZAÇÃO NO PREPARO DE AMOSTRAS POR MICROONDAS: O ESTADO DA ARTE. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 599–611, 1997.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **ATSDR’s Substance Priority List**. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/SPL/#2017spl>. Acesso em: 10 de dez. 2017.

AZORÍN, C.; BENEDÉ, J. L.; CHISVERT, A.; SALVADOR, A. Green, rapid and simultaneous determination of 'alternative preservatives' in cosmetic formulations by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 209, p. 114493, 2022.

BAKER, J. P. Mercury, vaccines, and autism: One controversy, three histories. **American Journal of Public Health**, v. 98, n. 2, p. 244–253, 2008.

BALL, L. K.; BALL, R.; PRATT, R. D. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. 1147–1154, 2001.

BARBOSA, J. T.P; SANTOS, C. M.M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E.M.M.; KORN.M.; NÓBREGA, J.A.; KORN, M.G.A. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. **Food Chemistry**, v. 175, p. 212–217, 2015.

BERLIN, M.; ZALUPS, R. K.; FOWLER, B. A. Mercury. *In*: NORDBERG, G.; FOWLER, B.; NORDBERG, M. (Ed.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. 4. ed. Elsevier, 2015. Chapter 46, p. 1013-1075.

BERNHOF, Robin A. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2012, 10 p., 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 29 de 01/06/2012. Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes" e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: DF, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos**, Brasília: DF, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005. Estabelece a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, conforme Anexo I e II desta Resolução e dá outras definições. **Diário Oficial da União**, Brasília: DF, 2005.

BROUSSARD, L. A.; HAMMETT-STABLER, C. A.; WINECKER, R. E. The toxicology of Mercury. **Laboratory Medicine**, v. 33, n. 8, 2002.

CARRASCO, L.; DÍEZ, S.; BAYONA, J. M. Simultaneous determination of methyl- and ethyl-mercury by solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 51, p. 8828–8834, 2009.

CASTRO, M. J.; SILVA, M. A. C. G.; MENESES, T. S. C.; TEIXIERA, K. M.; SANTOS, J. A. B. Propriedade intelectual, tecnologias e empreendedorismo. *In*: **Panorama da Proteção de Patentes do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos via Dados do INPI e Espacenet**. Aracaju: Associação Acadêmica de Propriedade Intelectual, p. 297 – 309, 2017.

CAVA-MONTESINOS, P.; RÓDENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, Á.; CERVERA, M. L.; LA GUARDIA, M. DE. Cold vapour atomic fluorescence determination

of mercury in milk by slurry sampling using multicommutation. **Analytica Chimica Acta**, v. 506, n. 2, p. 145–153, 2004.

CHEN, S.; HUANG, X.; LI, Y.; WANG, X.; PAN, H.; LIN, Z.; ZHENG, Q.; LI, S.; ZHANG, J.; XIA, N.; ZHAO, Q. Altered antigenicity and immunogenicity of human papillomavirus virus-like particles in the presence of thimerosal. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 141, p. 221–231, 2019.

CHIARI, B. G.; MAGNANI, C.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Estudo da segurança de cosméticos: Presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323–330, 2012.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 609–662, 2006.

CLEMENTS, C. J. The evidence for the safety of thiomersal in newborn and infant vaccines. **Vaccine**, v. 22, n. 15–16, p. 1854–1861, 2004.

CUNHA, G. K.; MATOS, M. B. DE; TRETTIM, J. P.; RUBIN, B. B.; AVILA QUEVEDO, L. DE; PINHEIRO, K. A. T.; CUNHA COELHO, F. M. DA; PINHEIRO, R. T. Thimerosal-containing vaccines and deficit in child development: Population-based study in southern Brazil. **Vaccine**, v. 38, n. 9, p. 2216–2220, 2020.

DÓREA, J. G. Low-dose Thimerosal (ethyl-mercury) is still used in infants' vaccines: Should we be concerned with this form of exposure? **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 49, n. May, p. 134–139, 2018.

DÓREA, J. G. Low-dose Thimerosal in pediatric vaccines: Adverse effects in perspective. **Environmental Research**, v. 152, p. 280–293, 2017.

DÓREA, J. G.; BEZERRA, V. L. V. A.; FAJON, V.; HORVAT, M. Speciation of methyl- and ethyl-mercury in hair of breastfed infants acutely exposed to thimerosal-containing vaccines. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 17–18, p. 1563–1566, 2011.

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. **Journal of Applied Toxicology**, v.33, p. 700–711, 2013.

DRAELOS, Z. D. Facial skin care products and cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 809–812, 2014.

EKINCI, M.; CEYLAN, E.; KELEŞ, S.; ÇAĞATAY, H. H.; APIL, A.; TANYILDIZ, B.; ULUDAG, G. Toxic effects of chronic mercury exposure on the retinal nerve fiber layer and macular and choroidal thickness in industrial mercury battery workers. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 1284–1290, 2014.

EPA - Environmental Protection Agency. **Health Effects of Exposures to Mercury**. NY: 2021c. Disponível em: <[Efeitos da saúde das exposições ao mercúrio | EPA dos EUA](#)>. Acesso em: 18 de novembro de 2018.

EUROPEAN COMMISSION. **Tackling mercury pollution in the EU and worldwide. Science for Environment Policy Executive summary. In-depth Report 15 produced for the European Commission**, DG Environment by the Science Communication Unit, UWE, Bristol, 2017.

EUROPEAN UNION. Cosmetic products should be safe under normal or reasonably foreseeable conditions of use. In particular, a risk-benefit reasoning should not justify a risk to human health. (4). **Official Journal of the European Union**, n. 1223, 2009.

EUROMONITOR. Disponível em: <https://www.euromonitor.com/colour-cosmetics-in-germany/report>. Acesso em: 10 jun. 2018.

FERREIRA, S.L.C.; SILVA, L. O.B.; SANTANA, F.A.; JUNIOR, M.M.S.; MATOS, G.D.; DOS SANTOS, W.N.L A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307–310, 2013.

FDA - Food and Drug Administration. **Thimerosal and Vaccines**. 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/thimerosal-and-vaccines/>>. Acesso em: 06 de jun. 2020.

FDA - Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations: Regulations for the Enforcement Of the Federal Food, Drug, And Cosmetic Act, 21 C.F.R. (1944)**. Disponível em: <<https://www.loc.gov/item/cfr1945003-T21CIP2/>>. Acesso em: 9 jul. 2021.

FLORES, E. M. M. (Org.). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. AMSTERDAM: ELSEVIER HEALTH SCIENCES, 2014. 416 p.

GAJDOSECHOVA, Z.; MESTER, Z.; FELDMANN, J.; KRUPP, E. M. The role of selenium in mercury toxicity – Current analytical techniques and future trends in analysis of selenium and mercury interactions in biological matrices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 104, p. 95–109, 2018.

GÁMIZ-GRACIA, L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Determination of mercury in cosmetics by flow injection-cold vapour generation-atomic fluorescence spectrometry with on-line preconcentration. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 14, n. 10, p. 1615–1617, 1999.

GANGULY, M.; DIB, S.; ARIYA, P. A. Fast, Cost-effective and Energy Efficient Mercury Removal-Recycling Technology. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

GAO, Y.; SHI, Z.; ZONG, Q.; WU, P.; SU, J.; LIU, R. Direct determination of mercury in cosmetic samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry after dissolution with formic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 812, p. 6–11, 2014.

GARSDALE, M. Produção global de mercúrio por país 2020. **STATISTA**, 2021. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/1005602/global-mercury-production-by-country/#:~:text=China%20was%20the%20world's%20largest,Tajikistan%20during%20the%20same%20year>>. Acesso em: 13 de junho de 2021.

GARCILLÁN, M. **Marketing para cosméticos: uma abordagem internacional**. São Paulo: Thomson Learning, 2008.

GARRETT, P. R. Defoaming: Antifoams and mechanical methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 20, n. 2, p. 81–91, 2015.

GAUTAM, P. K.; GAUTAM, R. K.; BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAYA, M. C.; PANDEY, J. D. Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques. *In: Heavy Metals in the Environment: Fate, Transport, Toxicity and Remediation Technologies*. USA: Nova Science Publishers, 2016.

GEIER, D. A.; KERN, J. K.; HOMME, K. G.; GEIER, M. R. The risk of neurodevelopmental disorders following Thimerosal-containing Hib vaccine in comparison to Thimerosal-free Hib vaccine administered from 1995 to 1999 in the United States. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 221, n. 4, p. 677–683, 2018.

GEIER, D. A.; KERN, J. K.; GEIER, M. R. Increased risk for an atypical autism diagnosis following Thimerosal-containing vaccine exposure in the United States: A prospective longitudinal case-control study in the Vaccine Safety Datalink. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 42, p. 18–24, 2017.

GEIER, D. A.; KERN, J. K.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R.; HOOKER, B. S.; KING, P. G. A longitudinal cohort study of the relationship between Thimerosal-containing hepatitis B vaccination and specific delays in development in the United States: Assessment of attributable risk and lifetime care costs. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 6, n. 2, p. 105–118, 2016.

GEIER, D. A.; KING, P. G.; HOOKER, B. S.; DÓREA, J. G.; KERN, J. K.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R. Thimerosal: Clinical, epidemiologic and biochemical studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 212–220, 2015.

GENCHI, G.; SINICROPI, M. S.; CAROCCI, A.; LAURIA, G.; CATALANO, A. Mercury exposure and heart diseases. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2017.

GIBIČAR, D.; LOGAR, M.; HORVAT, N.; MARN-PERNAT, A.; PONIKVAR, R.; HORVAT, M. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra(n-propyl) borate as derivatizing agent. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 2, p. 329–340, 2007.

GOLDING, J.; RAI, D.; GREGORY, S.; ELLIS, G.; EMOND, A.; ILES-CAVEN, Y.; HIBBELN, J.; TAYLOR, C. Prenatal mercury exposure and features of autism: A prospective population study. **Molecular Autism**, v. 9, n. 1, 2018.

GOMES, M.J.F. **Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados à química forense e alimentos**. 2010. 156 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

GONZALEZ-RAYMAT, H.; LIU, G.; LIRIANO, C.; LI, Y.; YIN, Y.; SHI, J.; JIANG, G.; CAI, Y. Elemental mercury: Its unique properties affect its behavior and fate in the environment. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 69–86, 2017.

HASEGAWA, Y.; CURTIS, B.; YUTUC, V.; RULIEN, M.; MORRISROE, K.; WATKINS, K.; FERRIER, C.; ENGLISH, C.; HEWITSON, L.; SLUPSKY, C. M. Microbial structure and function in infant and juvenile rhesus macaques are primarily affected by age, not vaccination status. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

HEALTH CANADA. **Guidance on Heavy Metal Impurities in Cosmetics**. v. 632, p. 2012, 2012.

HOLTKAMP, M.; ELSEBERG, T.; WEHE, C. A.; SPERLING, M.; KARST, U. Complexation and oxidation strategies for improved TXRF determination of mercury in vaccines. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 719–723, 2013.

HSDB - Hazardous Substances Data Bank. Mercury. Disponível em: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2>. Acesso em: 22 jan. 2019.

HU, Y.; CHENG, H.; TAO, S. The growing importance of waste-to-energy (WTE) incineration in China's anthropogenic mercury emissions: Emission inventories and reduction strategies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, n. April, p. 119–137, 2018.

HURLEY, A. M.; TADROUS, M.; MILLER, E. S. Thimerosal-containing vaccines and autism: a review of recent epidemiologic studies. **The journal of pediatric pharmacology and therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 173–181, 2010.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Mercúrio metálico. Brasília, DF: 2021. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/mercurio-metalico/sobre-o-mercurio-metalico> >. Acesso em: 22 out. 2021.

IJAZ, M. U. *et al.* Toxicological effects of thimerosal on rat kidney: a histological and biochemical study. **Brazilian journal of biology**, v. 83, p. e242942, 2021.

JOFRE, F. C.; LARREGUI, D. N.; MURCIA, V. N.; PACHECO, P.; SAVIO, M. Infrared assisted digestion used as a simple green sample preparation method for nutrient analysis of animal feed by microwave induced plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v. 231, n. January, p. 122376, 2021.

JUNKER, B. Foam and its mitigation in fermentation systems. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 4, p. 767–784, 2007.

JUSTINO, Y. G.; LEITE, M. F. Prospecção Tecnológica de Águas Micelares. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 5, p. 1517–1527, 2020.

KAUR, K. *et al.* Mechanism of Thimerosal-Induced Structural Destabilization of a Recombinant Rotavirus P [4] Protein Antigen Formulated as a Multi-Dose Vaccine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1054–1066, 2021.

- KERN, J. K.; HALEY, B. E.; GEIER, D. A.; SYKES, L. K.; KING, P. G.; GEIER, M. R. Thimerosal exposure and the role of sulfation chemistry and thiol availability in autism. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 8, p. 3771–3800, 2013.
- KHANDKE, L.; YANG, C.; KRYLOVA, K.; JANSEN, K. U.; RASHIDBAIGI, A. Preservative of choice for Prev(e)nar 13TM in a multi-dose formulation. **Vaccine**, v. 29, n. 41, p. 7144–7153, 2011.
- KINGSTON, H. M.; HASWELL, S. J. **Microwave-enhanced chemistry: fundamentals, sample preparation and applications**, 1. ed., American Chemical Society, 1997.
- KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**, 2. ed., São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2019.
- LAZO, P.; KUCUKU, M. Analysis of Mercurial Preservatives in Different Vaccines by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrophotometry. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 3, n. 1, 2012.
- LAVILLA, I.; CABALEIRO, N.; COSTAS, M.; LA CALLE, I. DE; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted emulsification of cosmetic samples prior to elemental analysis by different atomic spectrometric techniques. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 109–116, 2009.
- LEE, C. H.; LIN, R. H.; LIU, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y. Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 3, p. 269–276, 1997.
- LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; QUEVAUVILLER, P.; HORVAT, M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 383–393, 2005.
- LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n. 2, p. 127–138, 2010.
- LEVANOV, A. V.; KUSKOV, I. V.; ANTIPENKO, E. E.; LUNIN, V. V. The kinetics of reaction between permanganate and chlorine ions in acid solutions. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 80, n. 5, p. 726–731, 2006.
- LI, S.; WANG, M.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; YANG, B. Cloud point extraction for trace inorganic arsenic speciation analysis in water samples by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 111, p. 74–79, 2015.
- LIU, M.; LIU, T.; MAO, X.; LIU, J.; NA, X.; DING, L.; QIAN, Y. A novel gas liquid separator for direct sampling analysis of ultratrace arsenic in blood sample by hydride generation in-situ dielectric barrier discharge atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 202, p. 178–185, 1 set. 2019.

LUNDOV, M. D.; MOESBY, L.; ZACHARIAE, C.; JOHANSEN, J. D. Contamination versus preservation of cosmetics: A review on legislation, usage, infections, and contact allergy. **Contact Dermatitis**, v. 60, n. 2, p. 70–78, 2009.

LUTHER, G. W.; THIBAUT DE CHANVALON, A.; OLDHAM, V. E.; ESTES, E. R.; TEBO, B. M.; MADISON, A. S. Reduction of Manganese Oxides: Thermodynamic, Kinetic and Mechanistic Considerations for One- Versus Two-Electron Transfer Steps. **Aquatic Geochemistry**, v. 24, n. 4, p. 257–277, 2018.

MAGALHÃES, W. Gestão em P&D: Conservantes. **Cosmetics online**, 2011. Disponível em: <<https://www.cosmeticsonline.com.br/noticias/detalhes-colunas1/684/conservantes>>. Acesso em: 20 de ago. 2018.

MALLKUCI, I.; LAZO, P. Research Article Mercury Determination in Drug and Cosmetic Products. **International Journal of Current Research**, v. 6, n. 8, p. 8077–8082, 2014.

MARQUES, R. C.; DÓREA, J. G.; BERNARDI, J. V. E. Thimerosal exposure (from tetanus-diphtheria vaccine) during pregnancy and neurodevelopment of breastfed infants at 6 months. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 99, n. 6, p. 934–939, 2010.

MAHBUB, K. R.; KRISHNAN, K.; NAIDU, R.; ANDREWS, S.; MEGHARAJ, M. Mercury toxicity to terrestrial biota. **Ecological Indicators**, v. 74, p. 451–462, 2017.

MENDONÇA, ESTELA. Ingredientes poderosos fundem conceitos de skin care e dermocosméticos. **Cosmetic Innovation**, 2021. Disponível em: <<https://cosmeticinnovation.com.br/ingredientes-poderosos-fundem-conceitos-de-skin-care-e-dermocosmeticos/>>. Acesso em: 15 de setembro de 2021.

MENDONÇA, E. Mercado de beleza cresce lento, mas continua em alta: Indicadores mostram que HPPC ainda é um bom negócio no Brasil. **Cosmetic Innovation**, 2019. Disponível em: <https://www.cosmeticinnovation.com.br/mercado-de-beleza-cresce-lento-mas-continua-em-alta/>. Acesso em: 12 de jul. 2019.

MENDONÇA, E. Mercado brasileiro de HPPC volta a crescer: Produtos masculinos lideram alta nas vendas. **Cosmetic Innovation**, 2018. Disponível em: <https://www.cosmeticinnovation.com.br/mercado-brasileiro-de-hppc-volta-a-crescer/>. Acesso em: 20 de ago. 2018.

MESKO, M. F.; NOVO, D. L. R.; COSTA, V. C.; HENN, A. S.; FLORES, E. M. M. Toxic and potentially toxic elements determination in cosmetics used for make-up: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1098, p. 1–26, 2020.

MICHALEK, I. M.; BENN, E. K. T.; SANTOS, F. L. C. DOS; GORDON, S.; WEN, C.; LIU, B. A systematic review of global legal regulations on the permissible level of heavy metals in cosmetics with particular emphasis on skin lightening products. **Environmental Research**, v. 170, p. 187–193, 2019.

MINAMATA. Minamata Convention on Mercury - Text and Annexes, mercury convention, 2017. Disponível em: <<https://www.mercuryconvention.org/en/documents/minamata-convention-mercury-text-and-annexes>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

MURPHY, B.; HOPTROFF, M.; ARNOLD, D.; ECCLES, R.; CAMPBELL-LEE, S. In-vivo impact of common cosmetic preservative systems in full formulation on the skin microbiome. **PLoS ONE**, v. 16, n. 7, p. 1–13, 2021.

NAYFEH, A.; KASSIM, T.; ADDASI, N.; ALGHOULA, F.; HOLEWINSKI, C.; DEPEW, Z. A Challenging Case of Acute Mercury Toxicity. **Case Reports in Medicine**, v. 2018, p. 1010678, 2018.

OLIVEIRA, M. J.; CUNHA, F. A. S.; CALDAS SANTOS, J. C. Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 36, n. 4, p. 740–746, 2021.

ORESTE, E. Q.; JESUS, A. DE; OLIVEIRA, R. M. DE; SILVA, M. M. DA; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 5–9, 2013.

PAHO - Pan American Health Organization. **Mercury added in skin-lightening products**. Toxicological note, 2017. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017tn.mercury.products.pdf>>. Acesso em: 8 de março de 2019.

PAPADOPOULOS, A.; ASSIMOMYTIS, N.; VARVARESOU, A. Sample Preparation of Cosmetic Products for the Determination of Heavy Metals. **Cosmetics**, v. 9, n. 9, p. 1-12, 2022.

PARK, Jung-Duck; ZHENG, Wei. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. **Journal of preventive medicine and public health**, v. 45, n. 6, p. 344-352, 2012.

PARNSAMUT, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Development and efficacy assessments of tea seed oil makeup remover. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 75, n. 3, p. 189–195, 2017.

PEDROZO-PENAFIEL, M. J.; MIRANDA-ANDRADES, J. R.; GUTIERREZ-BELEÑO, L. M.; LARRUDÉ, D. G.; AUCELIO, R. Q. Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 215, p. 120938, 2020.

PÉREZ-CABALLERO, G.; MURO-HIDALGO, N.; MORALES-HIPÓLITO, E. A.; VILLASEÑOR, A.; LÓPEZ-ARELLANO, R. Development and validation of a RP-HPLC-UV method for the quantification of thimerosal in topic creams. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 60, n. 4, p. 188–193, 2016.

PÉREZ-MARTÍNEZ, B. T.; ABOUDZADEH, M. A.; SCHUBERT, U. S.; LEIZA, J. R.; TOMOVSKA, R. Microwave irradiation versus conventional heating assisted free-radical copolymerization in solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 399, p. 125761, 2020.

PEREIRA, J. X.; PEREIRA, T. C. Cosmetics and its Health Risks. **Global Journal of Medical Research**, v. 18, n. 2, p. 63–70, 2018.

PICHICHERO, M. E.; CERNICHIARI, E.; LOPREIATO, J.; TREANOR, J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. **The Lancet**, v. 360, n. 9347, p. 1737–1741, 2002.

PINTO, M.S.; ALPIOVEZZA, A.R.; RIGHETTI, C. **Garantia da Qualidade na Indústria Cosmética**. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

QIN, O.; CHENG, Y.; HU, W.; ZHOU, H.; TAN, Y.; GUO, S.; JIN, X.; TAO, L.; DU, L.; WANG, J.; WANG, X.; ZOU, Y.; MAIBACH, H. Patch test in Chinese in Shanghai with cosmetic allergy to cosmetic series and products. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 8, p. 2086–2092, 2020.

RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A.; WILLIE, S.; STURGEON, R. E. Ultrasound-assisted vapor generation of mercury. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 4, p. 849–857, 2007.

SAADATZADEH, A.; AFZALAN, S.; ZADEHDABAGH, R.; TISHEZAN, L.; NAJAFI, N.; SEYEDTABIB, M.; NOORI, S. M. A. Determination of heavy metals (lead, cadmium, arsenic, and mercury) in authorized and unauthorized cosmetics. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 207–211, 2019.

SABANOGLU, T. Indústria de Cosméticos - Estatísticas e Fatos. **STATISTA**, 2022. Disponível em: < <https://www.statista.com/topics/3137/cosmetics-industry/#dossierKeyfigures> >. Acesso em: 20 de janeiro de 2022.

SALES, M. V. S.; SILVA FILHO, R. C.; SILVA, M. M.; ROCHA, J. L.; FREIRE, R. O.; ELOIZA, E. L.; SILVA, E. C. O.; FONSECA, E. J. S.; FIGUEIREDO, I. M.; ROCHA, U.; SANTOS, J. C. C.; LEITE, A. C. R. Consequences of thimerosal on human erythrocyte hemoglobin: Assessing functional and structural protein changes induced by an organic mercury compound. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 71, 2022.

SANDOVAL, C.; RANGANATHAN, S.; RAMÍREZ, E.; MANSILLA, H. D.; DINAMARCA, R.; PECCHI, G.; YÁÑEZ, J. Visible light assisted photodegradation of thimerosal by high performance ZnFe₂O₄ /poly(o-phenylenediamine) composite. **Materials Research Bulletin**, v. 116, p. 8–15, 2019.

SANTOS, T. P.; CUNHA, R. L. Designing biotechnological processes to reduce emulsions formation and improve oil recovery: Study of antifoams application. **Biochemical Engineering Journal**, v. 163, p. 107745, 2020.

SILVA, M. M.; DANTAS, M. D. A.; SILVA FILHO, R. C.; SALES, M. V. S.; XAVIER, J. A.; LEITE, A. C. R.; GOULART, M. O. F.; GRILLO, L. A. M.; BARRO, W. A.; FÁTIMA, Â.; FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, J. C. C. Toxicity of thimerosal in biological systems: Conformational changes in human hemoglobin, decrease of oxygen binding capacity, increase of protein glycation and amyloid's formation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 661–671, 2020.

SPILLER, H. A. Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. **Clinical Toxicology**, v. 56, n. 5, p. 313–326, 2018.

SKALNY, A. V.; SKALNAYA, M. G.; BJØRKLUND, G.; NIKONOROV, A. A.; TINKOV, A. A. Mercury as a possible link between maternal obesity and autism spectrum disorder. **Medical Hypotheses**, v. 91, p. 90–94, 2016.

STROHMIDEL, P.; SPERLING, M.; KARST, U. Investigations on the binding of ethylmercury from thiomersal to proteins in influenza vaccines. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 100–104, 2018.

SYKES, L. K.; GEIER, D. A.; KING, P. G.; KERN, J. K.; HALEY, B. E.; CHAIGNEAU, C. G.; MEGSON, M. N.; LOVE, J. M.; REEVES, R. E.; GEIER, M. R. Thimerosal as discrimination: vaccine disparity in the UN Minamata Convention on mercury. **Indian Journal of Medical Ethics**, v. 11, n. 4, p. 206–218, 2014.

TAFFAREL, S. R.; RUBIO, J. Removal of Mn^{2+} from aqueous solution by manganese oxide coated zeolite. **Minerals Engineering**, v. 23, n. 14, p. 1131–1138, 2010.

TALL, A.; COSTA, K. R. DA; OLIVEIRA, M. J. DE; TAPSOBA, I.; ROCHA, U.; SALES, T. O.; GOULART, M. O. F.; SANTOS, J. C. C. Photoluminescent nanoprobe based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines. **Talanta**, v. 221, 2021.

TRÜMPLER, S.; MEERMANN, B.; NOWAK, S.; BUSCHER, W.; KARST, U.; SPERLING, M. In vitro study of thimerosal reactions in human whole blood and plasma surrogate samples. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 2, p. 125–130, 2014.

TRÜMPLER, S.; LOHMANN, W.; MEERMANN, B.; BUSCHER, W.; SPERLING, M.; KARST, U. Interaction of thimerosal with proteins - Ethylmercury adduct formation of human serum albumin and β -lactoglobulin. **Metallomics**, v. 1, n. 1, p. 87–91, 2009.

VIANNA, A. DOS S.; MATOS, E. P. DE; JESUS, I. M. DE; ASMUS, C. I. R. F.; CÂMARA, V. DE M. Human exposure to mercury and its hematological effects: A systematic review. **Cadernos de Saude Publica**, v. 35, n. 2, p. 1–22, 2019.

World Health Organization-WHO. International Programme on Chemical Safety: Ten chemicals of major public health concern. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern> >. Acesso em: 22 jan. 2022.

World Health Organization-WHO Expert Committee on Biological Standardization. 2014. v. 980, pp. 222–234. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/98870> >. Acesso em: 24 de março de 2020.

World Health Organization. Mercury in skin lightening products. 2011. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CED-PHE-EPE-19.13> >. Acesso em: 10 março de 2018.

YÁÑEZ-JÁCOME, G.S.; ROMERO-ESTÉVEZ, D.; NAVARRETE, H.; SIMBAÑA-FARINANGO, K.; VÉLEZ-TERREROS, P. Y. Optimization of a digestion method to determine total mercury in fish tissue by cold vapor atomic fluorescence spectrophotometry. **Methods and Protocols**, v. 3, p. 1–12, 2020.

YANG, L.; ZHANG, Y.; WANG, F.; LUO, Z.; GUO, S.; STRÄHLE, U. Toxicity of mercury: Molecular evidence. **Chemosphere**, v. 245, p. 125586, 2020.

YEPSEN, O.; CONTRERAS, D.; SANTANDER, P.; YÁÑEZ, J.; MANSILLA, H. D.; AMARASIRIWARDENA, D. Photocatalytic degradation of thimerosal in human vaccine's residues and mercury speciation of degradation by-products. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 41–47, 2015.

ZAHIR, F.; RIZWI, S. J.; HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Low dose mercury toxicity and human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 2, p. 351–360, 2005.

ZIEMINSKA, E.; TOCZYŁOWSKA, B.; STAFIEJ, A.; LAZAREWICZ, J. W. Low molecular weight thiols reduce thimerosal neurotoxicity in vitro: Modulation by proteins. **Toxicology**, v. 276, n. 3, p. 154–163, 2010.

ZHENG, H.; HONG, J.; LUO, X.; LI, S.; WANG, MEIXIA; YANG, B.; WANG, MEI. Combination of sequential cloud point extraction and hydride generation atomic fluorescence spectrometry for preconcentration and determination of inorganic and methyl mercury in water samples. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 806–812, 2019.

2 ARTIGO 1: DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO (TIMEROSAL) EM VACINAS USANDO DIFERENTES OXIDANTES E ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA POR VAPOR FRIO EM ÁCIDOS DILUÍDOS.

2.1 Introdução

O timerosal (TH) é um composto organomercúrico que apresenta 49,6% da massa em mercúrio, sendo amplamente empregado devido às suas propriedades bactericida e antifúngica como conservante, adicionado em vacinas, cosméticos, tintas para tatuagens, preparações imunológicas e outras formulações farmacêuticas (GIL *et al.*, 2007; ROCHA e SCHERRER, 2014; GEIER *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2019). Em vacinas, o TH é adicionado como conservante durante o processo de produção e/ou incorporado ao diluente em concentrações de 0,003 a 0,01%, assim, a bioformulação pode conter até 50 µg Hg por 0,5 mL (BALL, *et al.*, 2001; PENAGOS-LIANOS *et al.*, 2019). Contudo, tem sido reportado que a utilização do TH pode levar a distúrbios de neurodesenvolvimento em crianças e casos de reações alérgicas também têm sido evidenciados (HURLEY, *et al.*, 2010; DÓREA *et al.*, 2011; HOLTKAMP *et al.*, 2013; GEIER, *et al.*, 2017; SANDOVAL *et al.*, 2019). Nesta linha, devido ao possível fator de risco à saúde a organização mundial de saúde (WHO), a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), o Comitê de Medicamentos para uso humano (CHMP, União Europeia), a Agência de Alimentos e Medicamentos (FDA, EUA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil) vêm recomendado a substituição ou redução da concentração do timerosal em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2001; FDA, 2019, WHO, 2019, EMA 2019; CHMP, 2019; LIN *et al.*, 2020)

Nesta perspectiva, desenvolver estratégias analíticas para quantificação do TH é de importância crucial, considerando a utilização mundial deste conservante em vacinas, portanto, faz-se necessário o conhecimento do nível de concentração visando avaliação de riscos prospectivos, efeitos tóxicos e controle de qualidade das vacinas (PIECH *et al.*, 2016; LIN, *et al.*, 2020). De forma geral, a determinação de TH é realizada empregando técnicas cromatográficas (HPLC ou GC) hífenadas a diferentes sistemas de detecção, o que eleva o custo das análises, possuem baixa frequência analítica e pode inviabilizar a implementação destes protocolos em análise de rotina (ACOSTA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; ZAREBA, *et al.*, 2016; STROHMIDEL, *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018).

Como estratégia analítica para quantificação de compostos organomercúricos em diferentes matrizes empregando técnicas espectroscópicas atômicas (AAS ou AFS), de modo geral, estes compostos são convertidos a mercúrio inorgânico (Hg_{ino}) antes da detecção. Os métodos geralmente envolvem oxidantes em meio ácido (ALMEIDA *et al.*, 2016;

RUIZ – DE – CENZANO *et al.*, 2016; ZHANG, *et al.*, 2018; BROMBACH e PICHLER, 2019), digestão com ácidos concentrados em sistema fechado assistido por micro-ondas (GAO *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019) ou degradação fotoquímica (YIN, *et al.*, 2011; CAMPANELLA *et al.*, 2013; YEPSEN *et al.*, 2015; MIRANDA-ANDRADES *et al.*, 2017; STURGEON, 2017). Neste contexto, para quantificação de mercúrio por CV AAS e/ou CV AFS, em matrizes simples, como água, são aplicados sistemas oxidantes contendo $K_2Cr_2O_7$, $K_2S_2O_8$, $KBrO_3$, $KMnO_4$ ou $BrCl$ em meio ácido para a oxidação do mercúrio orgânico (Hg_{org}) para Hg_{ino} (FAREY, *et al.*, 1978; TORRES *et al.*, 2009; LEOPOLD, *et al.*, 2012; MARANHÃO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2020). Entretanto, para matrizes complexas, se recorre a uma etapa prévia de digestão assistida por micro-ondas em sistema fechado. Portanto, a quantificação ocorre após a digestão, pois independente da complexidade da matriz, estas técnicas apresentam a limitação de não quantificar diretamente as espécies orgânicas de mercúrio (SILVA *et al.*, 2010; CAMERA *et al.*, 2015).

Assim, neste trabalho, aplicou-se a decomposição oxidativa direta utilizando ácidos minerais diluídos, para oxidar TH em mercúrio inorgânico (Hg_{ino}) como procedimento de preparo de amostra e empregou-se CV AFS, objetivando-se a determinação de TH em vacinas de forma rápida e simples. Os sistemas $KBr/KBrO_3$ (complexante-oxidante) e o $KMnO_4$ (oxidante) foram os mais promissores para decomposição do TH e a influência de variáveis químicas na decomposição oxidativa do TH como concentração / tipo de ácido (HCl ou HNO_3), e a composição / concentração dos sistemas para decomposição oxidativa, também foram investigadas. Por fim, após otimização, os resultados foram comparados a digestão assistida por micro-ondas (método de referência) e o método desenvolvido foi aplicado com sucesso em diferentes amostras de vacinas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar as condições instrumentais, para decomposição direta do TH;
- b) Otimizar o método desenvolvido quanto aos parâmetros: concentração/ tipo de ácido, composição/ concentração dos sistemas ($KBr/KBrO_3$ e o $KMnO_4$) e tempo de reacional;
- c) Determinar os parâmetros de desempenho do método desenvolvido;
- d) Aplicar o método desenvolvido em amostras de vacinas e comparar os resultados obtidos, com a digestão assistida por micro-ondas (método de referência).

2.3 Experimental

2.3.1 Instrumentação

A determinação de mercúrio nas amostras de vacinas foi realizada utilizando um espectrômetro de fluorescência atômica no módulo de vapor frio (CV AFS), modelo PSA 10.025 Millennium Merlin (PS Analytical, Orpington, Kent, UK), conectado a um autoamostrador (PSA 20.400). O equipamento utiliza como fonte de radiação uma lâmpada de cátodo oco de alta intensidade (BDHCL, *Boosted – Discharge Hollow Cathode Lamps*) da Photron (Victoria, Austrália), com comprimento de onda de 253,7 nm. Os parâmetros instrumentais e as soluções usadas para determinação de mercúrio estão sumarizados na Tabela 2. O procedimento de mineralização das amostras foi efetuado em sistema de digestão fechado por micro-ondas de alta pressão, modelo ETHOS ONE (Milestone, Sorilose, Itália), equipado com 10 rotores (SK-10) com vasos de volume interno de 100 mL, os quais são constituídos de Teflon quimicamente modificado (TFMTM). As condições operacionais máximas de temperatura, pressão e potência foram 220°C, 100 bar e 1500 W, respectivamente.

Tabela 2 – Parâmetros instrumentais empregados para determinação de Hg_{total} por CV AFS

Parâmetros	Valores
Modo de medição (u. a.)	Altura do Pico
Comprimento de onda (nm)	253,7
Tempo de <i>delay</i> (s)	15
Tempo de análise (s)	40
Tempo de memória (s)	60
Ganho	10
Solução redutora SnCl ₂ (mM)	90
Gás carreador - Argônio UHP 99.999% (mL min ⁻¹)	250
Gás de secagem – Ar sintético 99.999% (mL min ⁻¹)	2500
Solução carreadora (mL min ⁻¹)	9,0
Solução para análise (mL min ⁻¹)	9,0
Solução SnCl ₂ (mL min ⁻¹)	4,5

Fonte: Autora, 2021.

2.3.2 Reagentes e soluções

De forma geral, nos procedimentos experimentais empregou-se reagentes de grau analítico de pureza provenientes da Sigma-Aldrich (USA) ou Merck (Alemanha). No preparo das soluções foi utilizada água ultrapura (condutividade < 0,1 µS cm⁻¹), a partir de purificador Master System MS2000 (Gehaka, Brazil). As soluções de referência para curva analítica foram preparadas a partir de diluições sequenciais da solução padrão de

mercúrio inorgânico (1000 mg L⁻¹, Specsol[®] 92786-62-4, rastreabilidade NIST, EUA). Ácido nítrico 14 mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio 30% (m/m), hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, biftalato de potássio 0,1 mol L⁻¹ e fenolftaleína 1% (m/v) em etanol, foram utilizadas para o procedimento de digestão assistida por micro-ondas das amostras e determinação da acidez residual dos digeridos, nesta ordem.

Para a determinação direta de TH, a reação foi processada em meio ácido e avaliou-se diferentes sistemas oxidantes: (1) KBr/KBrO₃, (2) KMnO₄, os quais foram dissolvidos diretamente em água ultrapura e posteriormente a acidez final foi ajustada com HCl ou HNO₃; (3) KI (200 mmol L⁻¹) / KIO₃ (34 mmol L⁻¹) e (4) KMnO₄ 60 mmol L⁻¹ diluído em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ contendo Na₂S.9H₂O a 50 mmol L⁻¹ diluído em NaOH 50 mmol L⁻¹ (ZHANG *et al.*, 2018). Em todos estes sistemas, as concentrações foram otimizadas em estudos prévios e o ácido ascórbico 12% (m/v) foi utilizado para remoção do excesso do oxidante (Br₂, I₂ ou KMnO₄) no meio reacional.

Para geração de vapor químico de Hg por CV AFS nas amostras submetidas a digestão assistida por micro-ondas, foi empregada como solução carreadora HNO₃ 1 mol L⁻¹. Além disso, avaliou-se a influência do ácido fórmico e 2-propanol na determinação direta de TH (como Hg_{ino}), utilizando HCl 2,4 mol L⁻¹ como solução carreadora. Neste trabalho, as demais condições químicas e instrumentais foram utilizadas com base nas recomendações do fabricante do equipamento (PSA ANALYTICAL, 2013) e estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (TALL *et al.*, 2021). Os demais parâmetros analíticos foram reportados na Tabela 2.

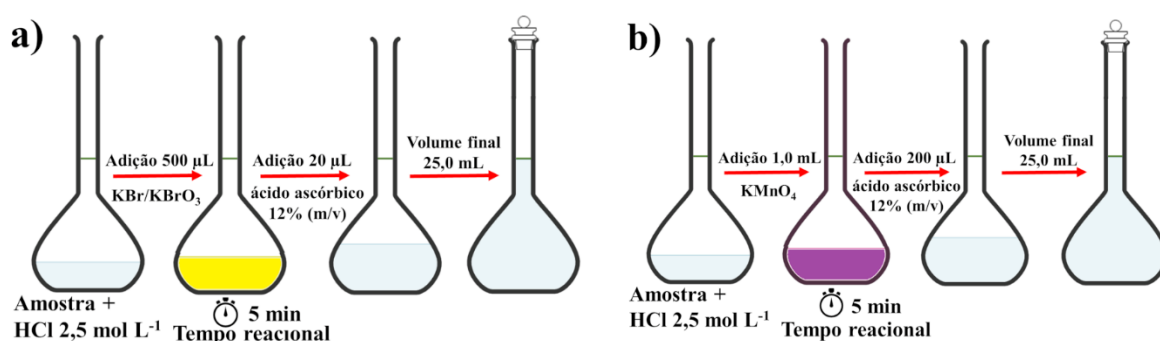
Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas diariamente, exceto a solução estoque de TH (50 mg L⁻¹), a qual foi preparada mensalmente e armazenada a 4°C. Os materiais de polietileno e vidrarias utilizados, foram submetidos a um sistema rigoroso de depuração e mantidos por um período de 24 h, em solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹, posteriormente lavados com água ultrapura e a secagem foi realizada a temperatura ambiente.

2.3.3 Determinação de TH em vacinas por CV AFS

Para determinação de TH, as amostras de vacinas (100 µL) ou soluções de referência foram diluídas com HCl 2,5 mol L⁻¹, apresentando acidez final de 0,6 mol L⁻¹. Na oxidação do composto orgânico de mercúrio pelo sistema (1) adicionou-se 0,50 mL da mistura KBr/KBrO₃ (100 e 17 mmol L⁻¹, respectivamente) em seguida, a solução foi homogeneizada, e aguardou-se 5 min a temperatura ambiente (25°C) (Figura 3a). Por fim, foi adicionado 20 µL

de ácido ascórbico 12% (m/v) para remover o excesso de Br_2 do meio reacional, sendo o volume final ajustado para 25 mL com água ultrapura. Enquanto, para o sistema (2) adicionou-se nas amostras ou soluções de referência 1,0 mL de KMnO_4 30 mmol L^{-1} e após 5 min; 200 μL de ácido ascórbico 12% (m/v). Em seguida, o sistema foi avolumado para 25 mL com água ultrapura (Figura 3b). Os sistemas 3 e 4, não apresentaram eficiência de oxidação do TH a Hg_{ino} , em ambos os sistemas ocorreu consumo do agente oxidante, portanto, nos ensaios subsequentes, apenas os parâmetros reacionais para os sistemas 1 e 2 foram avaliados.

Figura 3 - Etapas de preparo de amostras para decomposição direta do TH em vacinas, aplicando os sistemas (1) e (2) para determinação do mercúrio por CV AFS.



Fonte: Autora, 2021.

2.3.4 Digestão das amostras de vacina por micro-ondas (método de referência) para determinação de TH por CV AFS

O protocolo de digestão para decomposição do TH nas amostras de vacina, consistiu na transferência de 0,50 mL de cada amostra para os vasos de reação, seguido de 5,0 mL de HNO_3 (14 mol L^{-1}), 3,0 mL de H_2O_2 30% (m/m) e 3,0 mL de água ultrapura. Para cada amostra de vacina o procedimento foi realizado em triplicata ($n = 3$), além disso, três soluções do branco analítico foram preparadas. Após adição dos reagentes, os reatores foram fechados e inseridos no rotor do equipamento, e assim, o programa de aquecimento foi iniciado (Tabela 3). Finalizada a etapa mencionada, os reatores foram mantidos sob ventilação por 20 min e posteriormente abertos. A solução resultante, foi transferida para balões volumétricos e avolumada com água ultrapura para 25 mL.

Tabela 3 - Programa de aquecimento para digestão em sistema fechado para as amostras de vacinas por radiação micro-ondas.

Etapa	Tempo(min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
I	15*	700	^a TA - 130
II	20**	700	130
III	15*	1000	130 - 180
IV	20**	1000	180

^aTA = temperatura ambiente // *Tempo de rampa de aquecimento // **Tempo de patamar

Fonte: Autora, 2021.

A acidez residual foi determinada por volumetria ácido-base, utilizando solução padronizada de NaOH ($0,0903 \pm 0,0005 \text{ mol L}^{-1}$) e fenolftaleína 1% (m/v) como indicador visual. Para determinação do analito por CV AFS, diluições sequenciais foram realizadas para adequação da concentração final de mercúrio total nas curvas analíticas ($0,5 - 20 \mu\text{g L}^{-1}$), e para compatibilização da concentração de ácido nas amostras digeridas e nas soluções padrão da curva analítica foi utilizado HNO_3 1 mol L^{-1} . Por fim, a limpeza dos vasos de digestão foi realizada com 10 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} no sistema micro-ondas, por 5 min na temperatura de 180°C , em seguida, permaneceram por no mínimo 12 h imersos em solução de HNO_3 1 mol L^{-1} (método *overnight*), antes de um novo ciclo de digestão (BIZZI *et al.*, 2011).

2.3.5 Amostras de vacinas

As amostras de vacinas foram doadas por unidades básicas de saúde do sistema brasileiro (Jequiá da Praia, Alagoas, Brasil) e pela coordenação de imunização da secretaria municipal de saúde (Campina Grande, Paraíba, Brasil), as quais foram mantidas sob refrigeração (4°C), de acordo com as especificações do fabricante, durante o transporte e armazenamento. As vacinas utilizadas para otimização e validação do método foram: hepatite B; difteria e tétano (dT); pentavalente; influenza e tríplice viral (Tabela 4). As concentrações de TH declaradas variaram de 4 a 100 mg L^{-1} nas amostras analisadas, com exceção da vacina tríplice viral, na qual indicava ausência deste conservante.

Tabela 4 - Características das amostras de vacinas analisadas e respectivas concentrações de TH declaradas pelo fabricante.

Nº	Sample	TH declarado (mg L ⁻¹)
1	Hepatite B: Vacina contra Hepatite B (Recombinante)	100
2	DT: Vacina adsorvida Difteria-tétano	100
3	DTP/Hib/HB: Vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis, Haemophilus influenza b e hepatite B (conjugada)	50
4	Influenza: Vacina influenza (fracionada, inativada)	4
5	Tríplice viral: Vacina sarampo, parotidite e rubéola.	ausente

Fonte: Autora, 2021.

2.3.6 Tratamento estatístico dos dados

Todos os resultados experimentais foram expressos em termos de média e desvio padrão realizados em triplicata ($n = 3$). Para avaliação da linearidade e validação das curvas analíticas, foram empregados o teste de Levene modificado (BROWN e FORSYTHE, 1974), significância da regressão e falta de ajuste. Os resultados, quando necessário, foram avaliados aplicando-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95% para as avaliações estatísticas.

2.4 Resultados e Discussão

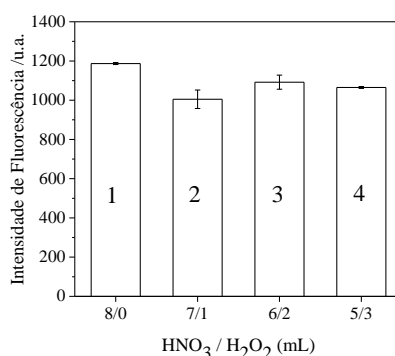
2.4.1 Estudos preliminares

Os ensaios preliminares deste trabalho foram realizados, objetivando otimizar as condições experimentais relacionadas a decomposição direta (método proposto) e digestão assistida por micro-ondas (método de referência) e os parâmetros instrumentais para determinação de Hg_{total} nas amostras de vacinas por CV AFS (Apêndice A).

2.4.2 Avaliação da oxidação de TH por micro-ondas (método de referência)

O método de digestão assistida por micro-ondas foi utilizado como procedimento de referência, para estabelecer comparativamente a eficiência de oxidação de TH a Hg_{ino} e os parâmetros de desempenho para validar os métodos. Previamente a análise das amostras de vacinas, a eficiência do procedimento de digestão do analito foi avaliada, empregando sistema pressurizado de decomposição induzido por micro-ondas. Assim, utilizou-se soluções de TH (50 mg L⁻¹) e composições distintas da mistura oxidante composta por HNO₃ e H₂O₂, conforme apresentado na Figura 4, mantendo-se o programa de aquecimento constante (Tabela 3).

Figura 4 - Comparação do sinal analítico após digestão por micro-ondas da solução de TH ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), utilizando diferentes composições de misturas oxidantes ($\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$) ($n = 3$).



Fonte: Autora, 2021.

O sinal analítico (intensidade de fluorescência) para as diferentes condições avaliadas (Tabela 5) foi de 1087 ± 76 , apresentando desvio padrão relativo (RSD) de 7,1% (Figura 4), não sendo observado diferença estatística entre as condições, aplicando-se ANOVA *One Way* a um nível de confiança de 95%.

Tabela 5 - Acidez residual de soluções digeridas de TH utilizando micro-ondas em sistema fechado. Os resultados referem-se à análise de $100 \mu\text{L}$ do branco analítico das diferentes composições ($n = 3$).

Condição	Volume $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (mL)	Acidez Residual (mol L^{-1})
1	8 / 0	$4,23 \pm 0,30$
2	7 / 1	$3,90 \pm 0,05$
3	6 / 2	$3,38 \pm 0,09$
4	5 / 3	$2,82 \pm 0,10$

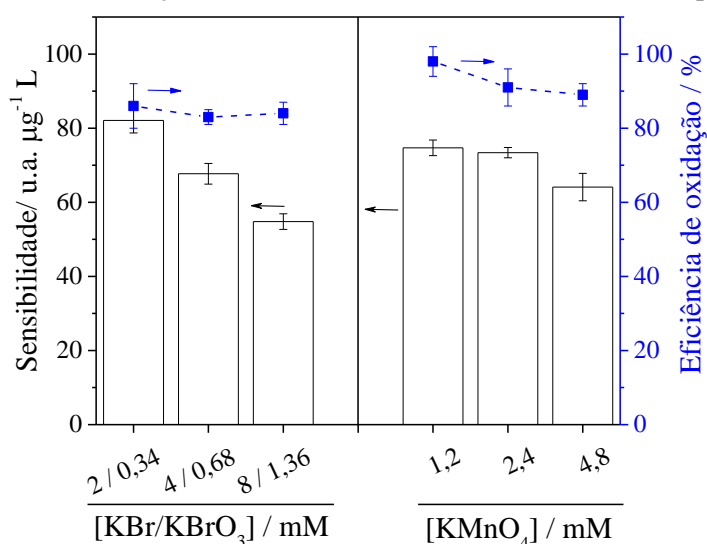
Fonte: Autora, 2021.

Como esperado, a acidez residual variou em função do volume de HNO_3 presente em cada sistema (Tabela 5). Desta forma, para digestão assistida por micro-ondas das amostras de vacinas contendo TH, selecionou-se a condição contendo 5 mL de HNO_3 (14 mol L^{-1}) e 3 mL de H_2O_2 (30% m/m), a qual apresentou uma acidez residual final de $2,82 \pm 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A condição selecionada apresentou baixo erro relativo e menor acidez residual, a qual foi mantida na compatibilização das curvas analíticas. Esta condição permite obter uma digestão com baixa acidez, levando a redução de interferências, ao mesmo tempo em que proporciona ganhos de detecção (KORN, *et al.*, 2008). Por fim, para esta condição, o processo de oxidação foi eficaz, considerando a referência (100%), ou seja, o método comparativo de digestão assistida por micro-ondas. Portanto, a eficiência de oxidação de TH para Hg_{ino} , foi calculada pela comparação dos sinais analíticos associados aos procedimentos propostos (sistemas 1 e 2) com os obtidos pelo método de preparação da amostra de referência (Figura 4, condição 4).

2.4.3 Avaliação dos sistemas oxidantes

A oxidação do TH a mercúrio inorgânico (Hg_{ino}) foi avaliada frente a quatro sistemas oxidantes: (1) $KBr/KBrO_3$; (2) $KMnO_4$; (3) KI/KIO_3 e (4) $Na_2S/KMnO_4$. Para os sistemas (3) e (4) as oxidações não foram quantitativas (< 5%). Logo, estes sistemas não foram considerados em etapas posteriores do processo de otimização. Portanto, foi avaliada a influência da concentração dos reagentes para os sistemas (1) e (2) quanto a eficiência na oxidação do TH e na sensibilidade do método proposto (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação da concentração dos sistemas oxidantes ($KBr/KBrO_3$ e $KMnO_4$) na sensibilidade analítica e eficiência da oxidação de TH a Hg_{ino} . Condições experimentais: $SnCl_2$ 90 $mmol L^{-1}$ (solução redutora) e HCl 2,40 $mol L^{-1}$ (solução carreadora). As curvas analíticas ($n > 5$) apresentaram $r \geq 0,99$.



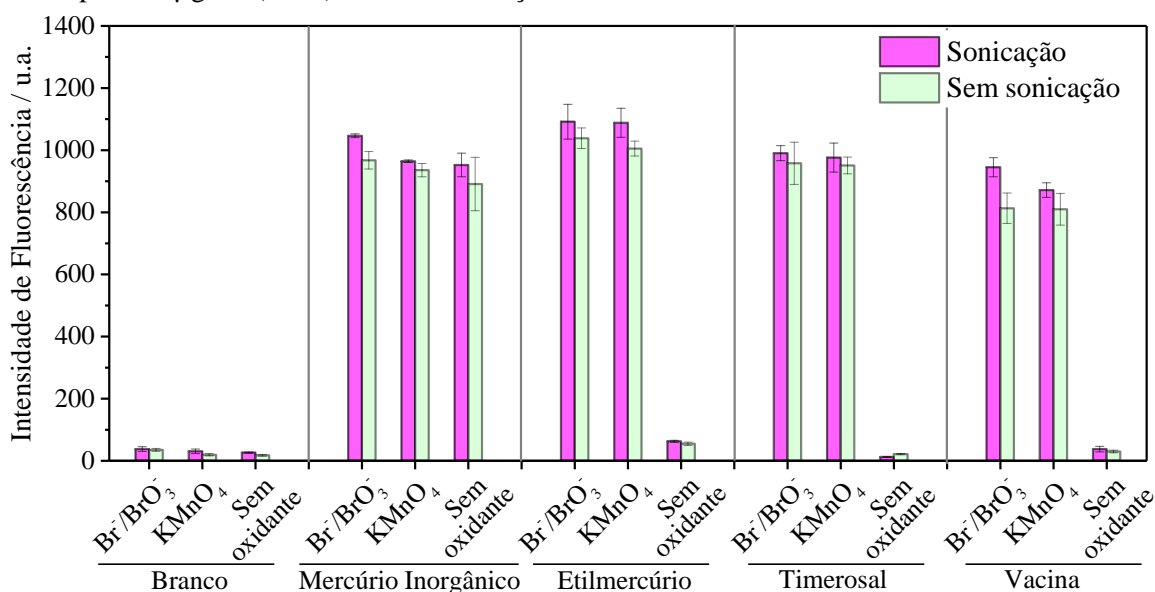
Fonte: Autora, 2021.

A sensibilidade do método apresentou relação inversamente proporcional a variação da concentração de $KBr/KBrO_3$ (sistema 1), possivelmente devido a formação do íon complexo $[HgBr_4]^{2-}$ ($\log\beta_4 = 21,89$) em meio aquoso (SMITH e MARTELL, 1976). A maior concentração do ligante (Br^-) no meio, associado a elevada constante de formação do complexo, leva a redução da concentração de $Hg(II)$ livre para redução a Hg^0 , influenciando na geração do vapor químico. A eficiência de oxidação de TH a Hg_{ino} variou de 83 a 89%. Assim, selecionou-se a condição com a menor concentração do sistema oxidante, correspondente a KBr 2 $mmol L^{-1}$ e $KBrO_3$ 0,34 $mmol L^{-1}$. De forma similar, quando se empregou o $KMnO_4$ como oxidante (sistema 2), a menor concentração do reagente também proporcionou a melhor condição de sensibilidade e eficiência de oxidação do composto organomercurial (98%). Este perfil, pode estar relacionado à estabilização do complexo formado com o analito $[HgCl_4]^{2-}$ ($\log\beta_4 = 16,2$) (SMITH e MARTELL, 1976) em meio ácido (HCl), pois maiores concentrações do oxidante

podem levar a reações de precipitação (formação de MnO_2) (TORRES *et al.*, 2009), reduzindo assim a concentração do Hg(II) no meio, e a intensidade do sinal de fluorescência. Portanto, a concentração de $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KMnO_4 foi selecionada, para estudos subsequentes.

Para verificar se o Hg_{ino} estava presente nos diferentes sistemas reacionais, várias soluções foram avaliadas (TH, etilmercúrio e vacina), com e sem aplicação de sonicação, compatibilizando-se os procedimentos analíticos deste estudo, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Avaliação de sinais analíticos empregando os sistemas oxidantes (1 e 2) e sonicação para determinação de mercúrio total em diferentes soluções padrão (Hg(II), TH e etilmercúrio) e determinação de TH em vacinas. Em todos os sistemas avaliados, a concentração total de mercúrio foi ajustada para $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$), exceto as soluções do branco.



Fonte: Autora, 2021.

Assim, uma vez que os sinais analíticos para as soluções de etilmercúrio, TH e amostra de vacina contra hepatite B (Figura 6) na ausência dos sistemas oxidantes (1 e 2, e com ou sem procedimento de sonicação) foram semelhantes à referência analítica (sinal do branco), verificou-se que o mercúrio presente estava na forma orgânica. Além disso, foi demonstrado que o TH em meio aquoso foi estável por até 15 dias, sem a geração de etilmercúrio e ácido salicílico no meio (SANTOS *et al.*, 2018).

2.4.4 Influência do ácido (HCl ou HNO_3) na determinação de TH

O efeito da concentração do ácido (HCl ou HNO_3) na oxidação do TH a Hg_{ino} , foi avaliado usando três níveis de concentrações do analito ($5, 10$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$), conforme apresentado na Tabela 6, para o sistema KBr/KBrO_3 . Os resultados indicaram que a oxidação

de TH a Hg_{ino} foi eficiente (Figura 7A e B), pois estavam de acordo com os dados do método de digestão assistida por micro-ondas (método de referência), além disso, a variação da concentração de Hg_{ino} apresentou $RSD \pm 20\%$. Quando se empregou HCl de 0,2 a 0,8 mol L⁻¹ a eficiência de oxidação do TH a Hg_{ino} variou de 75 ± 6 a $105 \pm 3\%$ ($n = 3$) (Figura 7A). Quando a concentração de HCl foi fixada não houve influência na oxidação do TH a Hg_{ino} , em relação as diferentes concentrações do analito aplicando ANOVA (95% de confiança). No entanto, a melhor condição de sensibilidade foi alcançada em maiores concentrações de HCl. Assim, a concentração de 0,6 mol L⁻¹ foi selecionada para experimentos subsequentes. Nesta concentração de HCl, a porcentagem de oxidação de TH para Hg_{ino} foi de 97% em comparação com o método de referência (digestão assistida por micro-ondas).

Tabela 6 - Avaliação da influência da concentração dos ácidos (HCl e HNO₃) para os sistemas oxidantes (KBr/KBrO₃ e KMnO₄) quanto a eficiência de oxidação de TH para Hg_{ino} . Condições experimentais: SnCl₂ 90 mmol L⁻¹ (solução redutora) e HCl 2,40 mol L⁻¹ ou HNO₃ 1 mol L⁻¹ (solução carreadora).

Condição	Ácido	Concentração (M)	Sistema	**Eficiência Oxidação (%)
1	HCl*	0,2 – 0,8	KBr / KBrO ₃	75 - 105
2	HNO ₃	0,06 – 0,7		66 - 95
3	HCl	0,6	KMnO ₄	98 ± 4
4	HNO ₃	0,06 – 0,7		10 - 22

*Para [HCl] < 0, 2 M, não houve oxidação de TH a Hg_{ino} .

**Calculada com base no procedimento do método de referência (digestão assistida por micro-ondas)

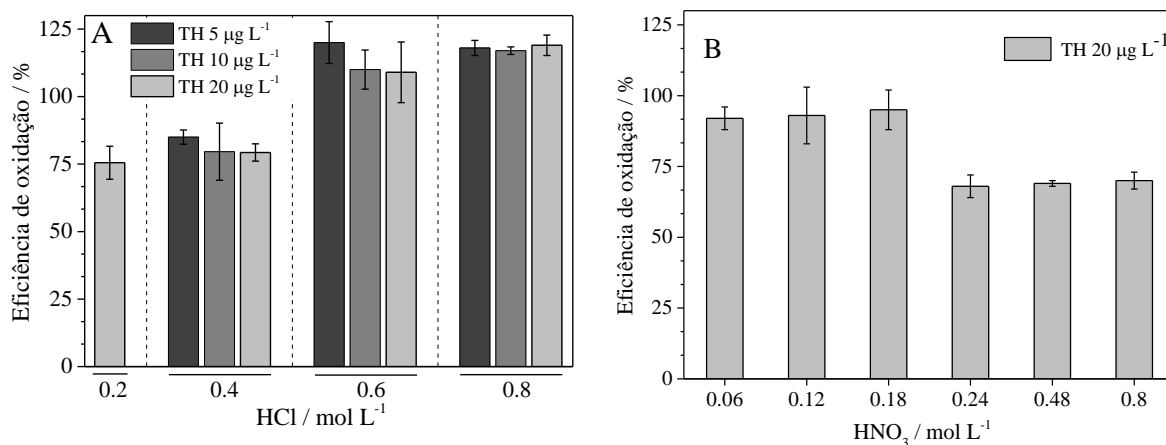
Eficiência de oxidação quantitativa (valores entre 80 e 120%)

Fonte: Autora, 2021.

O efeito da concentração final de HNO₃ (0,06 a 0,8 mol L⁻¹), também foi avaliado para o sistema KBr/KBrO₃, mantendo-se a concentração de TH constante em 20 µg L⁻¹ (Figura 7B). A eficiência de oxidação de TH a Hg_{ino} foi quantitativa quando se utilizou HNO₃ de 0,06 a 0,18 mol L⁻¹ (92 ± 4 a $95 \pm 7\%$), levando a uma eficiente geração de vapor químico. Assim, para a concentração de HNO₃ 0,18 mol L⁻¹, a porcentagem de oxidação de TH para Hg_{ino} foi de 90% em comparação com o procedimento de digestão assistida por micro-ondas. No entanto, para este ácido, o aumento da concentração proporcionou uma redução na sensibilidade, o que pode estar relacionado à geração de espécies supressoras no processo de formação do vapor químico, levando à redução da intensidade do sinal analítico (SILVA *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2005).

Adicionalmente, o efeito da concentração de HCl e HNO₃ foi avaliado para o KMnO₄ como sistema oxidante (Tabela 6). Para oxidação TH a Hg_{ino} , os melhores resultados foram obtidos com HCl, apresentando oxidação mais efetiva do analito, tendendo a completude, assim, este ácido foi selecionado para os experimentos subsequentes com o oxidante (sistema 2).

Figura 7 - Comparação da eficiência de oxidação do TH a Hg_{ino} e avaliação da concentração e tipo de ácido [(A) HCl ou (B) HNO_3] na determinação de TH. Condições experimentais: sistema oxidante $KBr/KBrO_3$ (2/0,34 $mmol L^{-1}$), soluções $SnCl_2$ 90 $mmol L^{-1}$ (solução redutora) e HCl 2,40 $mol L^{-1}$ ou HNO_3 1,0 $mol L^{-1}$ (soluções carreadoras) ($n = 3$).

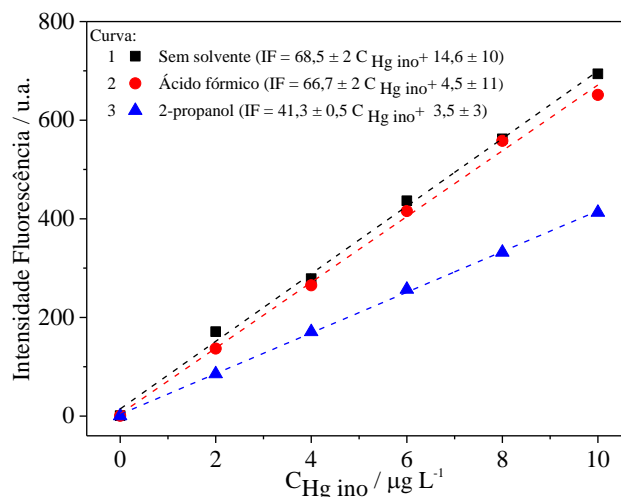


Fonte: Autora, 2021.

2.4.5 Efeito do solvente e cinética reacional

A adição de ácido fórmico e 2-propanol na solução ácida carreadora nas concentrações (5, 10 e 20% v/v) foi avaliada, uma vez que tem sido reportado na literatura, o aumento da sensibilidade analítica para o mercúrio na presença de solventes orgânicos, empregando diferentes técnicas espectrométricas atômicas (POHL *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2013; SHEKHAR, 2012; KORN e OLIVEIRA, 1998). Para esta avaliação, inicialmente, selecionou-se a concentração 10% (v/v) para ambos os solventes, para construção das curvas analíticas, a qual é relatada como concentração ótima em estudos abordados na literatura (VIEIRA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2012). (Figura 8).

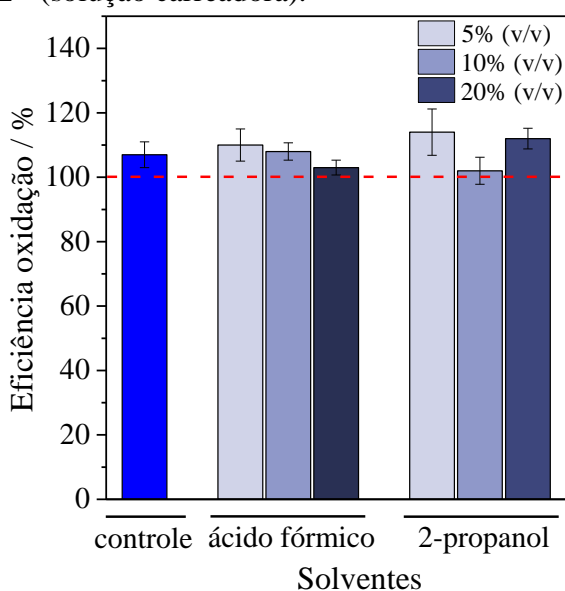
Figura 8 - Influência de solventes orgânicos na sensibilidade do método proposto. Condições experimentais: solução padrão Hg(II), HCl 0,6 mol L⁻¹, sistema oxidante KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L⁻¹), 20μL ácido ascórbico 12% (m/v), soluções SnCl₂ 90 mmol L⁻¹ (solução redutora) e HCl 2,40 mol L⁻¹ (solução carreadora).



Fonte: Autora, 2021.

Observou-se que a sensibilidade na presença de ácido fórmico não foi alterada em relação ao sistema sem adição do solvente, sendo estatisticamente equivalente, contudo, na presença de 2-propanol houve uma redução de 40% da sensibilidade. A influência dos solventes na eficiência de oxidação de TH a Hg_{ino} também foi avaliada, para a técnica CV AFS (Figura 9).

Figura 9 - Efeito da adição de solventes orgânicos na eficiência de oxidação do TH a Hg_{ino}. Condições experimentais: Solução TH 20 μg L⁻¹, HCl 0,6 mol L⁻¹, sistema oxidante KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L⁻¹), 20μL ácido ascórbico 12% (m/v), soluções SnCl₂ 90 mmol L⁻¹ (solução redutora) e HCl 2,40 mol L⁻¹ (solução carreadora).



Fonte: Autora, 2021.

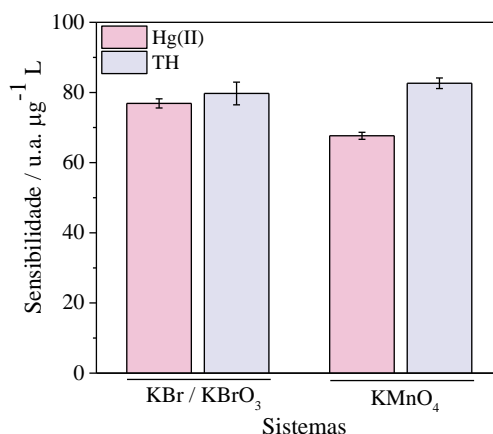
Observou-se que independente do solvente empregado as oxidações foram quantitativas, variando de 102 a 110% (ácido fórmico) e 108 a 114% (2-propanol) (Figura 9), enquanto, para o sistema controle (sem solvente) obteve-se $107 \pm 4\%$. Logo, os solventes orgânicos não foram empregados no desenvolvimento do método proposto, visando a determinação de TH (como Hg_{ino}). Estes estudos foram realizados apenas para o sistema (1), contendo $KBr/KBrO_3$, uma vez que não se obteve ganho na sensibilidade.

Por fim, a cinética do processo de oxidação TH a Hg_{ino} na presença dos agentes oxidantes foi avaliada (1, 3 e 5 min), antes da adição de ácido ascórbico. Independente do sistema oxidante (1 ou 2), a eficiência de oxidação foi quantitativa (valores entre 80% e 120%) para todos os tempos. Contudo, o tempo de 5 min, foi selecionado, considerando a maior complexidade das amostras de vacinas (proteínas, gel de sais de alumínio, estabilizantes, emulsificantes, conservantes e diluentes), com a presença de outras espécies orgânicas e inorgânicas no meio. Ressalta-se que em amostras de águas naturais e efluentes, para determinação de mercúrio, tem-se empregado tempos similares (FAREY *et al.*, 1978; ZHENG *et al.*, 2019).

2.4.6 Parâmetros de desempenho e curva analítica

Inicialmente, a sensibilidade do método foi avaliada em função das curvas analíticas preparadas com diferentes concentrações dos padrões de Hg_{ino} e TH. Este procedimento foi realizado para avaliar as condições mais adequadas para aplicação do método proposto. Para o sistema oxidante (1) $KBr/KBrO_3$ em HCl $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, as sensibilidades foram estatisticamente equivalentes, e a variação máxima do *slope* foi 3,7% quando se comparou as diferentes espécies de mercúrio utilizadas (Figura 10). Todavia, para o sistema oxidante (2) $KMnO_4$ em HCl $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, obteve-se maior sensibilidade empregando soluções de TH (22% maior) em relação a curva com padrão de Hg_{ino} . Apesar desta diferença, independente da solução padrão utilizada, para construção das curvas analíticas, as conversões de Hg_{org} (TH) para Hg_{ino} sempre foram quantitativas nas condições otimizadas. Portanto, visando simplificar o procedimento optou-se por construir as curvas analíticas com solução padrão de Hg_{ino} .

Figura 10 - Sensibilidade do método proposto utilizando diferentes espécies de mercúrio (Hg(II) e TH) ($n = 3$).



Fonte: Autora, 2021.

Para as curvas selecionadas, construídas com o padrão de mercúrio inorgânico, o modelo de regressão obtido, foi avaliado pelo teste de Levene modificado para os sistemas 1 e 2 e para o sistema de digestão assistida por micro-ondas (método de referência) (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de homocedasticidade das variâncias para as curvas analíticas empregando diferentes métodos. Sistemas (1), (2) e digestão assistida por micro-ondas (método de referência) ($n = 7$).

Método	Graus de liberdade		Quadrado da média		^a F	^b p
	Efeito	Erro	Efeito	Erro		
Sistema 1	7	16	2152,7	3037,2	0,7088	0,6656
Sistema 2	5	12	984,9	667,2	1,4762	0,2682
Micro-ondas	5	12	75,6	188,8	0,4003	0,8394

^aF_{crítico(5;12)} = 3,106 // ^aF_{crítico(7;16)} = 3,106 // ^bα = 0,05.

Fonte: Autora, 2021.

Conforme observado (Tabela 7), os resultados obtidos para os sistemas (1), (2) e método de referência confirmaram para um nível de significância $\alpha = 0,05$ (nível de confiança de 95%), que para todo intervalo de concentração avaliado, as variâncias das curvas analíticas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Assim, o comportamento homocedástico foi comprovado, indicando relação linear entre a intensidade de fluorescência (IF) e a concentração de Hg_{ino} (CHg). Testes de significância de regressão e desvio da linearidade foram realizados por meio de análise de variância (ANOVA) (SILVA *et al.*, 2016) para validação das curvas analíticas (Tabela 8).

Tabela 8 - ANOVA para o modelo linear obtido para o método proposto (sistemas 1 e 2) e método de referência (digestão assistida por micro-ondas).

Método	Fonte de variação	^a SQ	^b GL	^c MQ	^d F
KBr / KBrO ₃	Modelo	5783990	1	5783990	1509,6337
	Resíduo	84290,5	22	3831,4	
	Falta de ajuste	15001,9	6	2500,3	0,5774
	Erro puro	69288,6	16	4330,5	
KMnO ₄	Modelo	2574890	1	2574890	1961,9962
	Resíduo	20998,1	16	1312,4	
	Falta de ajuste	939,6	4	234,9	0,1405
	Erro puro	20058,5	12	1671,5	
Micro-ondas	Modelo	2518600	1	2518600	6765,5
	Resíduo	5956,3	16	372,3	
	Falta de ajuste	2341,3	4	585,3	1,943
	Erro puro	3615,0	12	301,3	

^aSQ: soma dos quadrados // ^bGL: graus de liberdade // ^cMQ: média dos quadrados.

^dF_{crítico}(1; 22) = 4,30 // ^dF_{crítico}(6; 16) = 2,74 // ^dF_{crítico}(1; 16) = 4,49 // ^dF_{crítico}(4; 12) = 3,26.

Fonte: Autora, 2021.

Para todos os métodos, o modelo de regressão linear obtido foi adequado ($F_{cal} > F_{crítico}$), constatando-se regressão significativa, além disso, não foi evidenciado falta de ajuste para as curvas analíticas ($F_{cal} < F_{crítico}$), para um nível de 95% de probabilidade. Assim, o modelo linear foi considerado válido para a estimativa das concentrações de Hg em amostras de vacinas por CV AFS (RIBEIRO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2020)

Por fim, os parâmetros de desempenho do método, empregando os sistemas (1) e (2) e o método de referência foram determinados, utilizando a solução padrão de Hg_{ino} (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros de desempenho do método proposto e método de referência para determinação de mercúrio por CVAFS.

Parâmetro	Sistema oxidante		Micro-ondas (método de referência)
	(1) KBr/KBrO ₃	(2) KMnO ₄	
^a Curva analítica ($n = 7$)	IF = $90(\pm 2) \times C_{Hg} + 3,3 (\pm 10)$	IF = $95(\pm 1) \times C_{Hg} + 1,8 (\pm 1)$	IF = $102(\pm 1) \times C_{Hg} + 17,5 (\pm 8)$
Coefficiente de correlação, r	0,9991	0,9999	0,9988
Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5 - 20	0,5 - 20	0,5 - 20
^b LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,020	0,020	0,10
^c RSD, % ($n = 10$)			
2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (c)	3,16	4,59	4,76
15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (d)	0,97	1,93	8,17

^aAs equações de regressão associadas às medidas de intensidade da altura de pico (IF) e concentração de Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$) foram descritas pela equação: IF = (inclinação) $\times C_{Hg}$ + (intercepto), com C_{Hg} sendo a concentração de Hg_{ino} ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^bO limite de detecção (LOD) foi calculado como $3 \times s_b / S$, s_b sendo o desvio padrão para medições do branco analítico ($n = 10$) e S (inclinação da curva analítica). ^cO desvio padrão relativo (RSD) correspondente a dez medições independentes ($n = 10$) de uma solução de referência de Hg_{ino} para as concentrações de 2,5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autora, 2021.

De modo final, os parâmetros de desempenho para ambos os sistemas oxidantes (1 ou 2) apresentaram valores estatisticamente semelhantes, sendo considerados equivalentes, e com base nos valores LOD (3σ) = 20 ng L⁻¹, e RSD < 5%, o método provou ser sensível e preciso para quantificar Hg_{ino} (ou TH). Ademais, os sistemas 1 e 2 do método desenvolvido apresentaram menor LOD e RSD em relação ao método de referência LOD (3σ) = 100 ng L⁻¹, e RSD ≤ 8,17% (Tabela 9). Os parâmetros validados e aplicabilidade do método desenvolvido foram comparados com diferentes estratégias analíticas reportadas na literatura (Tabela 10), as quais determinaram TH em amostras de vacinas, aplicando diferentes técnicas analíticas.

Tabela 10 - Características analíticas de diferentes metodologias para determinação de TH em vacinas em relação ao método proposto.

^a Técnica analítica	Preparo de amostra	^b Tipo de vacina analisada (quantidade analisada)	Volume amostra (µL)	RSD (%)	LOD (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Referência
ELCAD AES	Diluição	Hepatite B (1)	200	< 5,00	25	^c –	SHEKHAR <i>et al.</i> (2010)
ICP OES	Adição de ácido fórmico e geração de vapor fotoquímico	Antirrábica (3), DT(1), Hepatite B (1) e Influenza (2)	500	2,90	0,30	93 - 102	SANTOS <i>et al.</i> (2010)
DBD-PIV-AFS	Descarga em barreira dielétrica induzida por plasma	Antirrábica (1), DT (1) e Hepatite B (3)	^c –	2,50	0,03	94,3 - 100	WU <i>et al.</i> (2012)
PVG-DBD-OES	Adição de ácido fórmico e geração de vapor fotoquímico	Antirrábica (1), Hepatite B (3) e Influenza (2)	^c –	0,99	0,17	^c –	HE <i>et al.</i> (2012)
DP AdSV Hg(Ag)FE	Sonicação	D (1), d (1), DT (1) and DTP (1),	40	2,20	0,36	99 - 105	PIECH <i>et al.</i> (2016)
CV AFS	Oxidação com FeCl ₃	Antirrábica (4) e Hepatite B (1)	^c –	2,80	0,02	96- 103,4	XU <i>et al.</i> (2018)
SWV	Fotodegradação (UV)	Influenza (2)	100	3,20	340	91,9 - 92,4	PEDROZO-PENAFIEL <i>et al.</i> (2020)
CV AFS	Oxidação com KBr/KBrO ₃	DT (1), DTP/Hib/HB (1), Hepatite B (1), Influenza (1) e Tríplice viral (1)	100	3,14	0,02	80,1 - 106,0	Este trabalho
	Oxidação com KMnO ₄	DT (1), DTP/Hib/HB (1), Hepatite B (1), Influenza (1) e Tríplice viral (1)	100	4,59	0,02	92,5 - 101,1	

^aTécnicas: ELCAD AES: Espectrometria de emissão atômica com descarga eletrolítica de cátodo brilhante; ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; CV AAS: Espectrometria de absorção atômica por vapor frio; DBD-PIV-AFS: Descarga em barreira dielétrica-induzida à vaporização por plasma acoplada à espectrometria de fluorescência atômica; PVG-DBD-OES: Geração de vapor fotoquímico acoplado à espectrometria de emissão óptica com descarga em barreira dielétrica; DP AdSV Hg(Ag)FE: Voltametria de pulso diferencial com eletrodo à base de prata com filme de mercúrio; CV AFS: Espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio; SWV: Voltametria de onda quadrada. ^bTipo de vacina: DT = Vacina adsorvida tétano-difteria; D = Vacina pediátrica adsorvida contra difteria; d = Vacina adsorvida contra difteria para adolescentes e adultos; DTP = Vacina adsorvida difteria-tétano-coqueluche.; DTP/Hib/HB = Vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis/ Haemophilus influenza b/ Hepatite B (conjugada). ^cNão informado.

Fonte: Autora, 2021.

No método proposto, a reação química para a decomposição do TH foi rápida e eficiente e proporcionou recuperações quantitativas sem interferência significativa da matriz. Além disso, foi desnecessária a utilização de ácidos concentrados, alta temperatura/pressão, além de instrumentação específica, como a utilizada nos métodos convencionais de digestão assistida por micro-ondas (método de referência). Adicionalmente, o método proposto foi preciso para determinação de TH em vacinas com LOD e RSD, semelhante a outras técnicas de geração de vapor químico, apresentando simplicidade no preparo de amostras utilizando ácidos diluídos. Por fim, foi realizada uma comparação geral dos principais parâmetros avaliados para o método proposto e o método de referência (digestão assistida por micro-ondas) e os resultados obtidos estão detalhados na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação geral dos parâmetros obtidos para os sistemas 1 e 2 e digestão assistida por micro-ondas.

Parâmetros	Unidade	Sistema oxidante		Digestão assistida por micro-ondas (método de referência)
		KBr/KBrO ₃	KMnO ₄	
Amostra				
Volume de vacina	μL	100	100	500
Reagentes				
Concentração sistema				
Solução TH	μg L ⁻¹	20	20	20
Complexante/oxidante	mmol L ⁻¹	2/0,34	1,2	-
HCl	mol L ⁻¹	0,6	0,6	-
HNO ₃	mol L ⁻¹	0,2	0,2	14
H ₂ O ₂	m/m (%)	-	-	30
Volume de ácido ascórbico	μL	20	200	20
Tempo reacional	min	5	5	70
Geração de vapor químico				
Concentração solução				
Carreadora HCl	mol L ⁻¹	2,4	2,4	
Carreadora HNO ₃	mol L ⁻¹	-	-	1
Redutora SnCl ₂	mmol L ⁻¹	90	90	90

Fonte: Autora, 2021.

2.4.7 Análise das amostras de vacinas

A avaliação do efeito de matriz foi realizada por meio de ensaio de recuperação em cinco amostras de vacina pela adição de padrão em três níveis distintos de concentrações de TH (5, 10 e 20 μg L⁻¹). A utilização de 100 ou 500 μL das amostras de vacinas não afetou a precisão do método proposto (oxidação direta), uma vez que, o RDS ≤ 5%. Assim, o menor volume de amostra foi utilizado para as análises das amostras. As recuperações obtidas foram quantitativas no intervalo de 80,1 a 106% para o sistema (1) e de 92,5 a 101% para o sistema (2) (Tabela 12), evidenciando a oxidação efetiva do TH a Hg_{ino}, em uma matriz heterogênea e complexa. Em

seguida, comparou-se os resultados obtidos empregando a oxidação direta com ácidos diluídos com aqueles provenientes da digestão assistida por micro-ondas (MW) em sistema fechado (Tabela 12). As concentrações de TH obtidas para as vacinas pelo método de preparo de amostra de referência (MW) comparadas ao método proposto (KBr/KBrO₃ e KMnO₄) foram equivalentes (ANOVA, $F_{\text{cal}} = 0,078 < F_{\text{crítico}} = 3,49$) a um nível de confiança de 95%. Além disso, considerando as diretrizes da WHO (2014), para análises quantitativas de conservantes em vacinas, as quais preconizam que as concentrações determinadas estejam no intervalo de 85 a 115% do valor estabelecido, confirmou-se a eficácia do método aplicado. Adicionalmente, destaca-se que, independentemente da metodologia utilizada, os valores obtidos foram concordantes com as quantidades declaradas pelos fabricantes. Por fim, o método proposto apresentou resultados consistentes e potenciais para aplicação no controle de qualidade de imunobiológicos e outras matrizes que contenham TH.

Tabela 12 - Ensaios de recuperação, comparação com procedimento de referência e determinação de TH em amostras de vacinas pelo método proposto. Todas as análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$). O procedimento de referência empregado foi a digestão assistida por micro-ondas (MW).

Amostra	TH ($\mu\text{g L}^{-1}$)				TH (mg L^{-1})				
	Adicionado	Recuperado		Recuperação		Recuperado			^a Vacina
		KBr/KBrO ₃	KMnO ₄	KBr/KBrO ₃	KMnO ₄	Este trabalho		MW	
						KBr/KBrO ₃	KMnO ₄		
1	-	8,5 ± 0,5	8,9 ± 1,1	-	-	88,9 ± 11,2	85,2 ± 5,3	108,5 ± 0,1	100
	5	11,7 ± 0,3	13,8 ± 0,1	86,6 ± 2,5	99,5 ± 1,0				
	10	16,6 ± 0,2	18,1 ± 1,0	89,8 ± 1,3	95,8 ± 5,5				
	20	22,8 ± 1,0	26,7 ± 0,4	80,1 ± 3,6	92,5 ± 1,5				
2	-	10,3 ± 0,4	9,4 ± 0,3	-	-	93,9 ± 2,6	103,3 ± 4,0	105,3 ± 12,1	100
	5	15,3 ± 0,01	14,4 ± 1,0	104,2 ± 0,4	100,1 ± 0,6				
	10	20,3 ± 0,3	19,4 ± 1,3	92,2 ± 0,01	100,2 ± 6,8				
	20	30,3 ± 0,9	27,6 ± 0,3	106,0 ± 0,3	94,1 ± 0,9				
3	-	9,8 ± 0,4	10,2 ± 0,1	-	-	51,1 ± 0,5	49,1 ± 2,0	59,0 ± 8,1	50
	5	14,8 ± 0,2	14,6 ± 0,4	93,3 ± 0,4	95,9 ± 3,0				
	10	19,8 ± 0,6	20,3 ± 0,2	89,5 ± 0,2	100,4 ± 1,2				
	20	29,8 ± 0,4	30,5 ± 0,6	87,9 ± 0,6	101,1 ± 2,2				
4	-	9,2 ± 0,5	8,0 ± 0,1	-	-	3,2 ± 0,04	3,7 ± 0,2	4,1 ± 0,02	4
	5	14,2 ± 0,4	12,5 ± 0,5	98,9 ± 0,5	96,1 ± 4,0				
	10	19,2 ± 1,3	17,1 ± 0,2	99,8 ± 0,4	95,1 ± 1,1				
	20	29,2 ± 1,6	26,3 ± 0,7	96,2 ± 1,3	93,8 ± 2,4				
5	-	< LOD	< LOD	-	-	< LOD	< LOD	< LOD	ausente
	5	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,03	92,1 ± 2,3	98,7 ± 4,9				
	10	9,9 ± 0,4	9,3 ± 0,2	99,3 ± 3,8	92,9 ± 0,8				
	20	18,4 ± 1,1	18,6 ± 1,0	91,8 ± 5,5	93,1 ± 3,4				

^(a)Concentração declarada.

Fonte: Autora, 2021.

2.5 Conclusão

Foram propostas duas estratégias analíticas rápidas e simples para decomposição e determinação de TH em vacinas. Os sistemas oxidantes contendo KBr/KBrO₃ e KMnO₄/HCl apresentaram resultados concordantes com o método de referência (digestão assistida por micro-ondas), permitindo a determinação da concentração de Hg total por CV AFS nas amostras de vacinas, sem a necessidade de tratamentos adicionais. Dessa forma, os resultados obtidos para o método proposto, mostraram-se eficientes para a determinação de TH em amostras de vacinas, com excelente precisão e exatidão, bem como, apresentou limite de quantificação adequado para os níveis de concentrações frequentemente encontrados em matrizes farmacêuticas que contêm este conservante, demonstrando viabilidade para análises de rotina e prospectivamente podendo ser aplicado em outras matrizes biológicas.

2.6 Artigo publicado

JAAS

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

TECHNICAL NOTE

View Article Online
View Journal

Check for updates

Cite this: DOI: 10.1039/d1ja00041a

Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids†

Maria Janaina de Oliveira,¹ Francisco António S. Cunha² and Josué C. Caldas Santos^{1*}

A simple and fast method was developed for the determination of thimerosal (TH) in vaccines based on decomposition through the action of oxidizing systems of the organic mercury compound to inorganic mercury (Hg_{in}) using cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CVAFS) for detection. The oxidative decomposition of TH to Hg_{in} was evaluated in four oxidizing systems: (1) $KBr/KBrO_3$; (2) $KMnO_4$; (3) KI/KIO_3 ; and (4) $Na_2S_2O_8/KMnO_4$ employing diluted mineral acids. Only the systems (1) and (2) presented quantitative oxidation to Hg_{in} . The method presented high sensitivity under optimized conditions with a LOD of $0.02 \mu g L^{-1}$ and proved to be accurate with an RSD of $\leq 4.59\%$. The absence of a matrix effect was proven from the recovery tests applied to the vaccine samples, fortified with TH, obtaining recoveries of 80.1 to 106% (system 1) and 92.5 to 103% (system 2). Finally, the method was applied to five vaccine samples with differing TH concentrations, and the results were in agreement with a microwave-assisted digestion methodology (reference method), thus indicating the accuracy of the proposed method.

Received 3rd February 2021
Accepted 22nd March 2021
DOI: 10.1039/d1ja00041a
rsc.li/jaas

Introduction

Thimerosal (TH) is an organomercuric compound presenting 49.6% of its mass from mercury. It is widely used in vaccines, cosmetics, tattoo inks, immunological preparations, and other pharmaceutical formulations as a preservative due to its bactericidal and antifungal properties.^{1–4} Particularly in vaccines, TH can be added as a preservative during the production process or incorporated into the diluent, varying the concentrations from 0.003 to 0.01%. Thus, a bioformulation can contain up to $50 \mu g$ of Hg per 0.5 mL.^{5,6} However, it has been reported that the use of TH may lead to neurodevelopmental disorders in children, and cases of allergic reactions have also been reported.^{7–11} Due to the potential health risk factor, the World Health Organization (WHO), the European Medicines Agency (EMA), the Committee for Medicines for Human Use (CHMP, European Union), (CHMP, European Union), the Food and Drug Administration (FDA, USA), and the National Health Surveillance Agency (ANVISA, Brazil) recommend either replacement or reduction of the concentration of TH in pharmaceutical products.^{12–17}

Considering its worldwide use in vaccines, developing analytical strategies for quantifying TH is crucial to assess

prospective risks and toxic effects and for quality control in vaccines.^{17,18} In general, determination of TH is performed using chromatographic techniques (HPLC or GC) are associated with detection systems, which can raise analysis costs, yet present low analytical frequency, implementing such protocols unviable for routine analysis.^{19–23}

As an analytical strategy for quantifying organomercuric compounds in different matrices using atomic spectroscopic techniques (AAS or AFS), the compounds are generally converted towards inorganic mercury (Hg_{in}) before detection. Methods often involve oxidizers in acidic medium,^{24,25} digestion with concentrated acids in a closed system assisted by microwave radiation,^{26–31} or photochemical degradation.^{32–34} In this context, for quantification of mercury by CVAAS and/or CVAFS, in simple matrices, such as water, oxidizing systems containing $K_2Cr_2O_7$, $K_2S_2O_8$, $KBrO_3$, $KMnO_4$ or $BrCl$ in an acid medium are applied for the oxidation of organic mercury (Hg_{org}) to Hg_{in} .^{35–41} However, a previous microwave step for assisted digestion in a closed system is used for complex matrices. Therefore, the quantification occurs after digestion, since regardless of the complexity of the matrix, the technique presents the limitation of not directly quantifying Hg_{org} species.^{42,43}

Thus, in this work, oxidative decomposition was applied using diluted mineral acids to oxidate TH to inorganic mercury (Hg_{in}) as a sample preparation procedure and use CVAFS to determine TH in vaccines simply and quickly. For TH decomposition, the $KBr/KBrO_3$ (complexing-oxidizing) and $KMnO_4$ (oxidizing) systems were the most promising. The influence of chemical variables on the oxidative decomposition of TH, such

Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas (IBL), Campus A. C. Simões, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil. E-mail: jcsantos@lqf.ufal.br; jaas@ufal.br

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1ja00041a

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, G.; TORRES, S.; KAPLAN, M.; FERNÁNDEZ, L. P.; PACHECO, P. H.; GIL, R. A. Liquid chromatography coupled to molecular fluorescence with postcolumn UV sensitization for thimerosal and derivative compounds monitoring in environmental samples. **Electrophoresis**, v. 37, n. 19, p. 2531–2537, 2016.
- BALL, L. K.; BALL, R.; PRATT, R. D. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. 1147–1154, 2001.
- BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 193–196, 2011.
- BROMBACH, C. C.; PICHLER, T. Determination of ultra-low volatile mercury concentrations in sulfur-rich gases and liquids. **Talanta**, v. 199, n. December 2018, p. 277–284, 2019.
- BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364–367, 1974.
- CAMERA, A. S.; MARANHÃO, T. A.; OLIVEIRA, F. J. S.; SILVA, J. S. A.; FRESCURA, V. L. A.; CAMERA, A. S.; MARANHÃO, T. A.; OLIVEIRA, F. J. S.; SILVA, J. S. A.; FRESCURA, V. L. A. Total Mercury Determination in petroleum green coke and oily sludge samples by cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2116–2124, 2015.
- CAMPANELLA, B.; ONOR, M.; MASCHERPA, M. C.; D'ULIVO, A.; FERRARI, C.; BRAMANTI, E. Determination of thiomersal by flow injection coupled with microwave-assisted photochemical online oxidative decomposition of organic mercury and cold vapor atomic fluorescence spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 66–69, 2013.
- DÓREA, J. G.; BEZERRA, V. L. V. A.; FAJON, V.; HORVAT, M. Speciation of methyl- and ethyl-mercury in hair of breastfed infants acutely exposed to thimerosal-containing vaccines. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 17–18, p. 1563–1566, 2011.
- FAREY, B. J.; NELSON, L. A.; ROLPH, M. G. Rapid technique for the breakdown of organic mercury compounds in natural waters and effluents. **Analyst**, v. 103, n. 1227, p. 656–660, 1978.
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; RUCANDIO, I.; GÓMEZ-PINILLA, I.; BORLAF, F.; GARCÍA, F.; LARREA, M. T. Evaluation of different digestion systems for determination of trace mercury in seaweeds by cold vapour atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 7–12, 2015.
- GAO, Y.; SHI, Z.; ZONG, Q.; WU, P.; SU, J.; LIU, R. Direct determination of mercury in cosmetic samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry after dissolution with formic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 812, p. 6–11, 2014.

GEIER, D. A.; KERN, J. K.; GEIER, M. R. Increased risk for an atypical autism diagnosis following Thimerosal-containing vaccine exposure in the United States: A prospective longitudinal case-control study in the Vaccine Safety Datalink. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 42, p. 18–24, 2017.

GEIER, D. A.; KING, P. G.; HOOKER, B. S.; DÓREA, J. G.; KERN, J. K.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R. Thimerosal: Clinical, epidemiologic and biochemical studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 212–220, 2015.

GIL, S.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Greener analytical method for determination of thiomersal (sodium ethylmercurithiosalicylate) in ophthalmic solutions using sono-induced cold vapour generation-atomic absorption spectrometry after UV/H₂O₂ advanced oxidation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 22, n. 5, p. 569–572, 2007.

HE, H.; ZHU, Z.; ZHENG, H.; XIAO, Q.; JIN, L.; HU, S. Dielectric barrier discharge micro-plasma emission source for the determination of thimerosal in vaccines by photochemical vapor generation. **Microchemical Journal**, v. 104, p. 7–11, 2012.

HOLTKAMP, M.; ELSEBERG, T.; WEHE, C. A.; SPERLING, M.; KARST, U. Complexation and oxidation strategies for improved TXRF determination of mercury in vaccines. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 719–723, 2013.

HURLEY, A. M.; TADROUS, M.; MILLER, E. S. Thimerosal-containing vaccines and autism: a review of recent epidemiologic studies. **The journal of pediatric pharmacology and therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 173–181, 2010.

KORN, M.G.A.; OLIVEIRA, E. Use of organic solvents as additives in inductively coupled argon plasma with atomic emission spectrometric detection. **Spectroscopy Letters**, v. 31, p. 699–715, 1998.

LEOPOLD, K.; ZIERHUT, A.; HUBER, J. Ultra-trace determination of mercury in river waters after online UV digestion of humic matter. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 8, p. 2419–2428, 2012.

LI, C.; LONG, Z.; JIANG, X.; WU, P.; HOU, X. Atomic spectrometric detectors for gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 139–155, 1 mar. 2016.

LIN, C. H.; SU, C. K.; SUN, Y. C. Development of online microdialysis–microfluidic-based photocatalyst-assisted vaporization device–inductively coupled plasma-mass spectrometry hyphenated analytical system for in vivo quantification of the transition of brain extracellular mercury after thimerosal administration. **Microchemical Journal**, v. 154, p. 104569, 2020.

LIMA, E. A.; CUNHA, F. A. S.; JUNIOR, M. M. S.; LYRA, W. S.; SANTOS, J. C. C.; FERREIRA, S. L. C.; ARAUJO, M. C. U.; ALMEIDA, L. F. A fast and sensitive flow-batch method with hydride generating and atomic fluorescence spectrometric detection for automated inorganic antimony speciation in waters. **Talanta**, v. 207, p. 119834, 2020.

MARANHÃO, T. DE A.; SILVA, J. S. A.; ANDRADE, R. M. DE; BASCUÑAN, V. L. A. F.; OLIVEIRA, F. J. S. DE; CURTIUS, A. J. Determination of As and Hg in acetic acid extract by vapor generation coupled to atomic spectrometry for solid waste classification. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 139–146, 2013.

MIRANDA-ANDRADES, J. R.; KHAN, S.; TOLOZA, C. A. T.; ROMANI, E. C.; FREIRE JÚNIOR, F. L.; AUCELIO, R. Q. Thiomersal photo-degradation with visible light mediated by graphene quantum dots: Indirect quantification using optical multipath mercury cold-vapor absorption spectrophotometry. **Spectrochimica Acta - Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 138, p. 81–89, 2017.

NUNES, D. L.; SANTOS, E. P. DOS; BARIN, J. S.; MORTARI, S. R.; DRESSLER, V. L.; MORAES FLORES, É. M. DE. Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 731–736, 2005.

PEDROZO-PENAFIEL, M. J.; MIRANDA-ANDRADES, J. R.; GUTIERREZ-BELEÑO, L. M.; LARRUDÉ, D. G.; AUCELIO, R. Q. Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 215, p. 120938, 2020.

PENAGOS-LLANOS, J.; CALDERÓN, J. A.; NAGLES, E.; HURTADO, J. J. Voltammetric determination of thiomersal with a new modified electrode based on a carbon paste electrode decorated with La_2O_3 . **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 536–542, 2019.

PENG, B.; CHE, D.; HAO, Y.; ZHENG, Y.; LIU, R.; QIAN, Y.; CAO, J.; WANG, J.; ZHANG, Y.; HE, L.; GENG, S. Thimerosal induces skin pseudo-allergic reaction via Mas-related G-protein coupled receptor B2. **Journal of Dermatological Science**, v. 95, n. 3, p. 99–106, 2019.

PEREIRA, L.; MARANHÃO, T. D. A.; FRESCURA, V. L. A.; BORGES, D. L. G. Multivariate assessment of extraction conditions for the fractionation analysis of mercury in oily sludge samples using cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 9, p. 1932–1941, 2019.

PIECH, R.; WYMAZAŁA, J.; SMAJDOR, J.; PACZOSA-BATOR, B. Thiomersal determination on a renewable mercury film silver-based electrode using adsorptive stripping voltammetry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1187–1193, 2016.

POHL, P.; GREDA, K.; DZIMITROWICZ, A.; WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; LESNIEWICZ, A.; JAMROZ, P. Cold atmospheric plasma-induced chemical vapor generation in trace element analysis by spectrometric methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 234–245, 2019.

RIBEIRO, F. A. D. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. DA; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

- ROCHA, V. B.; SCHERRER, M. A. R.; ROCHA, V. B.; SCHERRER, M. A. R. Thimerosal: current sources of contact in Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 376–378, abr. 2014.
- RUIZ-DE-CENZANO, M.; LÓPEZ-SALAZAR, O.; CERVERA, M. L.; LA GUARDIA, M. DE. Non-chromatographic speciation of mercury in mushrooms. **Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1774–1779, 2016.
- SANDOVAL, C.; RANGANATHAN, S.; RAMÍREZ, E.; MANSILLA, H. D.; DINAMARCA, R.; PECCHI, G.; YÁÑEZ, J. Visible light assisted photodegradation of thimerosal by high performance ZnFe₂O₄ /poly(o-phenylenediamine) composite. **Materials Research Bulletin**, v. 116, p. 8–15, 2019.
- SANTOS, J. C. N.; SILVA, I. M. BRAGA, T. C.; FÁTIMA, Â.; FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, J. C. C. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1032–1040, 2018.
- SANTOS, E. J.; HERRMANN, A. B.; SANTOS, A. B. DOS; BAIKA, L. M.; SATO, C. S.; TORMEN, L.; STURGEON, R. E.; CURTIUS, A. J. Determination of thimerosal in human and veterinarian vaccines by photochemical vapor generation coupled to ICP OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 10, p. 1627–1632, 2010.
- SHEKHAR, R. Improvement of sensitivity of electrolyte cathode discharge atomic emission spectrometry (ELCAD-AES) for mercury using acetic acid medium. **Talanta**, v. 93, p. 32–36, 2012.
- SHEKHAR, R.; KARUNASAGAR, D.; DASH, K.; RANJIT, M. Determination of mercury in hepatitis-B vaccine by electrolyte cathode glow discharge atomic emission spectrometry (ELCAD-AES). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 6, p. 875–879, 2010.
- SILVA, R. J. N. B. Spreadsheet for designing valid least-squares calibrations: A tutorial. **Talanta**, v. 148, p. 177–190, 2016.
- SILVA, M. J.; PAIM, A. P. S.; PIMENTEL, M. F.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. **Analytica Chimica Acta**, v. 667, n. 1–2, p. 43–48, 2010.
- SMITH, R. M.; MARTELL, A. E. **Critical Stability Constants, Inorganic Complexes**. Vol. 4, Plenum Press, New York and London, 1976.
- STURGEON, R. E. Photochemical vapor generation: A radical approach to analyte introduction for atomic spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 12, p. 2319–2340, 2017.
- TALL, A.; COSTA, K. R.; OLIVEIRA, M. J.; TAPSOBA, I.; ROCHA, U.; SALES, T. O.; GOULART, M. O. F.; SANTOS, J. C. C. Photoluminescent nanoprobe based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines. **Talanta**, v. 221, p. 121545, 2021.

TORRES, D. P.; BORGES, D. L. G.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. A simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 8, p. 1118–1122, 2009.

VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J.; STURGEON, R. E. Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 4, p. 837–847, 2007.

WU, Q.; ZHU, Z.; LIU, Z.; ZHENG, H.; HU, S.; LI, L. Dielectric barrier discharge-plasma induced vaporization for the determination of thiomersal in vaccines by atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 3, p. 496–500, 2012.

XIAO, Q.; ZHU, Z.; ZHENG, H.; HE, H.; HUANG, C.; HU, S. Significant sensitivity improvement of alternating current driven-liquid discharge by using formic acid medium for optical determination of elements. **Talanta**, v. 106, p. 144–149, 2013.

XU, Q.; WANG, Z.; JIN, L.; LIU, P.; TIAN, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, C. Non-chromatographic separation and determination of thimerosal and inorganic mercury in vaccines by Fe³⁺-induced degradation with cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Analytical Methods**, v. 10, n. 18, p. 2144–2150, 2018.

YIN, Y.; LIU, J.; JIANG, G. Photo-induced chemical-vapor generation for sample introduction in atomic spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1672–1684, 2011.

YEPSEN, O.; CONTRERAS, D.; SANTANDER, P.; YÁÑEZ, J.; MANSILLA, H. D.; AMARASIRIWARDENA, D. Photocatalytic degradation of thimerosal in human vaccine's residues and mercury speciation of degradation by-products. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 41–47, 2015.

ZARĘBA, M.; SANECKI, P. T.; RAWSKI, R. Simultaneous determination of thimerosal and aluminum in vaccines and pharmaceuticals with the use of HPLC method. **Acta Chromatographica**, v. 28, n. 3, p. 299–311, 2016.

ZHANG, J.; CHAO, J.; TANG, Y.; WAN, P.; YANG, X. J.; WONG, C.; BRUCE, M.; HU, Q. Quantification of trace mercury in water: solving the problem of adsorption, sample preservation, and cross-contamination. **Global Challenges**, v. 4, n. 1, p. 1900061, 2020.

ZHANG, Y.; MIRÓ, M.; KOLEV, S. D. A novel on-line organic mercury digestion method combined with atomic fluorescence spectrometry for automatic mercury speciation. **Talanta**, v. 189, p. 220–224, 2018.

ZHENG, H.; HONG, J.; LUO, X.; LI, S.; WANG, MEIXIA; YANG, B.; WANG, M. Combination of sequential cloud point extraction and hydride generation atomic fluorescence spectrometry for preconcentration and determination of inorganic and methyl mercury in water samples. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 806–812, 2019.

4 ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM AMOSTRAS DE COSMÉTICOS MICELARES EMPREGANDO CV AFS

3.1 Introdução

A toxicidade do mercúrio está diretamente relacionada a sua forma química, sendo que, alguns compostos organomercúricos são mais tóxicos que as espécies na forma inorgânica, contudo, ambas as formas (orgânico ou inorgânico) são passíveis de sofrer processo de bioacumulação (JIA *et al.*, 2011; MAMDOUH *et al.*, 2021). Geralmente, a absorção do mercúrio no organismo humano ocorre pelo sistema respiratório ou dérmico e pode causar danos aos rins, sistemas nervoso central, gastrointestinal e imunológico (MORISSET *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2015; LINS *et al.*, 2019). A exposição crônica ao mercúrio pode causar neuropatia periférica, encefalopatia e doença renal intersticial (SOO *et al.*, 2003). Em cosméticos, se os níveis máximos permitidos para os compostos de mercúrio forem excedidos, isso pode resultar em diversos efeitos deletérios (GUO *et al.*, 2020). Assim, para garantir a segurança de produtos cosméticos é vital para estabelecer sua qualidade e boas práticas de uso, sendo um tema de constante pesquisa e atualização pela comunidade científica, a fim de estabelecer níveis seguros de ingredientes nos produtos comercializados. Portanto, monitorar o teor de mercúrio total ou de suas espécies em cosméticos é de suma importância para avaliar o risco de exposição para o consumidor (NOHYNEK *et al.*, 2010; IWEGBUE *et al.*, 2015; MESKO *et al.*, 2020).

Os cosméticos são produtos aplicados diretamente no corpo e sua utilização proporciona rotas potenciais de exposição a espécies tóxicas e potencialmente tóxicas quando estes são passíveis de contaminação (HEPP *et al.*, 2014). Compostos orgânicos de mercúrio podem ser usados em produtos cosméticos para remoção de maquiagem e máscara de cílios (ANVISA, 2012). Os produtos para remoção de maquiagem e limpeza facial, podem ser comercializados na forma de líquidos, géis ou esfoliantes (LORETZ *et al.*, 2008) e apresentam em suas composições diferentes classes e níveis de surfactantes. A presença de compostos desta natureza, tem a função principalmente de fornecer umectância, detergência e formação de espuma para formulação (CASSIDAY, 2016). Deste modo, neste trabalho produtos contendo esta classe de substâncias, foram designados de cosméticos micelares. Nesta categoria estão inclusos a água micelar e os demaquilantes, os quais são aplicados diretamente na pele para remoção de maquiagens, secreções sebáceas e impurezas (REBELLO, 2016).

Os cosméticos micelares, apresentam condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos, principalmente, devido à sua composição orgânica e elevado teor de água,

desta forma, esses produtos podem ser facilmente degradados ou alterados quanto a sua composição química (ALVAREZ-RIVERA *et al.*, 2018; LUNDOV *et al.*, 2009). Assim, para a segurança, prevenção de danos e reações químicas indesejáveis conservantes e substâncias com funções antioxidantes e fotoprotetoras são adicionadas nesses produtos (MAGALHÃES, 2011; ALVAREZ-RIVERA *et al.*, 2018).

Para o mercado brasileiro a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 29/2012 permite a adição de conservantes à base de mercúrio como o timerosal (TH) e sais de fenilmercúrio (FM), em níveis de concentração de até 70 mg L⁻¹ para o produto acabado. A União Europeia (EC n° 1223/2009) preconiza as mesmas concentrações para os conservantes mercuriais e a FDA dos Estados Unidos (U.S. *Food and Drug Administration*, CRF 21/ Parte 700), estabelece concentrações não superiores a 65 ppm (mg kg⁻¹ ou mg L⁻¹). Recentemente, a lista de conservantes permitidos pela ANVISA foi atualizada (RDC n° 528/2021) e o TH e FM foram excluídos da atual resolução, o que mostra mais evidências do risco potencial da utilização de compostos organomercúricos para saúde dos usuários. Contudo, as legislações preconizadas pela EC e FDA, ainda estão em vigência.

Vale ressaltar que nas formulações cosméticas, além dos conservantes, diversos compostos químicos são usados como ingredientes e a pureza desses componentes também deve ser avaliada. Para impurezas decorrentes de matérias-primas ou processo de fabricação de cosméticos, a FDA (CRF 21/700.13), Health Canadá (2012) e Alemanha BfR (025/2006), permitem concentrações de até 1 ppm para o mercúrio total. Ademais, o fato de ser proibido o uso de espécies potencialmente tóxicas para a produção de cosméticos não significa, ausência destas no produto final (BOROWSKA e BRZÓSKA, 2015). Nesta perspectiva, os cosméticos podem ser uma das fontes principais de exposição a espécies potencialmente tóxicas (SALAMA, 2015; PODGÓRSKA *et al.*, 2021), logo, o desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade desses produtos, se faz essencial.

Neste sentido, é crescente a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para determinação de elementos traço, objetivando a certificação e qualidade destes produtos. Para tanto, desenvolver metodologias para quantificar mercúrio em cosméticos micelares é um desafio, dada a complexidade e composição multicomponentes das diferentes matrizes, além disso, metodologias para determinação de mercúrio em produtos cosméticos ainda são pouco reportadas na literatura, e mais restritas quanto aos cosméticos micelares.

Para estratégias analíticas de preparo de amostra em cosméticos como maquiagem, de forma geral, emprega-se digestão convencional e/ou assistida por micro-ondas com uso de ácidos concentrados (MESKO *et al.*, 2020), visto a necessidade de levar a amostra para fase em

solução, e compatibilização desta com as técnicas analíticas para quantificação da espécie de interesse. O tratamento de amostras para determinação de mercúrio, em especial, constitui uma etapa crítica de análise, devido à volatilidade do analito, possível contaminação da amostra, decomposição incompleta ou extração do analito, as quais podem ser fontes de erros sistemáticos e levar a imprecisões nas medições analíticas (ROCHA, *et al.*, 2013; GONZALEZ-RAYAT, 2017; SOUZA, *et al.*, 2018; ASTOLFI, *et al.*, 2019; CERUTTI, *et al.*, 2019).

As maiores dificuldades associadas para análise de cosméticos micelares empregando técnicas espectroanalíticas, é a presença de surfactantes na composição da matriz, os quais produzem espumas, que causam interferências na geração do vapor químico e a instabilidade do sinal analítico (TAKASE *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2014). Frente a isso, a digestão assistida por micro-ondas e a decomposição direta de espécies de mercúrio com auxílio de antiespumantes em meio de ácidos minerais diluídos, foram estratégias de preparo de amostra para cosméticos micelares avaliadas neste trabalho, as quais podem vir a contribuir como futuras alternativas de preparo de amostra simples, rápidas e eficientes.

Neste contexto a espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (CV AFS) apresenta-se como técnica passível de se desenvolver métodos de elevada seletividade, sensibilidade, custo-efetividade instrumental e rapidez de análise, atingindo limites de detecção da ordem de ng L^{-1} (MIRANDA - ANDRADES, *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2018). Vale salientar que a CV AFS também apresenta melhor sensibilidade quando comparada a outras técnicas espectrométricas atômicas, complementarmente viabiliza a introdução contínua da amostra, proporcionando fácil acoplamento com sistemas de injeção de fluxo e cromatografia e, permite a especiação elementar (SABER-TEHRANI *et al.*, 2007; SÁNCHEZ-RODAS *et al.*, 2010; BUTCHER, 2016; LINS *et al.*, 2019). Assim, diante do exposto, no presente trabalho foram desenvolvidas metodologias analíticas baseadas em distintos procedimentos de preparo de amostras para determinação de Hg_{total} em cosméticos micelares por CV AFS.

3.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar as condições instrumentais para as medições analíticas por CV AFS, para as abordagens de preparo de amostra (digestão assistida por micro-ondas e reação de bromação com auxílio de antiespumantes) empregadas nos cosméticos micelares;
- b) Avaliar os métodos desenvolvidos quanto aos parâmetros: concentrações dos reagentes, tempo de reação da mistura complexante-oxidante (KBr/KBrO_3), tipo de ácido, tipo de antiespumante e composição do sistema reacional para digestão por micro-ondas;
- c) Determinar os parâmetros de desempenho dos métodos desenvolvidos;

d) Aplicar as diferentes estratégias de preparo de amostra em cosméticos micelares e comparar os resultados obtidos com os regulamentos estabelecidos pelas legislações vigentes.

3.3 Experimental

3.3.1 Instrumentação

O procedimento de decomposição das amostras de cosméticos micelares (água micelar e demaquilante) foi realizado utilizando radiação de micro-ondas em sistema de digestão fechado e pressurizado, modelo ETHOS ONE (Milestone, Sorilose, Itália), equipado com sensores de temperatura e pressão, rotores (SK-10) com recipientes de 100 mL (volume interno) confeccionados em Teflon quimicamente modificado (TFMTM). De forma geral, a temperatura, pressão e potência máxima de trabalho usada no protocolo foi de 180 °C, 20 bar e 1000 W, respectivamente. As determinações de carbono orgânico dissolvido (COD) nas amostras de cosméticos micelares sem tratamento (água micelar: S1, S2 e S3) e nos respectivos digeridos (S1-D, S2-D e S3-D), foram realizadas no analisador de carbono (TOC-L, Shimadzu, Japão), equipado com amostrador automático ASI-L e detector no infravermelho não dispersivo (NDIR), empregando o método de oxidação catalítica por combustão a 680°C. O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado utilizando o módulo de determinação de nitrogênio (TNM-L), empregando detecção por quimiluminescência. Por fim, ar sintético 5,0 (pureza 99,999%; Oxiteno, Brasil) foi utilizado como gás carreador, com vazão de 250 mL min⁻¹.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) das amostras de cosméticos micelares sem tratamento e digeridas foram obtidos no espectrômetro de ressonância magnética nuclear modelo AVANCE 600 MHz, B₀ = 14,1 T (Bruker, Karlsruhe, Alemanha), equipado com sonda multinuclear direta (BBO) de 5 mm a temperatura de 297 K (~ 24°C).

A determinação das concentrações de mercúrio total, a partir de Hg(II), timerosal (TH) e fenilmercúrio (FM) nas amostras de cosméticos micelares (amostras de água micelar e demaquilante), foram realizadas utilizando um espectrômetro de fluorescência atômica por vapor frio (CV AFS), modelo PSA 10.025 Millennium Merlin (PS Analytical, Orpington, Kent, UK). O equipamento utiliza como fonte de radiação uma lâmpada de cátodo oco de alta intensidade (BDHCL, *Boosted – Discharge Hollow Cathode Lamps*) da Photron (Victoria, Austrália), com comprimento de onda de 253,7 nm. O sistema em fluxo, o controle do equipamento e obtenção dos dados, foi monitorado pelo *software* PSA Millennium. Os parâmetros instrumentais empregados para determinação de mercúrio total são resumidos na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros instrumentais empregados para determinação de mercúrio total por CV AFS.

Parâmetros	Valores
Modo de medição sinal analítico (u. a.)	Altura do pico
Tempo de <i>delay</i> (s)	15
Tempo de análise (s)	40
Tempo de memória (s)	60
Ganho ¹	10 ou 100
Gás carreador argônio UHP 99,999% (mL min ⁻¹)	250
Gás de secagem ar sintético super seco 99,999% (mL min ⁻¹)	2500
Solução carreadora HCl ou HNO ₃ (mL min ⁻¹)	9,0
Amostras e padrões (mL min ⁻¹)	9,0
Solução redutora SnCl ₂ (mL min ⁻¹)	4,5

¹O parâmetro instrumental relacionado ao ganho analítico foi definido em função do intervalo de concentração de mercúrio na curva analítica e amostras analisadas.

Fonte: Autora, 2021.

3.3.2 Reagentes, soluções e amostras

Em geral, para todos os experimentos reagentes de grau analítico da Sigma-Aldrich (Missouri, USA) ou Merck (Darmstadt, Alemanha), foram empregados sem purificação prévia. Os brancos analíticos foram preparados diariamente para assegurar ausência de contaminação das soluções. Em todos os procedimentos no preparo das soluções utilizou-se água ultrapura (condutividade < 0,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$) proveniente do purificador Master System MS2000 (Gehaka, Brasil). As soluções de referência para curva analítica, foram preparadas, a partir de diluições sequenciais da solução padrão de mercúrio inorgânico (1000 mg L⁻¹, Specsol® - 92786-62-4, rastreabilidade NIST, USA). Para o procedimento de digestão por micro-ondas e determinação da acidez residual empregou-se HNO₃ (14 mol L⁻¹), H₂O₂ 30% (m/ m), solução de NaOH padronizada (0,0910 mol L⁻¹±0,0007), biftalato de potássio sólido, e fenolftaleína 0,2% (m/v) em etanol.

Para determinação direta de mercúrio total o sistema complexante-oxidante aplicado foi preparado pela combinação de volumes idênticos das soluções de KBr (200 mmol L⁻¹) / KBrO₃ (34 mmol L⁻¹). Solução de ácido ascórbico 12% (m/v) foi usado para remoção do excesso de bromo (Br₂) gerado no meio e a acidez final foi ajustada com HCl ou HNO₃. Álcool amílico 98% (v/v) (Dinâmica, Brasil) e álcool isoamílico 98% (v/v) (Neon, Brasil) foram utilizados no preparo de amostra de cosméticos micelares para desestabilização da espuma (antiespumante) no meio de reacional. Adicionalmente, os antiespumantes A, B e 204 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) a partir do preparo de solução estoque de 50% (v/v) em meio ácido (HCl 5%, v/v) (ZHENG *et al.*, 2019).

As soluções de H_3PO_4 3 mol L^{-1} (acidificante), hidrogenoftalato de potássio 20 mmol L^{-1} (carbono orgânico dissolvido / carbono total dissolvido) e a mistura Na_2CO_3 e NaHCO_3 80 mmol L^{-1} (carbono inorgânico dissolvido) foram empregadas no método indireto para determinação de COD, enquanto, para as análises de nitrogênio total o KNO_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizado. Por fim, para construção das curvas analíticas ($1 - 1200 \text{ mg L}^{-1}$) de todas as soluções padrão, diluições sequenciais foram efetuadas, a partir das soluções estoques de carbono e nitrogênio. O valor das concentrações de COD foi obtido a partir da diferença entre os teores de CTD e CID.

Para geração de vapor químico a solução redutora de SnCl_2 90 mmol L^{-1} foi preparada em HCl 5 mol L^{-1} . A depender da condição da amostra, empregou-se diferentes soluções carreadoras, sendo que para os sistemas digeridos em micro-ondas utilizou-se HNO_3 5% (v/v), enquanto para o procedimento de oxidação direta o HCl 20% (v/v). Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas diariamente, exceto as soluções timerosal 50 mg L^{-1} e acetato de fenilmercúrio 50 mg L^{-1} , preparadas mensalmente e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Os materiais de polietileno e vidrarias utilizadas com antiespumantes, foram submetidos a um sistema rigoroso de depuração (pré-limpeza com solução de acetona 10% v/v, imersão em solução de detergente neutro 5% v/v por 12 h, enxague com água corrente e água destilada, nesta sequência). Em seguida, os materiais foram mantidos por 24 h, em solução de HNO_3 10% (v/v), e posteriormente lavados com água ultrapura. O processo de secagem foi realizado a temperatura ambiente.

3.3.3 Amostras de cosméticos micelares

Amostras de cosméticos micelares de diferentes lotes e marcas comumente utilizadas para limpeza facial (água micelar, mousse demaquilante e loção demaquilante), foram adquiridas em estabelecimentos comerciais (Maceió, Alagoas, Brasil). Seis amostras foram analisadas e codificadas como S1 a S6. Na Tabela 14, estão sumarizadas as formulações cosméticas (S1 - S6) utilizadas no desenvolvimento e validação do método proposto e os principais conservantes e surfactantes. Além disso, outros componentes podem estar presentes nestas formulações como emolientes, fragrâncias, hidratantes, antioxidantes, complexantes, clarificantes, e compostos para ajuste de pH.

Tabela 14 - Tipos de soluções removedoras de maquiagem e principais conservantes e surfactantes presentes na formulação, utilizadas na otimização do método para determinação de Hg_{total} .

Amostras	Tipo	Conservante	Surfactante
S1	Água micelar	Fenoxietanol	Cloreto de cetrimônio e cloreto de cetilpiridínio
S2	Água micelar	Biguanida de poliaminopropila	Poloxamer 184 e cocoanfodiacetato dissódico
S3	Água micelar	Benzoato de sódio, metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona	Poloxamer 184, cocamidopropil betaína e cocoanfoacetato de sódio
S4	Água micelar	DMDM hidantoína	Decil Glucosídeo, cocoato de glicerila PEG-7 e polisorbato 20
S5	Mousse demaquilante	Fenoxietanol, etilisotiazolinona, metilparabeno e propilparabeno	Decil glucosídeo, lauril éter sulfato de sódio, lauril éter sulfosuccinato dissódico, cocoato de glicerila PEG-7 e cocamidopropil betaína
S6	Loção demaquilante	Fenoxietanol e cloreto de benzetônio	Poloxamer 124; óleo de rícino hidrogenado PEG-40 e isosterato-20

Fonte: Adaptado CosIng (2021).

3.3.4 Preparo de amostra para análise de COD e NT

As análises de COD e NT foram realizadas nas amostras digeridas e não digeridas. Inicialmente as amostras de cosméticos micelares (água micelar) foram mineralizadas por sistema micro-ondas, em seguida, a solução obtida foi ajustada com NaOH para uma condição próxima a neutralidade (pH 7,0 - 7,3), resultando em um volume final de 20 mL. Para as amostras de água micelar não digeridas, 1,0 mL de cada amostra foi diluído com água ultrapura para 20 mL (pH 7,0 - 7,5; sistema controle). Posteriormente, as amostras foram filtradas com filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 μm e acidificadas com H_3PO_4 3 mol L^{-1} .

3.3.5 Preparo das amostras para análise por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H)

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos para as amostras de cosméticos micelares (água micelar) digeridas e não digeridas. O preparo das amostras seguiu o mesmo procedimento descrito para análise por COD e NT (exceto a acidificação com H_3PO_4). Em seguida, para 300 μL das amostras se adicionou 300 μL de D_2O (99,9% em deutério) e 25 μL de TMSP- d_4 (trimetilsilil-2,2,3,3- d_4 propionato de sódio) a 2 mmol L^{-1} . Após homogeneização, a solução final foi transferida para um tubo de RMN de 5 mm. Por fim, os espectros unidimensionais para o núcleo de hidrogênio foram obtidos, utilizando supressão do sinal da água empregando a sequência de pulsos *noesypr1d* (denominação Bruker) com um total de 32 *scans*.

3.3.6 Digestão das matrizes cosméticas

Para determinação da concentração de mercúrio total nas amostras de cosméticos micelares foi usado o procedimento de digestão assistida por micro-ondas, como método de referência para o preparo da amostra. Assim, 1,0 mL de cada amostra foi inserido nos vasos de reação (TFMTM), seguido de 5 mL de HNO₃ (14 mol L⁻¹) e 3 mL de água ultrapura. Devido a variedade de compostos passíveis de sofrerem reações de nitratação e gerarem derivados instáveis (DUVAL, 2019), as amostras foram pré-digeridas a temperatura ambiente por 1 h e, em seguida, foram acrescentados 3 mL de H₂O₂ (30 % m/m) ao meio de reação. Por fim, os reatores foram devidamente fechados e inseridos no rotor do micro-ondas e o programa de aquecimento (Tabela 15), foi iniciado.

Tabela 15 - Programa para digestão das amostras de cosméticos por radiação micro-ondas.

Etapa	Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
I	15*	700	¹ TA – 130
II	20**	700	130
III	15*	1000	130 – 180
IV	20**	1000	180

¹TA = temperatura ambiente // *Tempo de rampa de aquecimento // **Tempo de patamar

Fonte: Autora, 2021.

Todas as digestões foram realizadas em triplicata ($n = 3$) e para cada procedimento três reatores continham soluções do branco analítico. Finalizada as etapas supramencionadas (Tabela 15), os reatores foram mantidos sob ventilação por 20 min, posteriormente foram abertos e mantidos em repouso por 2 h, para volatilização dos óxidos de nitrogênio remanescentes e arrefecimento do material digerido. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico e diluída com água ultrapura para um volume de 25,0 mL. A acidez residual foi determinada utilizando solução padronizada de NaOH (0,0910 mol L⁻¹ ± 0,0007) e fenolftaleína (0,2% m/v) a partir de volumetria ácido-base empregando agitador magnético (modelo Topolino 50.067944, IKA, Brasil) e bureta de 25,00 mL. Diluições dos digeridos foram realizadas para compatibilização do nível de concentração da curva analítica. Assim, quando empregou-se menor sensibilidade (curva analítica em Hg(II) de 0,50 – 20 µg L⁻¹, ganho de 10) empregou-se solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹ para correção da acidez residual, ao passo que para uma maior sensibilidade (curva analítica em Hg(II) de 0,10 – 2,0 µg L⁻¹, ganho de 100) empregou-se solução de HNO₃ 3 mol L⁻¹ para correção da acidez residual. Adicionalmente, foi empregada uma etapa adicional de tratamento das amostras digeridas. Assim, após mineralização, para redução do Hg(II) ao estado elementar (Hg⁰) adicionou-se 0,50 mL da mistura KBr/KBrO₃ (100/17 mmol L⁻¹) e 40 µL de ácido ascórbico 12% (m/v). Posteriormente

foi empregada solução redutora de SnCl_2 (90 mmol L^{-1}) e solução carreadora HNO_3 5% (v/v) para as determinações dos analitos por CV AFS.

Uma vez que materiais de referência certificados (CRM) contendo timerosal e fenilmercúrio são ausentes para amostras de cosméticos, empregou-se ensaio de adição e recuperação. Assim, as amostras (S1, S2, S3) foram fortificadas e preparadas em triplicata ($n = 3$), em dois diferentes níveis de concentrações para cada ciclo de digestão, resultando na concentração final $0,50$ e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Hg(II) (como Hg_{ino}) e $1,0$ e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o timerosal e fenilmercúrio (espécies derivadas de Hg_{org}). Para estas condições, as curvas analíticas foram compatibilizadas em diferentes concentrações de HNO_3 ($0,2$ e $0,4 \text{ mol L}^{-1}$), de acordo com as condições de fortificações. Por fim, a limpeza dos vasos de digestão foi realizada usando 10 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} no forno micro-ondas, por 5 min a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ e potência de 1000 W . Após esse processo, os reatores permaneceram por no mínimo 12 h , imersos em solução HNO_3 10% (v/v) (BIZZI, *et al.*, 2011).

3.3.7 Determinação de mercúrio total em cosméticos micelares por CV AFS

Como as matrizes analisadas contêm uma ampla diversidade de surfactantes (não-iônicos, catiônicos, aniônicos e *zwitteriônicos*), durante o preparo da solução para análise ocorre a formação de espumas no meio reacional, e por conseguinte, levando a redução do sinal analítico para análise direta por CV AFS. Portanto, diferentes sistemas com capacidade antiespumante foram avaliados, os quais foram selecionados com base em aplicações descritas na literatura para matrizes cosméticas ou matrizes nas quais a espuma gerou algum tipo de interferência durante a análise (LAVILLA *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2014; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2019).

3.3.7.1 Álcool amílico e isoamílico como agentes antiespumantes

Para execução do método de determinação de mercúrio total adicionou-se $2,0 \text{ mL}$ das amostras de cosméticos micelares (S1, S2 e S3), 6 mL de HCl $2,5 \text{ mol L}^{-1}$, seguidamente as fortificações em triplicata ($n = 3$) para os níveis de concentração de $2,5$; $5,0$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para Hg(II) e $5,0$; 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para TH e FM foram realizadas. Na sequência, a oxidação do Hg_{org} foi realizada a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) acrescentando-se $0,50 \text{ mL}$ da mistura $\text{KBr} / \text{KBrO}_3$ (100 e 17 mmol L^{-1}) e aguardou-se 5 min para a reação se processar (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Por fim, $40 \mu\text{L}$ da solução de ácido ascórbico 12% (m/v) foi adicionado para remoção do excesso de bromo gerado, 2 mL de álcool amílico ou isoamílico (agentes antiespumantes) e água ultrapura para um volume final de $25,0 \text{ mL}$. Solução redutora de SnCl_2 (90 mmol L^{-1}) e

solução carreadora HCl 20% (v/v) foram usadas para as medições da concentração de mercúrio total por CV AFS.

3.3.7.2 Compostos derivados de éteres e a base de silicone como agentes antiespumantes

Nesta etapa, foram analisados os antiespumantes: A (polímero de silicone ativo 100%), B (emulsão aquosa de silicone 10% em dimetilpolissiloxano) e 204 (mistura de dispersões de poliéter orgânico). Para quantificação de mercúrio total nas condições otimizadas a concentração final de todos os antiespumantes foi 0,25% (v/v) nas soluções padrão e amostras (S1, S2 e S3). A determinação de mercúrio total por CV AFS seguiu os protocolos descritos no item 3.3.7.1 e no trabalho de Oliveira *et al.* (2021).

3.3.8 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados experimentais foram expressos em termos de média e desvio padrão (SD) ($n = 3$). Para avaliações de múltiplos sistemas a análise de variância (ANOVA) foi aplicada para um nível de confiança de 95%. Para validação das curvas analíticas, o teste de Levene (modificado por Brown e Forsythe em 1974), assim como, testes de significância da regressão e falta de ajuste foram empregados em conjunto para verificação da linearidade e dos modelos obtidos (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; SILVA, 2016). Por fim, o *software* Origin 2020 (Microcal Software, Northampton, MA, USA) foi utilizado para construção dos gráficos e análise dos dados.

3.4. Resultados e Discussão

Neste trabalho foram avaliadas duas abordagens distintas de preparo da amostra: (i) digestão assistida por micro-ondas e (ii) uso de oxidação direta com auxílio de antiespumantes. Na digestão assistida por micro-ondas foi utilizado ácido concentrado (HNO_3 14 mol L^{-1}), oxidante auxiliar (H_2O_2 30% m/m), elevada temperatura e pressão (180°C e 20 bar), enquanto, no método oxidativo direto empregou-se solução de ácido diluído (HCl 0,6 mol L^{-1}) e o procedimento analítico foi realizado a temperatura ambiente. Além disso, a digestão assistida por micro-ondas foi utilizada como procedimento de referência para estabelecer comparativamente a eficiência de oxidação de TH e FM a Hg(II) nas amostras de cosméticos micelares.

3.4.1. Estudos preliminares

Os ensaios preliminares deste trabalho foram executados visando alcançar as melhores condições experimentais quanto ao preparo de amostras (digestão assistida por micro-ondas e decomposição oxidativa direta), assim como, o melhor ajuste para os parâmetros instrumentais para a determinação de mercúrio total por CV AFS (Apêndice B). Portanto, para os estudos com TH, FM e Hg(II) nas amostras de cosméticos micelares, empregou-se as condições experimentais preconizadas por Oliveira *et al.* (2021), com adaptações.

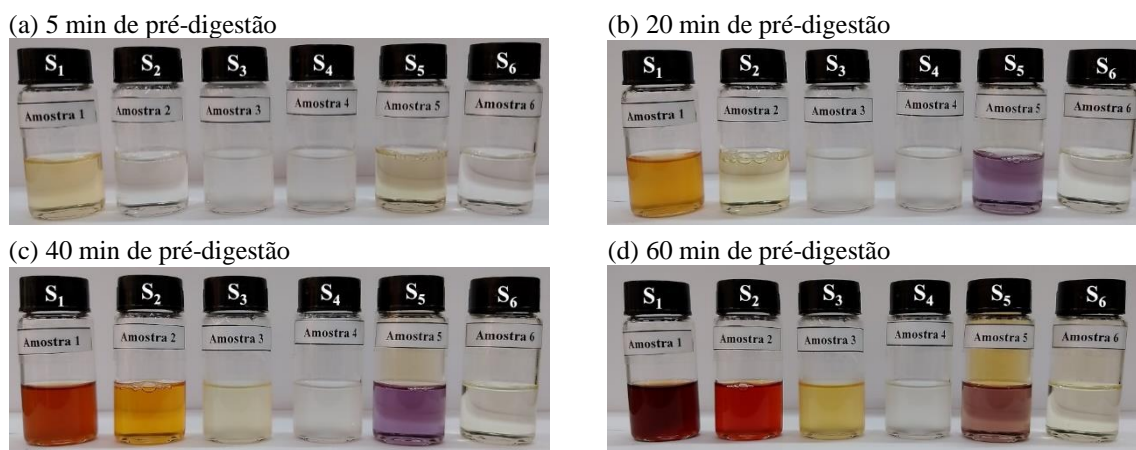
3.4.2 Avaliação da pré-digestão e digestão das amostras cosméticas

Devido à complexidade e elevada diversidade de componentes presentes nas amostras de cosméticos micelares como, por exemplo: surfactantes, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, solventes, emolientes, emulsificantes, fragrâncias e sobretudo álcoois de cadeia alquílica curta, dentre outros (SALVADOR, 2007; REBELLO, 2016). Desta forma, para decomposição das amostras optou-se por inserir uma etapa adicional no protocolo de digestão, considerando a possibilidade de ocorrer a reação do HNO_3 com álcoois constituintes das amostras, levando a formação de compostos instáveis (como nitratos de alquila), os quais são altamente reativos e ao serem aquecidos, podem ocasionar explosões (DUVAL, 2019).

Portanto, foi necessário considerar este tipo de risco, para aplicabilidade do método proposto nas amostras de cosméticos micelares. Assim, no procedimento experimental foi implementado a etapa de pré-digestão com duração de 1 h em temperatura ambiente (média de

25°C), para quatro amostras de água micelar e duas amostras de demaquilantes (S1 - S6). A Figura 11, apresenta os aspectos dos sistemas reacionais pré-digeridos em meio ácido.

Figura 11 - Aspectos das amostras cosméticas pré-digeridas. Condições experimentais: 1,0 mL da amostra; 3,0 mL água ultrapura e 5,0 mL HNO₃ (14 mol L⁻¹), temperatura ambiente, pré-digestão de 5 a 60 min.



Fonte: Autora, 2021.

Com base no aspecto visual dos pré-digeridos (S1 - S6) observou-se maior variação da coloração inicial das amostras de cosméticos micelares S1, S2, S3 e S5, possivelmente devido a reação dos componentes do meio com HNO₃. À medida que ocorria a decomposição da matéria orgânica em temperatura ambiente, a quantidade de gases gerados (óxidos de nitrogênio), se tornava mais acentuada, principalmente para as amostras S5 e S6. Com base, nestes parâmetros de pré-digestão e digestão, constatou-se que aplicar o protocolo experimental para volumes das amostras superiores a 1,0 mL era inviável, visando a eficiência de decomposição do material orgânico, bem como garantir, a segurança, integridade e ausência de danos no equipamento durante o preparo de amostras. Uma vez que, para volumes de amostra da ordem de 2,0 mL ocorreu dano ao frasco de reação (teflon) com expansão e inutilização do mesmo em função do aumento da pressão (acima de 50 bar). Desta forma, o volume de 1,0 mL foi adotado para os ensaios subsequentes.

Após otimização da etapa de pré-digestão, as amostras foram submetidas a digestão assistida por micro-ondas. As soluções resultantes apresentaram acidez final de $5,95 \pm 0,16$ mol L⁻¹ ($n = 3$) e HNO₃ 3 mol L⁻¹ foi utilizado para o ajuste da acidez dos digeridos visando a determinação de Hg_{total}. Os resultados obtidos para as seis amostras de cosméticos micelares foram similares e verificou-se que as concentrações de Hg_{total} estavam abaixo do limite de detecção da técnica de CV AFS (0,10 µg L⁻¹).

Por fim, selecionou-se as amostras S1, S2 e S3 para a validação do método utilizando digestão assistida por micro-ondas e para a aplicação dos procedimentos de digestão direta empregando antiespumantes, a seleção das amostras foi baseada nos aspectos visuais de mudança de coloração observados durante a pré-digestão, conferindo possivelmente maior complexidade, assim como, foi considerada a acessibilidade e disponibilidade para obtenção dos cosméticos micelares, nos estabelecimentos comerciais locais. Em todos estes estudos, previamente ao tratamento da amostra, foi realizada a adição de soluções com concentrações conhecidas dos analitos na forma inorgânica (Hg(II)) e nas formas orgânicas (TH e FM) e as recuperações para cada espécie foram avaliadas quanto ao possível efeito de matriz.

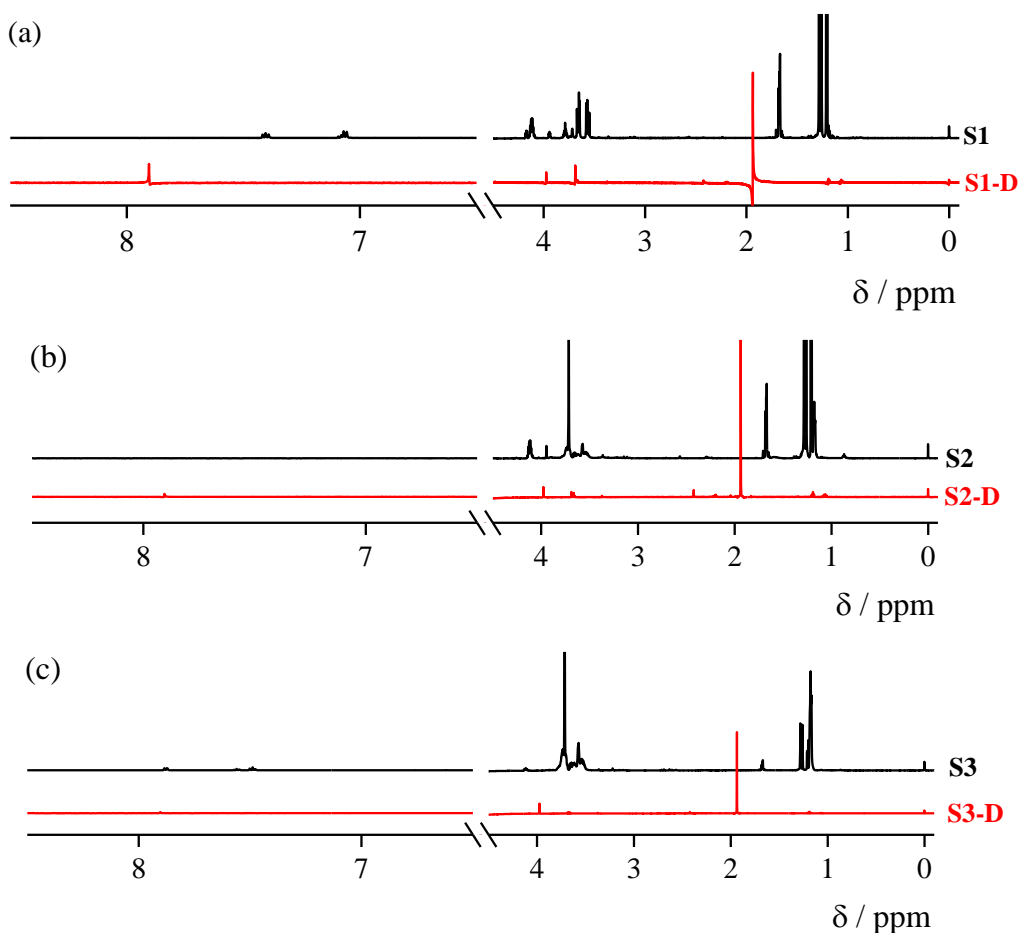
3.4.3 Avaliação da eficiência da digestão assistida por micro-ondas para as amostras de cosméticos micelares

Para avaliação da eficiência do procedimento de digestão comparou-se as amostras de cosméticos micelares (S1, S2 e S3) sem tratamento (*in natura*) e nos digeridos resultantes da decomposição assistida por micro-ondas, quanto ao perfil dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) e os teores de carbono orgânico dissolvido total e nitrogênio total.

3.4.3.1 Uso de RMN ¹H na avaliação da eficiência do processo de digestão

A ressonância magnética nuclear tem sido usada em estudos para avaliação do perfil de composição orgânica de diferentes matrizes e, quando possível, na identificação de produtos de decomposição após procedimentos de preparo de amostra (ARAÚJO *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2009; BARIN, *et al.*, 2014; PINTO, *et al.*, 2019; GARRITA *et al.*, 2021; MAGALHAES *et al.*, 2021). Entretanto, a utilização de RMN para avaliação de protocolos de tratamento de amostra em matrizes cosméticas, ainda é escassa. Neste trabalho, estudos por RMN ¹H foram realizados em amostras de cosméticos micelares *in natura* (S1, S2 e S3) e nas soluções resultantes da digestão assistida por micro-ondas (S₁D, S₂D e S₃D), explorando o perfil espectral relativo aos deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios (Figura 12).

Figura 12 - Perfil dos espectros de RMN ^1H para amostras de cosméticos micelares sem tratamento e após a digestão assistida por micro-ondas. (a) S1 antes e após digestão (S1-D); (b) S2 antes e após digestão (S2-D); (c) S3 antes e após digestão (S3-D). O corte realizado de 4,5 - 6,5 ppm representa a região referente ao sinal da água.



Fonte: Autora, 2021.

Verificou-se que as amostras de cosméticos sem o procedimento de digestão (Figura 12) apresentaram uma variedade de sinais, os quais estão relacionados a diferentes compostos orgânicos (considerando a composição descrita das amostras). Os principais sinais observados são relativos a hidrogênios alifáticos, sendo que de 0,8 a 2,0 ppm seriam referentes a grupos como $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$, possivelmente presentes em surfactantes com elevada cadeia alquílica. Sinais de 3,0 a 4,5 ppm podem ser associados a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, enquanto, os sinais de 6,5 a 8,0 ppm foram associados aos hidrogênios aromáticos (PAVIA *et al.*, 2012).

Nos espectros para as amostras digeridas (Figura 12), a análise por RMN ^1H mostrou uma redução substancial da carga orgânica. O surgimento de dois singletos na região de hidrogênios alifáticos (1,94 e 3,97 ppm) e outro na região dos aromáticos (7,90 ppm), correspondem a produtos de decomposição da matriz orgânica original, possivelmente

relacionados a formação de nitrocompostos alifáticos e aromáticos (BARIN *et al.*, 2014; GONZALEZ *et al.*, 2009). Araújo *et al.* (2002), aplicaram a digestão assistida por micro-ondas utilizando diferentes concentrações de HNO₃ em amostras de plantas e nos espectros de RMN ¹H das soluções digeridas foi observado um singlete intenso em 5,86 ppm atribuído a nitrocompostos alifáticos. Adicionalmente, nos digeridos de amostras de farinha de arroz e fígado bovino, foi observado um singlete em 2,10 e 9,0 ppm; os quais, podem estar relacionados a nitrocompostos oriundos da decomposição da amostra (GARRITA *et al.*, 2021).

É importante ressaltar, que a maioria dos estudos relacionados ao preparo de amostra, reportados na literatura com aplicações da técnica de RMN ¹H, são focados em matrizes sólidas. Dessa forma, apenas as soluções digeridas, em muitas ocasiões com diferentes concentrações de ácido mineral são os sistemas avaliados (ARAÚJO *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2009; GARRITA *et al.*, 2021). Deste modo, como o estado físico da amostra antes e após a digestão são distintos (sólido e solução), uma comparação direta torna-se inviável. Assim, este trabalho contribui com a comparação do perfil espectral antes e após a digestão, uma vez que o estado físico da amostra não sofre alteração, e assim, permitindo a obtenção dos espectros de RMN ¹H.

Neste contexto, o uso do perfil espectral de RMN ¹H, pode ser uma alternativa interessante para avaliar a eficiência do processo de digestão, comparando-se as variações dos perfis espectrais das amostras de cosméticos micelares (antes e após digestão). Contudo, esta técnica apresenta limitação para avaliação da redução da carga orgânica das amostras, pois, apenas a comparação dos sinais referentes aos hidrogênios (alifáticos e aromáticos) não é o melhor parâmetro. Quando ocorre a oxidação parcial dos carbonos ligados a hidrogênio, os produtos gerados (carbono oxigenados) não são passíveis de serem monitorados por RMN ¹H, mas a simplificação espectral será observada. Uma alternativa seria a obtenção dos espectros de RMN ¹³C, entretanto, os elevados tempos de acumulação (horas), menor sensibilidade e caráter não quantitativo para obtenção destes dados, constitui um obstáculo para implementação da técnica. Assim, com a finalidade de avaliar de forma mais efetiva o perfil dos digeridos, em comparação com as amostras *in natura*, nos resíduos orgânicos remanescentes, as concentrações de carbono orgânico dissolvido foram determinadas.

3.4.3.2 Teor de carbono orgânico dissolvido (COD) e nitrogênio total (NT) na avaliação da eficiência do processo de digestão

O carbono orgânico dissolvido (COD) foi estabelecido como parâmetro para avaliar quantitativamente a eficiência do processo de digestão. Para tanto, as concentrações de COD foram avaliadas nas amostras de cosméticos micelares antes e após a digestão assistida por micro-ondas. Adicionalmente, analisou-se as concentrações de nitrogênio total (NT). A Tabela 16, exibe os resultados obtidos para as amostras S1, S2 e S3.

Tabela 16 - Concentração de COD e NT para as amostras de cosméticos ($n = 3$).

Amostra	Sem tratamento (g L ⁻¹)		Digerido (g L ⁻¹)		Redução do teor de carbono (%)
	COD	NT	COD	NT	
S1	21,38 ± 0,64	0,073 ± 0,002	8,18 ± 0,25	22,80 ± 0,68	62
S2	20,93 ± 0,63	0,47 ± 0,01	7,62 ± 0,23	17,40 ± 0,52	64
S3	27,06 ± 0,81	0,23 ± 0,01	5,41 ± 0,16	20,08 ± 0,60	80

Fonte: Autora, 2021.

As amostras de cosméticos micelares sem tratamento apresentaram reduzida concentração de nitrogênio, a qual pode ser relativa à composição da matriz. Contudo, como esperado, após o processo de digestão a concentração total de nitrogênio (NT) aumentou consideravelmente devido a utilização do HNO₃ no processo de preparo da amostra em sistema fechado (Tabela 16). Na digestão assistida por micro-ondas, dependendo da natureza refratária da matriz e das condições de reação (concentração do ácido e oxidantes auxiliares) e instrumentais (temperatura e pressão), empregadas para promover o processo de oxidação, alguns compostos orgânicos podem ser parcialmente oxidados, permanecendo dissolvidos nos digeridos finais (NÓBREGA *et al.*, 2012; BIZZI *et al.*, 2017). Deste modo, para o protocolo estabelecido, a eficiência da decomposição da matéria orgânica foi avaliada, comparando-se as concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) nas amostras antes e após o procedimento de digestão. As concentrações de COD obtidas para as soluções digeridas reduziram de 62 a 80% para as amostras empregadas (S1, S2 e S3). É válido ressaltar a complexidade das matrizes analisadas, devido a presença de compostos orgânicos recalcitrantes (surfactantes), presentes nos cosméticos micelares contribuindo para as concentrações relativamente altas de COD (5,41 a 8,18 g L⁻¹), nos digeridos.

O aumento da concentração de HNO₃/H₂O₂ ou tempo de digestão seriam estratégias que poderiam ser empregadas, para redução da carga orgânica residual, contudo, tais procedimentos levariam a maiores valores do branco, consumo de reagentes e redução da frequência analítica. Considerando que a geração de vapor químico não necessita da oxidação completa da matriz,

pois, o essencial seria a disponibilidade do analito no meio (TSALEV, *et al.*, 1992; WELZ e SPERLING, 1999), considerou-se que não teriam efeitos deletérios para determinação de mercúrio total nos cosméticos micelares, visto que, o íon Hg(II) no digerido deveria estar fracamente ligada aos componentes oriundos da amostra. Assim, esta condição de digestão foi empregada em todas as amostras.

3.4.4 Parâmetros de desempenho e curva analítica para digestão por micro-ondas

Os parâmetros de desempenho analítico linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, e limite de quantificação, foram estabelecidos em ensaios com solução padrão Hg(II) e amostras de cosméticos micelares fortificadas. A validação das metodologias desenvolvidas, foi conduzida de acordo com os parâmetros avaliados e critérios de aceitabilidade preconizados pelas normas orientativas (THOMPSON *et al.*, 2002; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

Para avaliação da linearidade, as curvas analíticas foram preparadas em meio ácido (HNO_3 0,20 e 0,40 mol L⁻¹), em seis níveis de concentrações do padrão analítico, com três replicatas independentes para cada nível (THOMPSON *et al.*, 2002). A linearidade para o intervalo de concentrações do método analítico foi estimada conforme preconizado pelo INMETRO (2018), uma vez que a avaliação da linearidade somente por meio do coeficiente de correlação de Pearson (r) é um parâmetro limitado (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; ARAÚJO, 2009; FARIAS, *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2021).

Frente a isso, para validação das curvas analíticas a homocedasticidade do modelo foi avaliada pelo teste de Levene modificado (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; INMETRO 2018) e o teste de significância da regressão e falta de foi realizado por meio da análise de variância (ANOVA), a um nível de 95% de confiança (SILVA, 2016). E, para esta verificação foram calculados os valores de regressão, resíduo, falta de ajuste e erro puro, para o intervalo de concentração avaliado (0,10 - 2,0 µg L⁻¹). Os resultados para análise da linearidade nas condições estabelecidas para as curvas analíticas estão sumarizados na Tabela 17.

Tabela 17 - Teste de homocedasticidade das variâncias para as curvas analíticas para o método de referência ($n = 6$).

HNO ₃ (mol L ⁻¹)	Graus de liberdade		Quadrado da média		^a F	^b p
	Efeito	Erro	Efeito	Erro		
0,20	5	12	201	339	0,5929	0,7062
0,40	5	12	1798	2933	0,6130	0,6923

^aF_{crítico} = 3,106 // ^bα = 0,05.

Fonte: Autora, 2021.

Os resultados obtidos pelo teste de Levene modificado ($\alpha = 0,05$, para um nível de confiança de 95%) indicaram que para todo intervalo de concentração (em ambas as concentrações de HNO_3), as variâncias residuais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), comprovando o comportamento homocedástico, e assim, evidenciando a relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de Hg_{total} . Seguidamente, para o modelo de regressão linear obtido para as curvas analíticas, avaliou-se a significância estatística e ajuste do modelo aplicando ANOVA (Tabela 18).

Tabela 18 - ANOVA para o modelo de regressão linear obtido pelo método de referência.

HNO_3 (molL ⁻¹)	Fonte de variação	^a SQ	^b GL	^c MQ	^d F
0,20	Modelo	3630270	1	3630270	6564,736
	Resíduo	8847,90	16	553,0	
	Falta de ajuste	1015,1	4	253,8	0,3888
	Erro puro	7832,8	12	652,7	
0,40	Modelo	5237060	1	5237060	851,832
	Resíduo	98368,0	16	6148,0	
	Falta de ajuste	4115,2	4	1028,8	0,1310
	Erro puro	94252,8	12	7854,4	

^aSQ: soma dos quadrados // ^bGL: graus de liberdade // ^cMQ: média dos quadrados // ^dF_{crítico} = 4,49 // ^dF_{crítico} = 3,26.

Fonte: Autora, 2021.

A partir dos resultados obtidos na análise de variância, observou-se que ($F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$), para os diferentes níveis de concentrações no intervalo estabelecido, para o procedimento analítico, confirmando que o modelo de regressão linear é adequado para o método proposto (estatisticamente significativo) e os resultados do teste de homogeneidade das variâncias corroboram com esta conclusão. Além disso, a avaliação da soma residual dos quadrados, constatou-se que $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$, logo, a falta de ajuste não significativa foi observada para as curvas analíticas, e dessa forma, o ajuste do modelo obtido é viável, considerando um nível de 95% de confiança (RIBEIRO *et al.*, 2008; FARIAS *et al.*, 2015).

Após a validação das curvas analíticas os parâmetros de desempenho para o método proposto foram estimados (Tabela 19). Para os diferentes níveis de acidez das curvas validadas, os parâmetros analíticos de desempenho apresentaram LOD iguais a 18 e 20 ng L⁻¹, respectivamente. Os valores obtidos foram compatíveis com a técnica de detecção empregada e adequados para a metodologia desenvolvida. A avaliação da precisão em termos de repetitividade (intra-ensaios) foi avaliada para dois diferentes níveis de concentrações e os resultados foram concordantes com as preconizações das normas de validação (RSD < 5%), ressaltando-se que são inferiores aos valores sugeridos pela AOAC (2016) para o nível de

concentração estudado (RSD máximo, 20%), assim, o método proposto mostrou-se sensível e preciso para quantificação de Hg_{total} em amostras de cosméticos micelares.

Tabela 19 - Parâmetros de desempenho do método proposto para determinação de mercúrio por CV AFS.

Parâmetro	HNO_3 (mol L ⁻¹)	
	0,20	0,40
^a Curva analítica ($n = 6$)	IF = $730(\pm 9) \times C_{Hg} + 28 (\pm 10)$	IF = $877(\pm 30) \times C_{Hg} + 67 (\pm 32)$
Coeficiente de correlação, r	0,9988	0,9907
Faixa de trabalho ($\mu g L^{-1}$)	0,10 - 2,0	0,10 - 2,0
^b LOD ($\mu g L^{-1}$)	0,018	0,020
^c RSD, % ($n = 10$)		
0,30 $\mu g L^{-1}$	4,07	4,66
1,5 $\mu g L^{-1}$	1,45	2,63

^aAs equações de regressão linear associadas às medidas de intensidade da altura de pico (IF) e concentração de Hg_{total} ($\mu g L^{-1}$) foram descritas pela equação: IF = (inclinação) $\times C_{Hg}$ + (intercepto), com C_{Hg} sendo a concentração de Hg(II) ($\mu g L^{-1}$). ^bO limite de detecção (LOD) foi calculado como $3 \times s_b / S$, s_b sendo o desvio padrão para medições do branco analítico ($n = 10$) e S (inclinação da curva analítica). ^cO desvio padrão relativo (RSD) correspondente a dez medições independentes ($n = 10$) de uma solução de referência de Hg(II) para as concentrações de 0,30 e 1,5 $\mu g L^{-1}$.

Fonte: Autora, 2021.

3.4.5 Análise das amostras de cosméticos micelares empregando digestão por micro-ondas (método de referência)

Os parâmetros validados anteriormente, ratificaram que o método desenvolvido, se mostrou adequado para determinação de mercúrio total e dessa forma, ensaios de recuperação dos analitos foram empregados para os estudos de exatidão do método e avaliação de efeitos de matriz em três amostras de cosméticos micelares (S1, S2 e S3). Um aspecto fundamental deste ensaio essencialmente recomendado para matrizes complexas, as quais podem interferir na resposta analítica (GONÇALVES *et al.*, 2016), foi realizar as fortificações com três diferentes espécies de mercúrio, o que significa que o método desenvolvido pode determinar concentrações de conservantes organomercuriais (TH ou FM), como também mercúrio inorgânico (na forma de $HgCl_2$, Hg_2Cl_2 , $Hg(NH_2)_2Cl$), o qual pode estar presente nas formulações cosméticas como ingrediente ativo com ação clareadora (GAO *et al.*, 2014) ou proveniente de impurezas nas matérias-primas e subprodutos do processo de fabricação de cosméticos (NG *et al.*, 2015).

Assim, o ensaio de recuperação foi efetuado com soluções de referência de Hg(II), TH e FM e as fortificações nas amostras foram realizadas antes de iniciar a digestão assistida por micro-ondas, em dois níveis de concentrações distintos (0,5 e 1,0 $\mu g L^{-1}$, para Hg(II); 1,0 e 2,0 $\mu g L^{-1}$ para TH e FM). Na Tabela 20, estão sumarizados os resultados obtidos para as recuperações dos analitos, após digestão assistida por micro-ondas das amostras de cosméticos micelares.

Tabela 20 - Ensaio de adição e recuperação para o método proposto aplicado para amostras de cosméticos micelares (média \pm SD, $n = 3$). Condições experimentais: 1,0 mL da amostra, 5 mL HNO₃ 14 mol L⁻¹, 3 mL H₂O₂ 30% (m/m) e 3 mL água ultrapura. Após digestão; amostras e soluções padrão com acidez final 0,2 e 0,4 mol L⁻¹ (em HNO₃), se adicionou KBr / KBrO₃ (2 / 0,34 mmol L⁻¹); 40 μ L de ácido ascórbico 12% (m/v), solução carreadora HNO₃ 5% (v/v), solução redutora SnCl₂ 90 mmol L⁻¹. Limite de detecção (20 ng L⁻¹).

Amostra	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)						Recuperação (%)	
	Adicionado	Recuperado			Hg(II)	TH	FM	
		Hg(II)	TH	FM				
S1	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-	
	0,50	0,46 \pm 0,01	-	-	91,8 \pm 2,1	-	-	
	1,00	0,97 \pm 0,03	1,12 \pm 0,02	0,94 \pm 0,06	96,6 \pm 3,1	112 \pm 4	94,2 \pm 6,0	
	2,00	-	2,01 \pm 0,10	2,04 \pm 0,20	-	101 \pm 5	102 \pm 8	
S2	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-	
	0,50	0,55 \pm 0,02	-	-	109 \pm 3	-	-	
	1,00	1,11 \pm 0,02	1,00 \pm 0,11	1,03 \pm 0,06	111 \pm 2	100 \pm 11	103 \pm 6	
	2,00	-	2,12 \pm 0,11	2,02 \pm 0,18	-	106 \pm 6	101 \pm 9	
S3	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-	
	0,50	0,50 \pm 0,07	-	-	99,2 \pm 13	-	-	
	1,00	1,13 \pm 0,04	0,96 \pm 0,05	1,12 \pm 0,08	113 \pm 4	95,8 \pm 5,4	112 \pm 8	
	2,00	-	2,04 \pm 0,09	1,80 \pm 0,12	-	102 \pm 4	89,9 \pm 5,8	

Fonte: Autora, 2021.

Para as amostras digeridas pelo sistema de digestão assistida por micro-ondas sem adição dos analitos as concentrações de mercúrio total estavam abaixo do limite de detecção do método (Tabela 20). Entretanto, verificou-se que as recuperações obtidas para as amostras fortificadas e digeridas foram quantitativas (valores entre 80 e 120%) e os resultados obtidos variaram entre $91,8 \pm 2,1\%$ a $113 \pm 4\%$ para Hg(II); $95,8 \pm 5,4\%$ a $112 \pm 4\%$ para TH e $89,9 \pm 5,8\%$ a $112 \pm 8\%$ para FM.

Os resultados das recuperações das amostras fortificadas apresentaram boa exatidão para a metodologia aplicada, com níveis de recuperações aceitáveis (AOAC, 2016), considerando o nível de concentração, complexidade das amostras e analitos avaliados, demonstrando que a matriz cosmética, não interfere na determinação das espécies de mercúrio, empregando o método proposto (digestão por micro-ondas). Constatou-se também, que os intervalos de recuperações obtidos corroboram com estudos da literatura, nos quais o teor de mercúrio total foi determinado em formulações cosméticas. Wang *et al.* (2019) desenvolveram um método eletroquímico para determinação de As, Pb e Hg em amostras de talco, loção de pele e sombras para os olhos e a exatidão do método foi avaliada para dois níveis de concentração (1 e 2 mg kg^{-1}), com recuperações obtidas para o Hg, variando entre 77 - 93%, enquanto, Isa *et al.* (2017) determinaram mercúrio (método eletroquímico) em cremes com ação clareadora obtendo recuperações de 98,9 - 101%, para concentração de 15 mg kg^{-1} . Wang *et al.* (2012) utilizaram a digestão por micro-ondas e CV AFS para determinação de mercúrio total em cosméticos faciais e as recuperações obtidas foram entre 80 - 102 % para as concentrações de $0,1$ e $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Jia *et al.* (2011) realizaram a especiação de Hg(II), metilmercúrio e etilmercúrio em amostras de cosméticos líquidos (tônicos faciais e hidratante para as mãos) com recuperações no intervalo de 86,7 - 101% ($0,20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para as espécies de mercúrio por HPLC-ICP-MS. Por fim, Gámiz-Garcia e Castro (1999) determinaram mercúrio em amostras de delineadores, lápis e sombras para os olhos, empregando para o preparo de amostra a digestão por micro-ondas e CV AFS, como sistema para quantificação. O ensaio de adição e recuperação foi realizado para um nível de concentração do analito ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e as recuperações obtidas variaram entre 89 - 104%.

Deste modo, a metodologia de preparo de amostra empregando digestão por micro-ondas, foi eficiente e comparável a trabalhos da literatura para matrizes similares e demonstrou-se que o método proposto atende aos requisitos para determinação de diferentes compostos a base de mercúrio, podendo ser aplicado para análises de controle de qualidade de cosméticos líquidos, como cosméticos micelares e produtos utilizados para *skincare*.

3.4.6 Método oxidativo direto para determinação espécies de mercúrio em cosméticos micelares

A segunda abordagem de preparo de amostra proposta para este trabalho, consiste na oxidação direta das espécies de mercúrio como alternativa viável para substituição de procedimentos baseados em micro-ondas. Porém, considerando a natureza da matriz, houve a necessidade de se avaliar a influência de antiespumantes, os quais, permitiram a transferência quantitativa (solução - vapor) do analito para quantificação.

3.4.6.1 Álcoois de cadeia curta como agentes antiespumantes

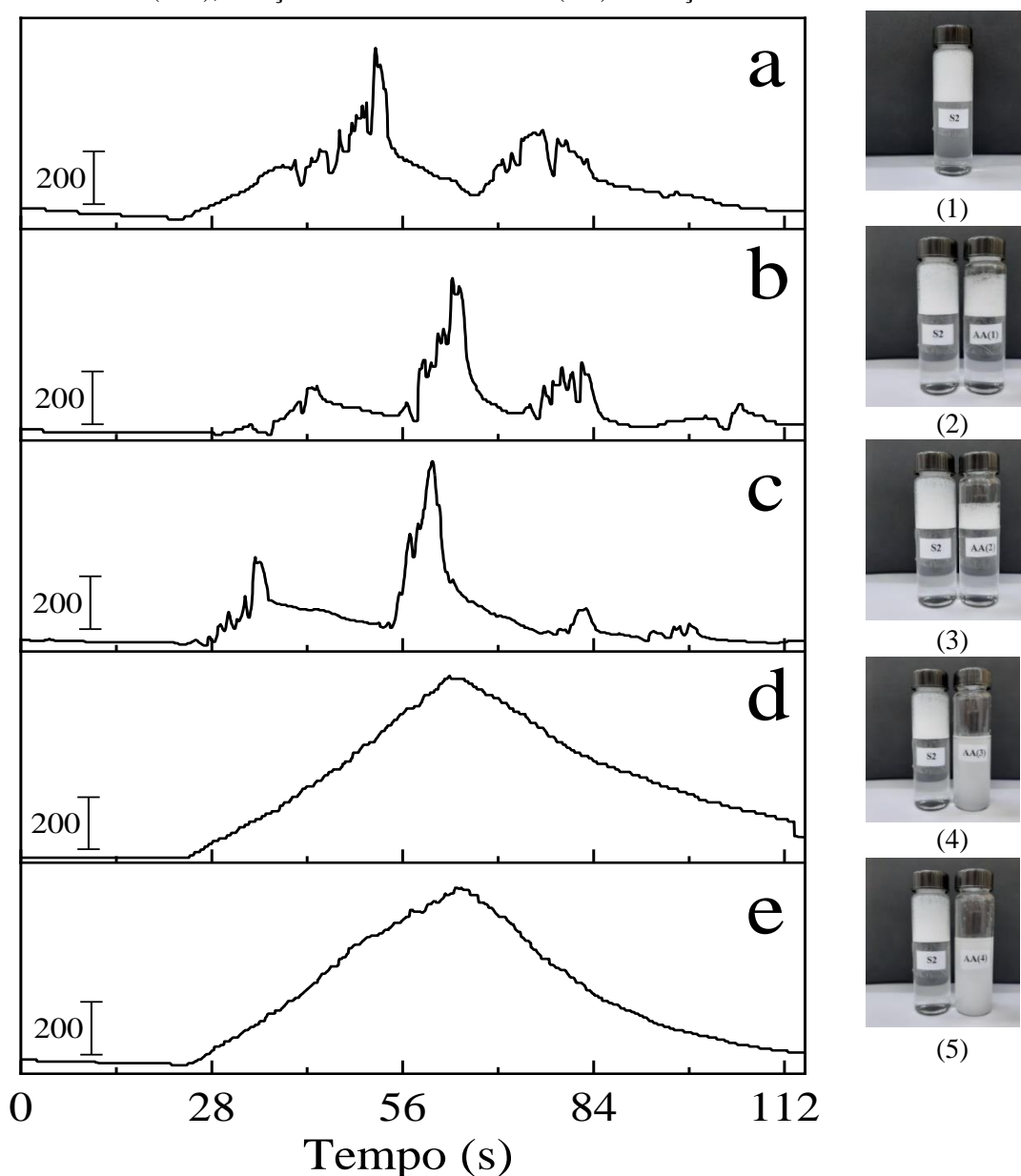
Uma ampla variedade de substâncias químicas pode ser utilizada como antiespumantes para diversas finalidades, com destaque para óleos (silicones, minerais e triglicerídeos), polímeros com solubilidade parcial em água (baseados em unidades de oxi-etileno, -propileno e -butileno) e várias moléculas anfifílicas (álcoois, ácidos graxos, ésteres graxos, entre outras) (DENKOV *et al.*, 2014).

A determinação de TH e FM (compostos de mercúrio permitido em cosméticos segundo a RDC Nº 29/2012 da ANVISA), assim como, Hg(II) (contaminante) por CV AFS empregando oxidação direta em amostras de cosméticos micelares, foi avaliada utilizando o álcool amílico e isoamílico, uma vez que compostos orgânicos desta natureza, já foram reportados como antiespumantes eficientes para determinação de Hg_{total} em amostras de vinagre por CV AAS (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2015). Contudo, a otimização do método foi realizada empregando TH como composto de mercúrio, álcool amílico (AA) como antiespumante e a amostra S2 (devido a maior disponibilidade e complexidade da amostra).

A etapa inicial consistiu na avaliação da eficiência de oxidação e efeito do AA como antiespumante, no perfil do sinal analítico para amostra S2 fortificada com solução de TH (Figura 13). Nos experimentos realizados sem adição do antiespumante (Fig. 13a1) e para concentrações de 0,8 e 1,6% (v/v) (Fig. 13b2-c3), durante o procedimento de análise, no separador gás-líquido foi verificada retenção acentuada de espumas, alterando a distribuição e transporte do vapor de Hg⁰ no sistema e intensa variabilidade do sinal analítico durante as medições, impossibilitando a obtenção de espectros característicos (tempo vs. intensidade de fluorescência). Adicionalmente, observou-se dificuldade de retorno à linha de base para medições sequenciais, sendo necessária uma etapa adicional de limpeza. Estas observações confirmaram, que a formação de espumas no sistema é um fator negativo para análise direta por fluorescência atômica. A espuma reclusa no separador gás-líquido do equipamento é um ponto crítico para análise, visto que, compromete a liberação do vapor do analito da matriz,

além disso, pode levar a interferências devido a presença de fase condensada no sistema de detecção (LIU *et al.*, 2019).

Figura 13 - Perfil espectral para determinação de Hg_{total} por CV AFS na ausência e na presença de álcool amílico (AA): a) S2, b) S2 + AA 0,8% (v/v), c) S2 + AA 1,6% (v/v), d) S2 + AA 8% (v/v), e) S2 + AA 16% (v/v). (1) S2 sem AA; (2) comparativo S2 sem AA e S2 + AA 0,8% (v/v), (3) comparativo S2 sem AA e S2 + AA 1,6% (v/v), (4) comparativo S2 sem AA e S2 + AA 8% (v/v), e (5) comparativo S2 sem AA e S2 + AA 16% (v/v). Condições experimentais: 2,0 mL amostra S2; HCl 0,60 mol L⁻¹ para acidificação das soluções para análise (cosmético micelar e solução padrão de TH 20 µg L⁻¹); reagente de bromação KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L⁻¹); tempo de reação 5 min; 40 µL ácido ascórbico 12% (m/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L⁻¹.



Fonte: Autora, 2021.

Zheng *et al.* (2019), desenvolveram um método para especiação de mercúrio em amostras de água, aplicando a extração por ponto nuvem (CPE) e reação de bromação como

etapas de preparo de amostra, utilizando HG AFS como técnica de quantificação. Os autores relataram que a principal dificuldade para combinação da CPE com HG AFS foi a presença de surfactante, o qual produz espumas intensas durante o procedimento de medições e estas além de causar instabilidade do sinal analítico, podem também danificar o equipamento. Tais interferências relacionadas a formação de espuma e a variabilidade do sinal de fluorescência também foram evidenciadas no trabalho de Li *et al.* (2015). Neste trabalho, constatou-se que as concentrações de 8 e 16% (v/v) do AA suprimiram a formação de espumas durante as medições analíticas (Fig. 13d4-e5), visto que, maiores concentrações de AA resultam na redução da atividade do surfactante no meio reacional, portanto, promovendo a desestabilização da espuma (PEI *et al.*, 2014). Assim, os sinais transientes seguiram a tendência espectral característica associada a liberação contínua do vapor de mercúrio (Fig. 13d4-e5).

Apesar do perfil espectral típico ter sido reestabelecido devido a presença de 8 e 16% (v/v) do AA no meio, ocorreu aumento acentuado da viscosidade das soluções (padrões e amostras), a qual pode comprometer a mistura mais efetiva das soluções no sistema (efeitos hidrodinâmicos). Para avaliar este efeito da adição de álcool no meio reacional curvas analíticas foram construídas na ausência de álcool (1), assim como, na presença de AA (2) e AI (3) para a concentração de 8% (v/v). As equações de regressão linear obtidas são apresentadas a seguir:

$$IF = 62,02(\pm 2,54) \times C_{Hg} + 8,14 (\pm 15,40), r = 0,997 (n = 5) \quad (\text{Eq.1})$$

$$IF = 48,32(\pm 0,87) \times C_{Hg} + 22,45 (\pm 5,27), r = 0,999 (n = 5) \quad (\text{Eq.2})$$

$$IF = 48,98(\pm 0,35) \times C_{Hg} + 16,62 (\pm 2,15), r = 0,999 (n = 5) \quad (\text{Eq.3})$$

A adição de ambos os álcoois (AA e AI), diminui a sensibilidade do método proposto em 22% em relação a condição sem álcool, confirmando a hipótese inicial (aumento de viscosidade). Não se observou diferença estatística a 95% de confiança entre as sensibilidades dos dois álcoois ($t_{cal} = 1,31 < t_{crítico} = 4,30$). Assim, para aplicação na determinação de Hg_{total} , foi realizada a compatibilização dos sistemas para análise, sendo adicionado AA ou AI as soluções para construção das curvas analíticas e amostras de cosméticos micelares. Por fim, as recuperações não foram quantitativas para TH (61 ± 2 e $58 \pm 6\%$, $n = 3$), empregando 8 e 16% (v/v) de AA, respectivamente.

Considerando que os processos que ocorrem com a mistura reacional envolvem fatores químicos e físicos, esses resultados iniciais sugerem duas proposições: (1) a composição da matriz afeta a eficácia da oxidação do TH para Hg(II) e a redução Hg(II) para Hg^0 ou (2) a eficiência da transferência de fase e transporte do analito volatilizado (Hg^0) para o sistema de

detecção é minimizada, em decorrência da formação de espumas no meio. Se considerarmos como hipótese que o vapor do analito foi separado de forma eficiente e ocorreu o transporte quantitativo para o sistema de detecção, tem-se que a formação de espumas ou o aumento da viscosidade no meio reacional comprometeu a geração de vapor, ou seja, a oxidação das espécies de mercúrio (TAKASE *et al.*, 2002; STURGEON *et al.*, 2005). Desta forma, o efeito da concentração do reagente de bromação (KBr/KBrO₃) (Tabela 21) e tempo de reação (Figura 14) foram avaliados, mantendo-se a concentração de 8% (v/v) do AA no sistema fixada.

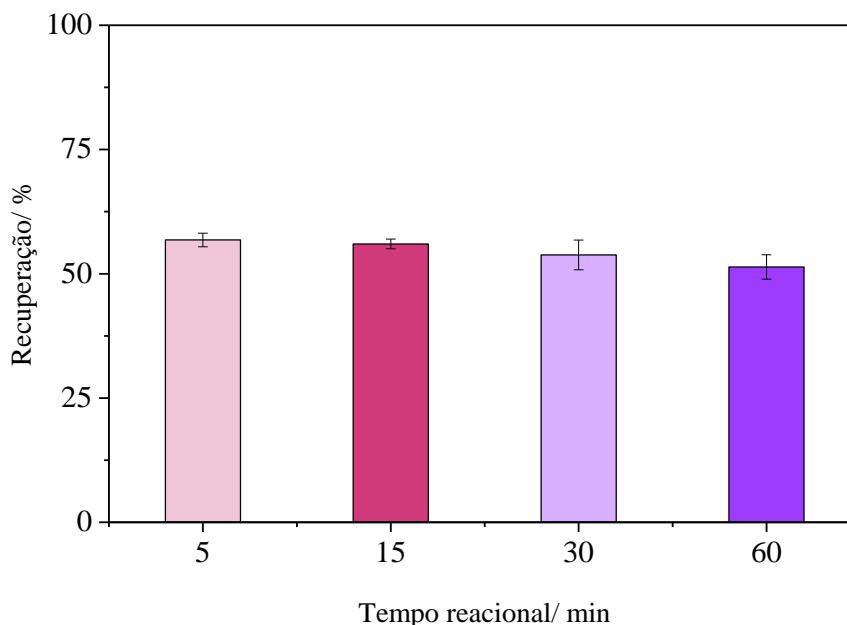
Tabela 21 - Avaliação da eficiência de oxidação de TH, empregando diferentes concentrações do reagente de bromação. Condições experimentais: 2,0 mL amostra S2; HCl 0,60 mol L⁻¹ acidificação do meio reacional; tempo de reação 5 min; volume variável (40 a 160 µL) de ácido ascórbico 12% (m/v), AA 8% (v/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L⁻¹.

Amostra	Concentração KBr/KBrO ₃ (mmol L ⁻¹)	Concentração TH (µg L ⁻¹)		Recuperação (%)
		Adicionado	Recuperado	
S2	2 / 0,34	5	2,25 ± 0,17	44,9 ± 3,4
		10	5,19 ± 0,05	51,9 ± 0,5
		20	10,49 ± 0,55	52,5 ± 2,8
	4 / 0,68	5	2,80 ± 0,14	55,9 ± 2,8
		10	5,73 ± 0,32	57,3 ± 3,2
		20	11,96 ± 0,57	59,8 ± 2,8
	8 / 1,36	5	2,34 ± 0,26	46,7 ± 5,2
		10	5,05 ± 0,26	50,5 ± 2,6
		20	10,31 ± 0,63	51,6 ± 3,1
	16 / 2,72	5	1,80 ± 0,37	36,1 ± 7,4
		10	4,07 ± 0,68	40,7 ± 6,8
		20	9,21 ± 0,44	46,0 ± 2,2

Fonte: Autora, 2021.

Os resultados obtidos (Tabela 21), foram similares para as diferentes concentrações do reagente de bromação. Dessa maneira, a análise de variância de fator duplo (ANOVA) foi realizada, para verificar se ocorreu diferença significativa nas recuperações obtidas a partir dos diferentes níveis de adição do analito, empregando-se concentrações distintas de KBr/KBrO₃. Para esta avaliação a um nível de confiança de 95% a análise estatística demonstrou que o aumento da concentração de KBr/KBrO₃, não proporcionou maior conversão de TH para Hg(II), considerando os valores de recuperações ($F_{cal} = 0,5461 < F_{crítico} = 3,095$). Em seguida, o tempo de oxidação foi avaliado (Figura 14) quanto ao efeito de matriz nas determinações de TH na amostra de cosmético micelar, empregando a condição de maior concentração do sistema complexante/oxidante (KBr = 16 mmol L⁻¹/KBrO₃ = 2,72 mmol L⁻¹).

Figura 14 - Avaliação da eficiência de oxidação de TH empregando diferentes tempos reacionais. Condições experimentais: 2,0 mL amostra S2; TH a $20 \mu\text{g L}^{-1}$; HCl $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ para acidificação do meio reacional; KBr/KBrO₃ ($16/2,72 \text{ mmol L}^{-1}$); $160 \mu\text{L}$ ácido ascórbico 12% (m/v), AA 8% (v/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L^{-1} .



Fonte: Autora, 2021.

Para os diferentes tempos reacionais avaliados, as recuperações obtidas foram semelhantes ao tempo inicialmente empregado (5 min), não sendo observado aumento na eficiência de oxidação. A análise de variância para (ANOVA) foi aplicada e constatou-se que as recuperações obtidas, não apresentaram variações significativas em função dos diferentes tempos reacionais (Figura 14), para um nível de 95% de confiança ($F_{\text{cal}} = 3,425 < F_{\text{crítico}} = 5,409$).

Assim, frente as avaliações que foram efetuadas com TH, pode-se inferir que os componentes da matriz cosmética interferem nas medições para determinação de Hg_{total} , seja devido a eficiência na oxidação ou no processo de transferência solução-vapor. Desse modo, investigou-se por ensaio recuperação a influência da composição da amostra para o TH, utilizando amostras com outras composições (S1, S2 e S3) e o efeito das espécies de mercúrio (inorgânico e FM) no processo de recuperação para uma mesma amostra (S2), além do efeito do álcool antiespumante no meio para ambos os sistemas (Tabela 22).

Tabela 22 - Ensaio de recuperação para determinação de TH em diferentes amostras de cosméticos micelares (S1, S2 e S3) e efeito da matriz em diferentes espécies de mercúrio para o método proposto empregando amostra S2 ($n = 3$). Condições experimentais: 2,0 mL amostra; HCl 0,60 mol L⁻¹ para acidificação do meio reacional; KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L⁻¹), tempo de reação 5 min; 40 µL de ácido ascórbico 12% (m/v), AA e AI a 8% (v/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L⁻¹.

Amostra	Analito	Concentração (µg L ⁻¹)			Recuperação (%)	
		Adicionado	Recuperado		AA	AI
			AA	AI		
S1	TH	-	< LOD	< LOD	-	-
		5	0,66 ± 0,12	0,56 ± 0,03	13,1 ± 2,4	11,2 ± 0,6
		10	1,80 ± 0,19	1,58 ± 0,08	18,0 ± 1,9	15,8 ± 0,8
		20	3,84 ± 0,14	4,47 ± 0,13	19,2 ± 0,7	22,4 ± 0,6
	Hg(II)	-	< LOD	< LOD	-	-
		2,5	1,61 ± 0,11	1,73 ± 0,08	64,4 ± 4,2	69,2 ± 3,0
		5,0	3,36 ± 0,22	3,49 ± 0,05	67,2 ± 4,4	69,7 ± 1,0
		10	6,18 ± 0,40	6,63 ± 0,22	61,8 ± 4,0	66,3 ± 2,2
	S2	TH	-	< LOD	< LOD	-
5			2,72 ± 0,15	2,26 ± 0,25	54,4 ± 2,9	45,3 ± 5,0
10			5,34 ± 0,03	5,44 ± 0,26	53,5 ± 0,3	54,4 ± 2,6
		20	10,82 ± 0,11	11,36 ± 0,27	54,1 ± 0,5	56,8 ± 1,4
FM		-	< LOD	< LOD	-	-
		5	2,94 ± 0,09	3,01 ± 0,07	58,9 ± 1,8	60,2 ± 1,4
	10	6,86 ± 0,59	6,67 ± 0,08	68,6 ± 5,9	66,7 ± 0,8	
	20	13,26 ± 0,61	11,9 ± 0,23	66,3 ± 3,0	59,7 ± 1,2	
S3	TH	-	< LOD	< LOD	-	-
		5	2,31 ± 0,06	2,68 ± 0,09	46,1 ± 1,2	53,6 ± 1,8
		10	5,55 ± 0,25	5,98 ± 0,06	55,5 ± 2,5	59,8 ± 0,6
	20	11,78 ± 0,46	11,95 ± 0,90	58,9 ± 2,3	59,7 ± 4,5	

Fonte: Autora, 2021.

A variação do tipo de amostra e álcool antiespumante indicou que as recuperações para o TH não foram quantitativas (AA = 13,1 a 58,9% e AI = 11,2 a 59,8%) (Tabela 22). Assim, a não eliminação do efeito de matriz para determinação de Hg_{total}, pode estar associada provavelmente a atividade antiespumante lenta, desta forma, resultando em espumas residuais no meio reacional interferindo no sinal analítico (DENKOV, 2004; DENKOV *et al.*, 2014).

Na amostra S2, as maiores recuperações foram observadas para o Hg(II) (AA = 61,8 a 67,2% e AI = 66,3 a 69,7%), independentemente do álcool utilizado (Tabela 22). Este fato, indica que a etapa de transferência do analito do sistema solução-vapor, possivelmente foi mais afetada que a oxidação, em razão de neste experimento, o mercúrio já se encontrar na forma inorgânica. Além disso, os resultados para FM (AA = 58,9 a 68,6% e AI = 59,7 a 66,7%) não diferem estatisticamente quanto ao TH (amostra S2), quando se empregou ANOVA a 95% de confiança, ($F_{cal} = 0,08657 < F_{crítico} = 10,128$). No TH o átomo de mercúrio está ligado a um átomo de enxofre e um carbono alifático (S-Hg-C), enquanto no FM, o mercúrio encontra-se

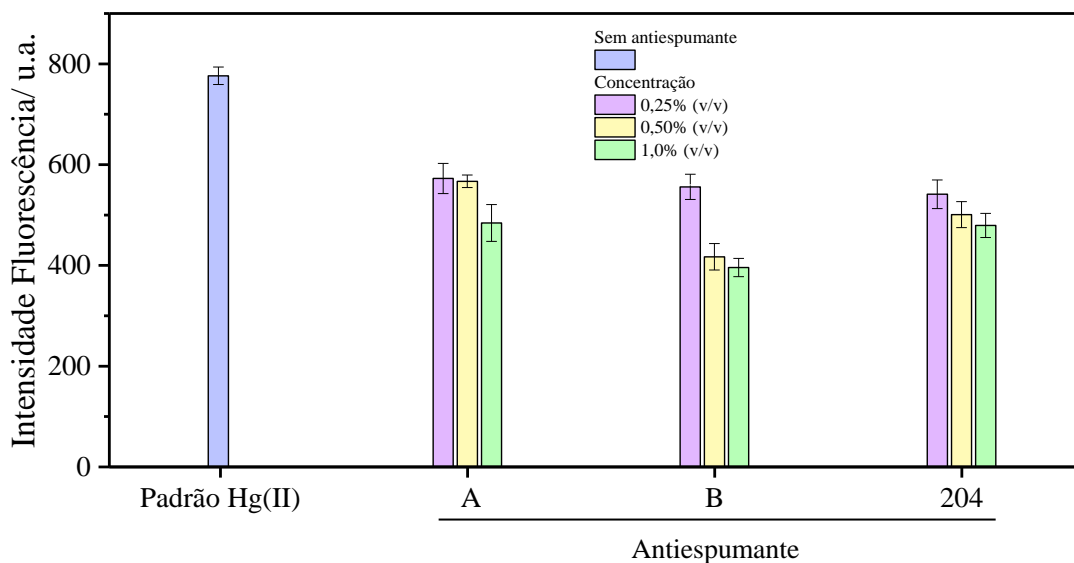
ligado a dois átomos de carbono, um alifático e outro aromático (C-Hg-C). Portanto, devido a similaridades dos resultados, o processo de oxidação ocorreu de forma independente da estrutura química do composto orgânico de mercúrio e álcool antiespumante utilizado. Reforçando dessa forma, que o processo de transferência do analito da solução para fase vapor, foi mais afetado pela formação das espumas no meio, que não foi reduzida de forma eficiente pelos antiespumantes empregados (AA e AI).

O uso de álcoois como sistema antiespumante foi efetivo em amostra de vinagre, quando empregou-se baixas concentrações de AI (menor que 1% v/v) para determinação de Hg_{total} (SILVA JUNIOR *et al.*, 2015). Contudo, Liu *et al.* (2019) relataram que a adição de *n*-octanol (a partir de 0,5% m/v) no preparo de amostra de sangue eliminou o excesso de espuma, entretanto, interferiu na geração de hidreto de arsênio, assim, como alternativa optou-se por construir um separador gás-líquido com maiores dimensões para solucionar as interferências ocasionadas, durante as medições analíticas por fluorescência atômica. Diante do exposto, deve-se considerar que a eficácia da atividade antiespuma e a alteração da viscosidade do meio reacional são parâmetros cruciais para o desenvolvimento do método. Pois, espera-se que em baixas concentrações o antiespumante seja capaz de romper os filmes de espumas de forma rápida e estável durante todo o procedimento analítico. Assim, verificou-se que os álcoois avaliados (AA e AI) para determinação de Hg_{total} em amostras de cosméticos micelares, não apresentaram resultados quantitativos comprometendo a exatidão do método. Nessas circunstâncias, visando eliminar o efeito de matriz, optou-se por avaliar antiespumantes a base de éteres e silicones nos estudos subsequentes.

3.4.6.2 Antiespumantes derivados de silicone (A e B) e éteres (204)

A estratégia de preparo de amostra proposta consiste na substituição dos álcoois avaliados (AA e AI) nos estudos anteriores, por diferentes tipos de antiespumantes (A, B e 204). Inicialmente os parâmetros avaliados para a otimização da metodologia proposta, incluíram a análise do efeito da adição dos diferentes tipos de antiespumantes na variação do sinal analítico e avaliação do efeito dos antiespumantes, considerando como parâmetro a recuperação do analito adicionado nas amostras de cosméticos micelares (S1, S2 e S3). Para avaliar a capacidade antiespuma e o efeito da adição dos antiespumantes na decomposição oxidativa direta para determinação do analito por fluorescência atômica, foi realizado um estudo com soluções padrão de Hg(II), preparadas em diferentes meios (ausência e presença dos antiespumantes) e a variação do sinal analítico foi analisada (Figura 15).

Figura 15 - Efeito da concentração dos antiespumantes A, B e 204 no sinal analítico da solução padrão de Hg(II). Condições experimentais: solução Hg(II) a $10 \mu\text{g L}^{-1}$; HCl $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ para acidificação do meio reacional; KBr/KBrO₃ ($2/0,34 \text{ mmol L}^{-1}$); $40 \mu\text{L}$ ácido ascórbico 12% (m/v), antiespumantes A, B e 204 (0,25; 0,5 e 1,0% v/v), solução carreadora HCl 20% (v/v); solução redutora SnCl₂ 90 mmol L^{-1} .

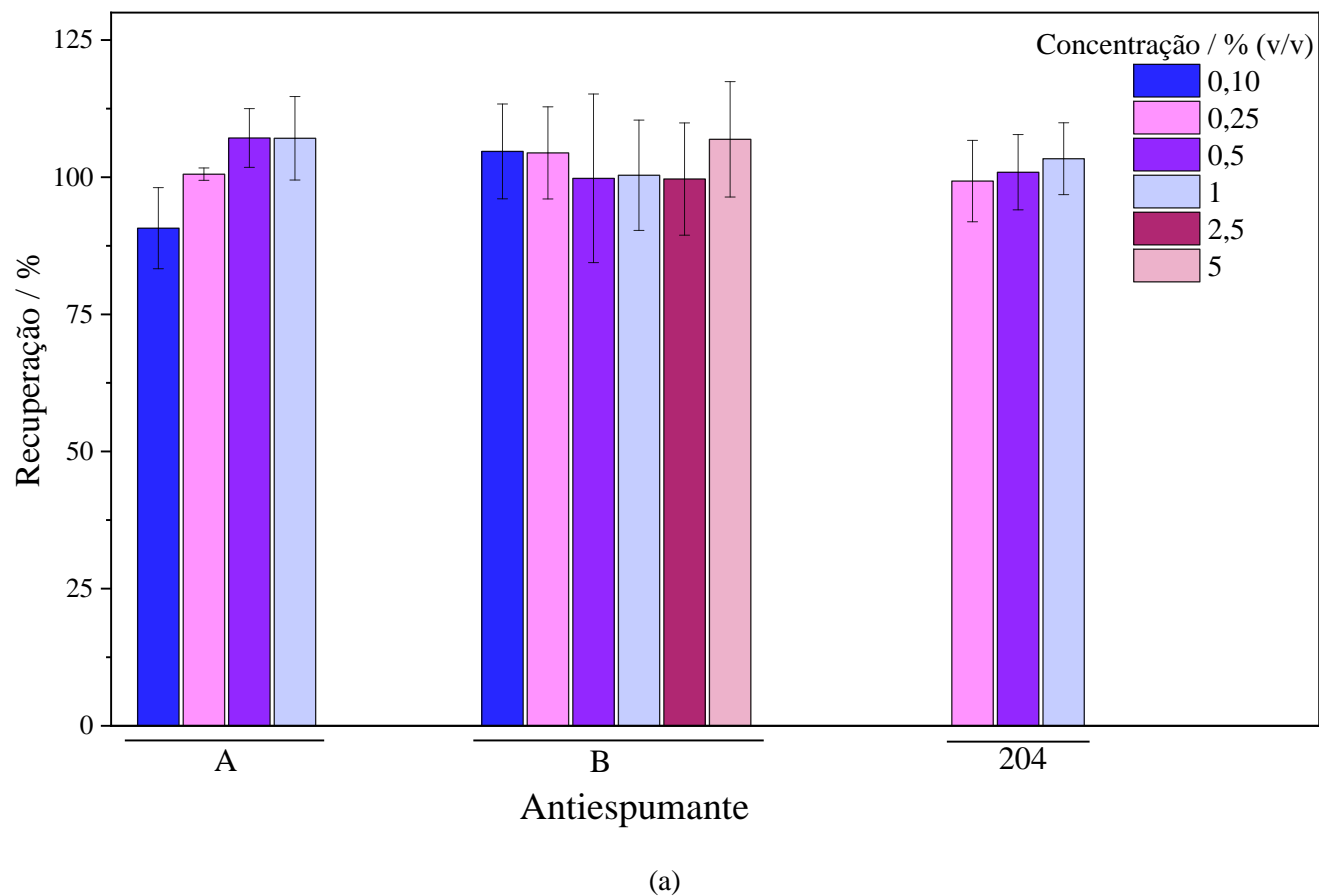


Fonte: Autora, 2021.

Um decréscimo do sinal analítico, para os diferentes níveis de concentrações dos antiespumantes avaliados foi observado (Fig. 15), sendo mais acentuado para as maiores concentrações. Para o menor nível de concentração avaliado (0,25% v/v), constatou-se reduções de 26 a 30%, enquanto para 1,0% (v/v) dos antiespumantes obteve-se redução de 38 a 49%. Este comportamento já era esperado devido a mudança de viscosidade nos sistemas reacionais, deste modo, para os experimentos subsequentes efetuou-se compatibilização das curvas analíticas e amostras de cosméticos micelares, para cada nível de concentração dos antiespumantes avaliados.

Conforme previamente abordado, a composição da matriz cosmética estudada, favorece a formação excessiva de espumas devido a presença de diferentes surfactantes, assim, constituindo fator indesejável para análise por fluorescência atômica. Para minimizar este efeito nas amostras e no separador gás-líquido a eficiência de desestabilização dos filmes de espumas, foi verificada por meio de ensaios de adição e recuperação de Hg(II) na amostra S2. Os estudos iniciais foram realizados com Hg(II), uma vez que, presumiu-se que o principal efeito de matriz, estaria associado a transferência do analito da solução para fase vapor, e não quanto a oxidação, especificamente para o TH e FM. Assim, para este estudo, concentrações de antiespumantes no intervalo de 0,10 a 5% (v/v) foram avaliados (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação de diferentes antiespumantes derivados de silicone e éteres. (a) Efeito da variação da concentração dos antiespumantes no ensaio de recuperação (amostra S2) para Hg(II) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) e perfil da redução do volume de espuma para: (b) antiespumante B, (c) A e (d) 204, antes e após adição destes no meio. Condições experimentais: 2 mL amostra de cosmético micelar; HCl $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ para acidificação do meio reacional; KBr/KBrO₃ ($2/0,34 \text{ mmol L}^{-1}$); 40 μL ácido ascórbico 12% (m/v), antiespumantes A (1 - 4), B (1 - 6), 204 (2 - 4); solução carreadora HCl 20% (v/v); solução redutora SnCl₂ 90 mmol L^{-1} . Para concentração dos antiespumantes (A, B e 204), deve se seguir a seguinte representação quanto aos níveis de concentração: (1) 0,10; (2) 0,25; (3) 0,50; (4) 1; (5) 2,5 e (6) 5% (v/v).



(b)



(c)



(d)

O efeito dos antiespumantes avaliados para o controle de formação e supressão da espuma foi eficiente, posto que, em todas as condições avaliadas as recuperações foram quantitativas. Para os quatro níveis de concentrações do antiespumante A (contendo polímero de silicone 100% ativo), as recuperações variaram entre $90,7 \pm 7,4$ a $107 \pm 5\%$, sendo observado aumento nas recuperações de Hg(II) até a concentração de 0,5% (v/v), com estabilização para as maiores concentrações do antiespumante (Fig. 16a). Perfil similar foi relatado por Almeida (2014), com aplicação do antiespumante A em amostras de solo para determinação de Hg_{total} por CV AAS. Adicionalmente, verificou-se nas soluções para análise (Fig. 16b) que com a adição do antiespumante A, houve visível e acentuada supressão da formação de espuma.

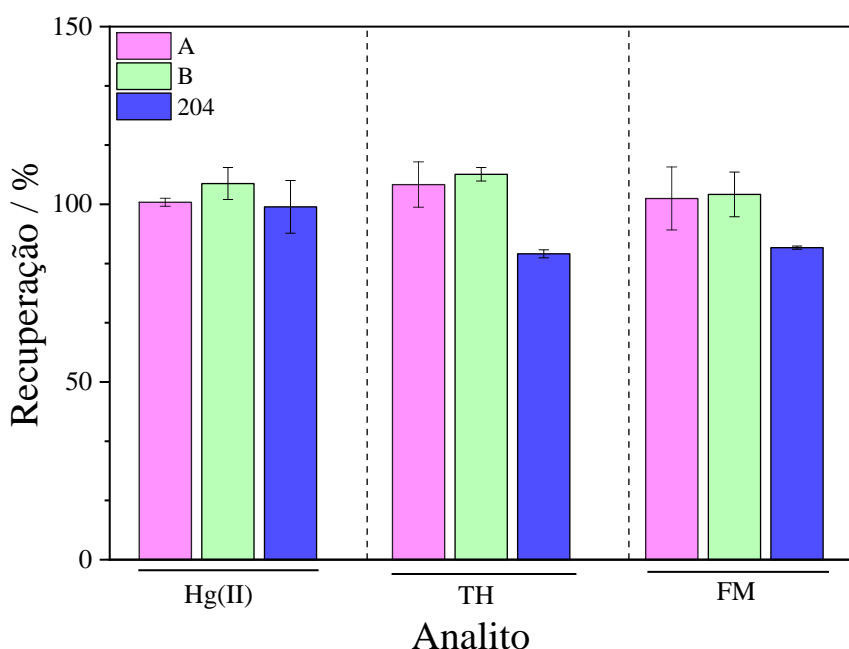
Para o antiespumante B (emulsão aquosa de silicone), também se observou redução visual da formação de espumas (Fig. 16c) para os seis níveis de concentrações avaliados, não sendo verificada espumas residuais nas superfícies das soluções, possivelmente devido a aspectos relacionados a viscosidade e tensão superficial deste antiespumante (VARDAR-SUKAN, 1998). O antiespumante B apresentou recuperações quantitativas para Hg(II) no intervalo de $99,8 \pm 15,3$ a $107 \pm 10\%$. No trabalho de Gao *et al.* (2014) por exemplo, para eliminar a espuma de matrizes cosméticas, os autores não otimizaram a concentração do antiespumante B, visto que, adicionaram gotas do reagente nas soluções amostrais, sem maiores detalhes do procedimento analítico, o que leva a dificuldade de reprodução do experimento.

Para os estudos de recuperação com o antiespumante 204 (mistura de poliéter orgânico), quando adicionado nas soluções para análise em concentrações inferiores a 0,25% (v/v) a diminuição da espuma não foi efetiva, entretanto, por isto, este foi o menor nível de concentração avaliado (Fig. 15d). Para concentrações superiores a 1% (v/v), foi observado a formação de precipitado no meio reacional, possivelmente devido à baixa solubilidade do composto antiespumante em água (REZENDE *et al.*, 2011). Outro ponto ainda que deve ser destacado para este antiespumante, foi o aumento do tamanho dos glóbulos antiespumantes, fator preponderante no mecanismo de ação antiespuma (DENKOV *et al.*, 2014). Deste modo, os valores de recuperações para Hg(II) variaram no intervalo de $99,3 \pm 7,4$ a $103 \pm 7\%$. Por fim, para os estudos subsequentes e validação do método selecionou-se a concentração de 0,25% (v/v), visando compatibilizar todos os antiespumantes, usando um menor nível de concentração (devido ao aumento da viscosidade) e economia dos reagentes.

Uma vez constatada, a eficiência do processo de transferência de fase líquida para fase vapor, avaliando-se a recuperação de Hg(II) nas amostras de cosméticos micelares, empregando-se os antiespumantes A, B e 204, decidiu-se verificar a eficiência da oxidação para amostras fortificadas com TH e FM. Para tanto, empregou-se a amostra S2 nas condições

experimentais otimizadas (Figura 17), para um nível de concentração comparando os resultados às recuperações de Hg(II).

Figura 17 - Ensaio de adição e recuperação para TH e FM ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) realizado na amostra S2 empregando diferentes antiespumantes (A, B e 204). Além disto, o ensaio com Hg(II) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) foi efetuado para comparação. Condições experimentais: 2 mL amostra de cosmético micelar; HCl $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ para acidificação do meio reacional; KBr/KBrO₃ ($2/0,34 \text{ mmol L}^{-1}$); $40 \mu\text{L}$ ácido ascórbico 12% (m/v); antiespumantes A, B e 204 (0,25% v/v), solução carreadora HCl 20% (v/v); solução redutora SnCl₂ 90 mmol L^{-1} .

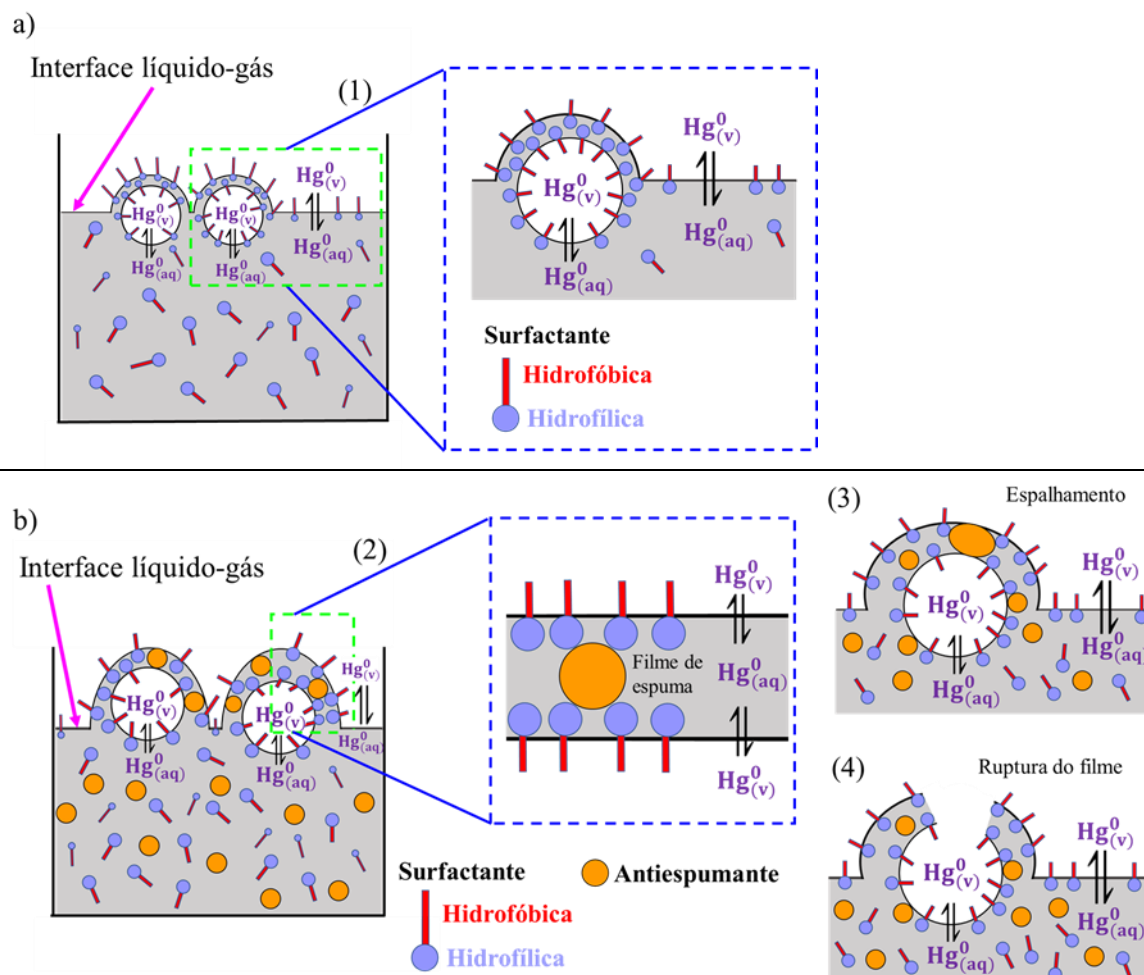


Fonte: Autora, 2021.

Para todos os antiespumantes avaliados, as recuperações foram quantitativas. O antiespumante A apresentou recuperações de 100 ± 1 a $106 \pm 6\%$, o antiespumante B de 103 ± 7 a $108 \pm 2\%$, e por fim, o antiespumante 204 de $86,1 \pm 1,1$ a $99,3 \pm 7,4\%$, considerando todas as espécies de mercúrio avaliadas. Assim, a adição dos diferentes antiespumantes no meio reacional a 0,25% (v/v), eliminou o efeito de matriz e não comprometeu a eficiência de oxidação dos compostos organomercúricos investigados para Hg(II).

Na Figura 18, está sumarizado o esquema que representa duas abordagens distintas para as soluções de análise no separador gás-líquido do espectrômetro de fluorescência atômica, na ausência e na presença de antiespumante.

Figura 18 - Modelo proposto do processo dos mecanismos associados a transferência do analito na interface da solução líquido-gás em sistemas micelares na (a) ausência e na (b) presença de antiespumante, considerando as seguintes etapas: (1) expansão da região da interface líquido-gás da solução sem adição de antiespumante, (2) expansão da região da interface líquido-gás da solução com antiespumante, (3) ação do antiespumante (espalhamento) na interface analito e líquido-gás e (4) ação do antiespumante desestabilizando a espuma do meio reacional, com liberação do analito para o sistema de detecção.



Fonte: Autora, 2021.

As moléculas anfifílicas dos surfactantes presentes nas amostras de cosméticos micelares são compostas por cadeias apolares e um grupo funcional polar, estas quando dispersas no meio reacional proporcionam a formação de espumas e aprisionamento parcial do analito na forma vapor dentro das espumas geradas (Fig. 18a). Portanto, a espécie volátil tende a migrar do meio de maior pressão (solução) para o meio de menor pressão (interior da bolha). Neste estágio hipotetiza-se que ocorra um equilíbrio nas bolhas de espumas e na interface da solução líquido-gás entre o $\text{Hg}^0_{(\text{aq})}$ formado no meio reacional proveniente da redução do $\text{Hg}(\text{II})$, e o $\text{Hg}^0_{(\text{v})}$ liberado do sistema. O aprisionamento de uma fração do $\text{Hg}^0_{(\text{v})}$ compromete o transporte do analito para o sistema de detecção, uma vez que, na ausência do antiespumante o filme de espuma permanece estável (PUGH, 1996). Assim, resultando em recuperações não

quantitativas de mercúrio total para as amostras avaliadas. Contudo, quando o antiespumante é adicionado (Figura 18b) este atua na superfície externa da camada de espuma, deslocando as moléculas de surfactante (Figura 18-2) e desestabilizando a estrutura do filme (Figura 18-3), desta forma, promovendo sua ruptura (Figura 18-4) (DENKOV *et al.*, 2014; VARDAR-SUKAN, 1998; DADACH e AL-AMERI, 2021), propiciando a liberação do analito aprisionado e conseqüente supressão da espuma no meio reacional. Deste modo, o antiespumante atua na interface da solução líquido-gás, auxiliando na transferência do $Hg^0_{(v)}$ da solução ou aprisionado nas espumas para o sistema de detecção, levando a recuperações quantitativas do mercúrio nas amostras de cosméticos micelares.

3.4.7 Parâmetros de desempenho e curva analítica

Os parâmetros de desempenho foram determinados e validados de acordo com os critérios normativos de validação para metodologias analíticas (THOMPSON *et al.*, 2002; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). A validação das curvas analíticas e a homocedasticidade do modelo de regressão foram avaliadas pelo teste de Levene modificado (Tabela 23).

Tabela 23 - Teste de homocedasticidade das variâncias para as curvas analíticas empregando diferentes antiespumantes ($n = 8$).

Antiespumante	Graus de liberdade		Quadrado da média		^a F	^b p
	Efeito	Erro	Efeito	Erro		
A	7	16	376,3	358,0	1,051	0,4360
B	7	16	191,5	310,8	0,6161	0,7352
204	7	16	145,8	187,5	0,7773	0,6152

^aF_{crítico} = 2,657 // ^b $\alpha = 0,05$.

Fonte: Autora, 2021.

Os resultados correspondentes ao teste de Levene modificado (Tabela 23) confirmaram para um nível de significância $\alpha = 0,05$ (nível de confiança de 95%) que para todo intervalo de concentração avaliado para os antiespumantes, as respectivas variâncias das curvas analíticas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Assim, constatando-se o comportamento homocedástico e indicando relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de Hg_{total} . Para avaliar possíveis variações significativas nos níveis de concentrações estudados, para o modelo obtido, o teste de significância da regressão e desvio da linearidade foi realizado por meio da análise de variância (ANOVA), a um nível de 95% de confiança (SILVA, 2016) para o intervalo de concentração (0,5 - 20 $\mu g L^{-1}$) (Tabela 24).

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido para o método proposto empregando os antiespumantes A, B e 204.

Antiespumante	Fonte de variação	^a SQ	^b GL	^c MQ	^d F
A	Modelo	2942730	1	2942730	4912,6675
	Resíduo	13178,2	22	599,0	
	Falta de ajuste	1333,6	6	222,3	0,3002
	Erro puro	13178,2	16	740,3	
B	Modelo	2682380	1	2682380,0	7020,9
	Resíduo	8405,2	22	382,1	
	Falta de ajuste	1087,6	6	181,3	0,3963
	Erro puro	7317,64	16	457,4	
204	Modelo	2413850	1	2413850	8758,6
	Resíduo	6063,1	22	275,6	
	Falta de ajuste	609,0	6	101,5	0,2978
	Erro puro	5454,1	16	340,9	

^aSQ: soma dos quadrados // ^bGL: graus de liberdade // ^cMQ: média dos quadrados // ^dF_{crítico} = 4,301 // ^dF_{crítico} = 2,741

Fonte: Autora, 2021.

Os resultados obtidos na análise de variância (Tabela 24) para as curvas analíticas, confirmaram que o modelo de regressão linear é adequado para o método proposto ($F_{cal} > F_{crítico}$) e os resultados do teste de homogeneidade das variâncias validam esta proposição, em linhas gerais, comprovou-se o ajuste linear do modelo. Na avaliação da soma residual dos quadrados, não foi evidenciada falta de ajuste significativo para as curvas analíticas ($F_{cal} < F_{crítico}$). Por fim, para as curvas analíticas validadas, os parâmetros de desempenho para o método proposto foram determinados e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Parâmetros de desempenho do método proposto para determinação de Hg_{total} por CV AFS empregando diferentes antiespumantes.

Parâmetro	Antiespumante		
	A	B	204
^a Curva analítica ($n = 8$)	IF = $70(\pm 1) \times C_{Hg}$ + 16 (± 8)	IF = $67(\pm 1) \times C_{Hg}$ + 18 (± 7)	IF = $63(\pm 1) \times C_{Hg}$ + 8,7 ($\pm 5,8$)
Coefficiente de correlação, r	0,9978	0,9984	0,9988
Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5 - 20	0,5 - 20	0,5 - 20
^b LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,038	0,043	0,045
^c RSD, % ($n = 10$)			
3 $\mu\text{g L}^{-1}$	4,81	3,54	4,72
15 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,06	1,38	2,02

^aAs equações de regressão linear associadas às medidas de intensidade da altura de pico (IF) e concentração de Hg_{total} ($\mu\text{g L}^{-1}$) foram descritas pela equação: IF = (inclinação) $\times C_{Hg}$ + (intercepto), com C_{Hg} sendo a concentração de Hg(II) ($\mu\text{g L}^{-1}$). ^bO limite de detecção (LOD) foi calculado como $3 \times s_b / S$, s_b sendo o desvio padrão para medições do branco analítico ($n = 10$) e S (inclinação da curva analítica). ^cO desvio padrão relativo (RSD) correspondente a dez medições independentes ($n = 10$) de uma solução de referência de Hg(II) para as concentrações de 3,0 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Autora, 2021.

Para os diferentes antiespumantes (A, B e 204), os parâmetros analíticos de desempenho apresentaram limites de detecção 38, 43 e 45 ng L^{-1} , respectivamente e os resultados validados,

são adequados para análise de Hg_{total} , nas concentrações preconizadas para as amostras avaliadas. A precisão avaliada em termos de repetitividade, foi determinada para dois diferentes níveis de concentrações (3,0 e 15 $\mu g L^{-1}$) e apresentou (RSD < 5%) para todas as avaliações, assim, o método proposto mostrou-se sensível e preciso para determinação de Hg_{total} em amostras de cosméticos micelares.

3.4.7.1 Comparação com diferentes métodos

As características analíticas e aplicabilidade do método desenvolvido foram comparadas com diferentes estratégias de preparo de amostra reportadas na literatura, para determinação de mercúrio total em amostras cosméticos utilizando diferentes técnicas para quantificação do analito (Tabela 26).

Tabela 26 - Características analíticas de diferentes metodologias para determinação de mercúrio total em amostras de cosméticos em relação ao método desenvolvido empregando diferentes antiespumantes.

^a Técnica	Preparo de amostra	Amostra	Antiespumante	RSD (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Referência
CV AAS	Emulsificação assistida por ultrassom	Shampoo, condicionador, gel capilar, creme e óleo corporal	A (polímero de silicone ativo 100%)	< 5	5,5	96 - 102	LAVILLA <i>et al.</i> (2009)
ID-PVG-ICP-MS	Diluição isotópica, adição de ácido fórmico e geração de vapor fotoquímico	Loção, máscara, creme e sérum faciais	B (emulsão aquosa 10% do antiespumante A)	< 5	0,00060	90 - 105	GAO <i>et al.</i> (2014)
FI-VG-ICP-MS	Amostragem em suspensão	Loção	Y-30 (emulsão aquosa 30% do antiespumante A)	n.i.	0,15	n.i.	CHEN <i>et al.</i> (2015)
CV AFS	Oxidação direta usando o sistema KBr / KBrO ₃	Água micelar	A (polímero de silicone ativo 100%)	4,81	0,038	96 - 118	Este trabalho
			B (emulsão aquosa 10% do antiespumante A)	3,34	0,043	97 - 118	
			204 (mistura de dispersão de poliéter orgânico)	4,72	0,045	82 - 110	

^aTécnica: CV AAS = espectrometria de absorção atômica por vapor frio; ID-PVG-ICP-MS = Diluição isotópica e geração de vapor fotoquímico usando espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente; FI-VG-ICP-MS = Injeção em fluxo e geração de vapor fotoquímico usando espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente; CV AFS = espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio. n.i. = Não informado.

Fonte: Autora, 2021.

A estratégia de preparo de amostra desenvolvida neste trabalho apresentou performance analítica semelhante a outros métodos mais sensíveis reportados na literatura, para determinação de mercúrio em matrizes cosméticas.

É importante ressaltar que, independentemente da sensibilidade e princípio da técnica empregada ICP-MS, CV AFS ou CV AAS, a adição de antiespumante foi necessária para o desenvolvimento das metodologias avaliadas, assim, minimizando os efeitos negativos da espuma no processo de geração da dispersão, vapor químico e/ou fotoquímico. Com este propósito, é reportado na literatura aplicações de antiespumantes durante os procedimentos de preparo de amostra e/ou particularmente durante a etapa de transferência de fase (líquida-vapor). Lavilla *et al.* (2009) eliminaram a formação de espumas no separador gás-líquido (CV AAS) adicionando-se o antiespumante A diretamente nas amostras cosméticas após a sonicação. Similarmente Chen *et al.* (2015) adicionaram uma gota (informação conforme os autores) do antiespumante Y-30 durante o preparo da amostra de cosméticos. Por fim, Gao *et al.* (2014) optaram por adicionar várias gotas (informação conforme os autores) do antiespumante B, na etapa de preparo de amostra e no separador gás-líquido para a mesma finalidade.

Dessa forma, analisando os procedimentos mencionados, o método desenvolvido se destaca, visto que, foi avaliado o efeito de diferentes tipos de antiespumantes para amostras de cosméticas micelares e, além disso, todo o procedimento analítico desenvolvido foi otimizado. Nota-se que alguns autores não definem o volume ou concentração do antiespumante adicionado, o que, pode limitar a reprodutibilidade do procedimento.

Adicionalmente, o uso de antiespumantes tem sido reportado em outras matrizes como sangue, vinagre, solo e água para determinação de diferentes espécies de mercúrio (ARANDA *et al.*, 2009; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016, ZHENG *et al.*, 2019). Nestes trabalhos, a formação de espuma foi decorrente da adição controlada de reagentes (surfactantes) na etapa de preparo de amostra, devido a presença de proteínas e outros componentes das matrizes avaliadas (Tabela 27), indicando que a metodologia proposta é ampla e favorece o desempenho analítico para determinação da espécie de interesse em diversas matrizes.

Tabela 27 - Características analíticas de diferentes metodologias para determinação de espécies mercúrio em matrizes de alimentícias, biológicas e ambientais empregando diferentes antiespumantes para o preparo da amostra.

^a Técnica	Espécie de mercúrio	Preparo de amostra	Amostra	Antiespumante	RSD (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Referência
CV AFS	Hg _{total}	Amostragem em suspensão e sonicação	Sangue sérico	204	3,90	0,025	98 - 100	ARANDA <i>et al.</i> (2009)
CV AAS	Hg _{total}	Sonicação	Vinagre	Álcool amílico	< 10	0,014	85 - 119	SILVA JÚNIOR <i>et al.</i> (2015)
CV AAS	Hg _{total}	Extração alcalina e oxidação com KMnO ₄ ^e	Solo e sedimento	A	< 5	70	98-102	ALMEIDA <i>et al.</i> (2016)
HG AFS	Hg(II)	Extração de ponto nuvem e oxidação com KBr/KBrO ₃	Água residual	204	2,90	0,007	97 - 104	ZHENG <i>et al.</i> (2019)

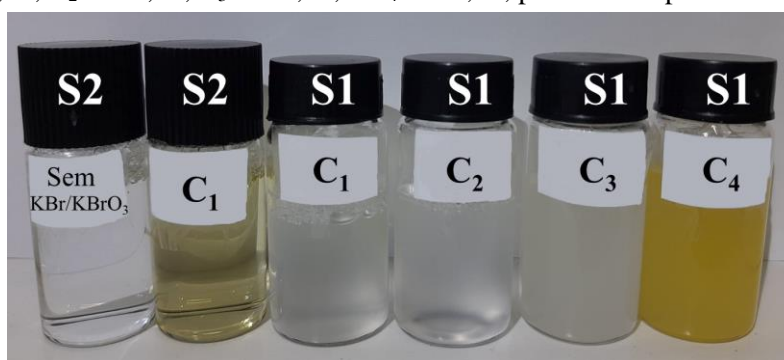
^aTécnica: CV AFS = espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio; CV AAS = espectrometria de absorção atômica por vapor frio e HG AFS = espectrometria de fluorescência atômica por geração de hidreto.

Fonte: Autora, 2021.

3.4.7.2 Análise das amostras cosméticas

Ensaio de adição e recuperação foram empregados para os estudos de exatidão do método e avaliação dos efeitos de matriz, em três amostras de cosméticos micelares (S1, S2 e S3), as quais foram fortificadas com em três níveis de concentrações para cada espécie de mercúrio avaliada (Hg(II), TH e FM). Para realização destes ensaios, durante o procedimento de preparo de amostras, empregou-se as condições otimizadas para oxidação direta, contudo, para a amostra S1, após adição de 500 μL da mistura KBr/KBrO_3 ($100/17 \text{ mmol L}^{-1}$) o bromo gerado (Br_2) no sistema reacional foi imediatamente consumido (Figura 19). Este fato foi associado a presença de compostos redutores ou passíveis de reagir com este oxidante presentes na formulação cosmética. Neste caso, para a amostra S1 verificou-se a presença de ascorbil fosfato de sódio e composto insaturado (iodopropino butilcarbamato), que podem reagir com o Br_2 , afetando a eficiência de oxidação dos compostos organomercúricos, a qual depende da concentração de bromo disponível no meio de reação (ZHENG *et al.*, 2019). Frente isso, optou-se por realizar um estudo qualitativo, adicionando-se concentrações crescentes do reagente de bromação na amostra S1 e comparativamente foi avaliado o perfil da coloração padrão (aspecto amarelo, antes da adição do ácido ascórbico). Portanto, para este experimento, utilizou-se a amostra S2 com e sem adição de KBr/KBrO_3 , como referência (Figura 19).

Figura 19 - Aspecto visual para diferentes concentrações de KBr/KBrO_3 empregadas para a oxidação direta na amostra S1 e avaliação comparativa com amostra S2 na ausência do sistema oxidante. Condições experimentais: 2,0 mL da amostra; HCl $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ acidificação do meio; KBr/KBrO_3 (mmol L^{-1}): $\text{C}_1 = 2/0,34$; $\text{C}_2 = 4/0,68$; $\text{C}_3 = 6/1,02$; e $\text{C}_4 = 8/1,36$; para um tempo reacional 5 min.



Fonte: Autora, 2021.

Conforme pode ser visualizado, apenas para o maior nível de concentração empregado na amostra S1 se observou a coloração amarelo prevalecente, indicando excesso de bromo no meio reacional. Assim, admitiu-se que os compostos redutores presentes não iriam interferir no procedimento (Figura 19). Deste modo, selecionou-se a concentração de KBr/KBrO_3 ($8/1,36 \text{ mmol L}^{-1}$) para os ensaios de adição e recuperação do analito na amostra S1 e para as

demais amostras manteve-se as condições experimentais previamente otimizadas. Assim, nota-se que a depender da complexidade da amostra de cosmético micelar, ajustes no procedimento experimental (oxidação direta) devem ser efetuados para suplantarem possíveis interferências ou efeitos de matriz.

Na Tabela 28, estão apresentados os resultados obtidos para o ensaio de adição e recuperação dos analitos, nas amostras de cosméticos micelares.

Tabela 28 - Ensaio de adição e recuperação do método proposto aplicado as amostras de cosméticos micelares ($n = 3$) para os antiespumantes A, B e 204 empregando diferentes espécies de mercúrio. Condições experimentais: 2,0 mL amostra de cosmético micelar; HCl 0,60 mol L⁻¹ para acidificação do meio reacional; KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L⁻¹); 40 µL ácido ascórbico 12% (m/v), antiespumantes A, B e 204 (0,25% v/v); solução carreadora HCl 20% (v/v); solução redutora SnCl₂ 90 mmol L⁻¹. Limites de detecção (38; 43 e 45 ng L⁻¹) para os antiespumantes A, B e 204, respectivamente.

(Continua...)

Amostra	Analito	Concentração (µg L ⁻¹)			Recuperação (%)			
		Adicionado	Recuperado			A	B	204
			A	B	204			
aS1	Hg(II)	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
		2,5	2,54 ± 0,09	2,52 ± 0,11	2,32 ± 0,07	101 ± 4	101 ± 4	92,7 ± 3,0
		5	5,05 ± 0,11	5,27 ± 0,05	4,74 ± 0,12	101 ± 2	105 ± 1	94,8 ± 2,4
	TH	10	10,06 ± 0,10	10,33 ± 0,25	9,79 ± 0,35	101 ± 1	103 ± 2	97,9 ± 3,5
		-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
		5	5,12 ± 0,10	5,73 ± 0,01	4,25 ± 0,16	102 ± 2	115 ± 1	85,0 ± 3,3
	FM	10	10,05 ± 0,13	10,60 ± 0,09	8,95 ± 0,15	100 ± 1	106 ± 1	89,5 ± 1,5
		20	19,88 ± 0,97	20,01 ± 0,75	18,1 ± 1,5	99,4 ± 4,8	100 ± 4	90,3 ± 7,6
		-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
	FM	5	4,96 ± 0,22	5,79 ± 0,12	4,76 ± 0,39	99,2 ± 4,4	116 ± 2	95,2 ± 7,8
		10	10,19 ± 0,76	10,22 ± 0,04	9,28 ± 0,67	102 ± 8	102 ± 1	92,8 ± 6,7
		20	20,14 ± 0,54	19,42 ± 0,28	18,14 ± 0,82	101 ± 3	97,1 ± 1,4	90,7 ± 4,1
S2	Hg(II)	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
		2,5	2,50 ± 0,14	2,63 ± 0,02	2,49 ± 0,10	100 ± 6	105 ± 1	99,5 ± 4,1
		5	5,26 ± 0,20	5,41 ± 0,27	5,51 ± 0,29	105 ± 4	108 ± 5	110 ± 6
	TH	10	10,74 ± 0,34	10,33 ± 0,07	9,70 ± 0,74	107 ± 3	103 ± 1	97,0 ± 7,4
		-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
		5	4,90 ± 0,26	5,47 ± 0,16	4,42 ± 0,24	97,9 ± 5,2	109 ± 3	88,5 ± 4,8
	FM	10	11,03 ± 0,51	11,22 ± 0,07	8,54 ± 0,31	110 ± 5	112 ± 1	85,4 ± 3,1
		20	21,83 ± 0,25	22,09 ± 0,95	17,31 ± 0,18	109 ± 1	110 ± 5	86,6 ± 0,9
		-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
	FM	5	4,96 ± 0,21	5,77 ± 0,08	5,46 ± 0,28	99,2 ± 4,3	116 ± 2	109 ± 5
		10	9,99 ± 0,92	10,97 ± 0,49	10,28 ± 0,57	99,9 ± 9,2	110 ± 5	103 ± 6
		20	21,41 ± 0,66	21,40 ± 0,36	17,27 ± 0,71	107 ± 3	107 ± 2	86,4 ± 3,6

Amostra	Analito	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Recuperação (%)			
		Adicionado	Recuperado			A	B	204
			A	B	204			
S3	Hg(II)	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
		2,5	$2,75 \pm 0,05$	$2,55 \pm 0,17$	$2,62 \pm 0,13$	110 ± 2	102 ± 7	105 ± 5
		5	$5,87 \pm 0,07$	$5,43 \pm 0,20$	$5,46 \pm 0,22$	117 ± 1	109 ± 4	109 ± 4
		10	$11,0 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,15$	$10,26 \pm 0,52$	109 ± 4	103 ± 2	103 ± 5
	TH	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
		5	$5,33 \pm 0,11$	$5,04 \pm 0,24$	$4,11 \pm 0,10$	106 ± 2	101 ± 1	$82,3 \pm 1,9$
		10	$11,76 \pm 0,17$	$10,17 \pm 0,47$	$8,64 \pm 0,07$	118 ± 2	102 ± 5	$86,4 \pm 0,7$
		20	$22,01 \pm 0,94$	$20,54 \pm 0,16$	$16,63 \pm 0,50$	110 ± 5	103 ± 1	$83,2 \pm 2,5$
	FM	-	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
5		$4,81 \pm 0,44$	$5,93 \pm 0,07$	$5,41 \pm 0,46$	$96,3 \pm 8,8$	118 ± 1	108 ± 9	
10		$10,59 \pm 0,31$	$10,97 \pm 0,77$	$10,66 \pm 0,22$	106 ± 3	110 ± 8	107 ± 2	
	20	$21,20 \pm 0,60$	$20,0 \pm 1,0$	$19,18 \pm 0,41$	106 ± 3	$99,9 \pm 5,2$	$95,9 \pm 2,1$	

^a Condição aplicada: KBr/KBrO₃ (8/1,36 mmol L⁻¹) e 160 μL ácido ascórbico 12% (m/v).

Fonte: Autora, 2021.

(Conclusão)

Conforme pôde se observar (Tabela 28) as concentrações de mercúrio total para as amostras não fortificadas, estavam abaixo do limite de detecção, corroborando com os resultados obtidos no método de digestão assistida por micro-ondas. Para as amostras avaliadas, as recuperações obtidas foram quantitativas, independente da espécie de mercúrio e variaram entre $96,3 \pm 8,8$ a $117 \pm 2\%$ (antiespumante A); $97,1 \pm 1,4$ a $118 \pm 1\%$ (antiespumante B), e $82,3 \pm 1,9$ a $110 \pm 6\%$ (antiespumante 204), contemplando o intervalo entre 80 - 120% preconizado pela AOAC (2016), logo, confirmando a exatidão do método para os três antiespumantes avaliados.

Por fim, a metodologia desenvolvida simplificou o procedimento analítico de preparo de amostra e possibilitou a redução do tempo para o tratamento de 4 h (digestão assistida por micro-ondas - considerado método de referência) para 5 min por amostra (método oxidativo direto). Além disso, deve-se considerar que no procedimento utilizado empregou-se ácido mineral diluído quanto ao preparo da amostra. Sendo assim, a determinação de mercúrio total em amostras de cosméticos micelares, empregando o método oxidativo direto mostrou-se como uma alternativa viável, rápida e aplicável em análises de rotinas para matrizes cosméticas ou matrizes com surfactantes.

3.5 Conclusão

No método desenvolvido a digestão assistida por micro-ondas e a oxidação direta com auxílio de antiespumantes, foram avaliadas como estratégias analíticas para o preparo de amostra de cosméticos micelares para determinação de Hg_{total} por CV AFS. A digestão assistida por micro-ondas (método de referência) apresentou desempenho e parâmetros analíticos que permitem a quantificação de Hg_{total} em níveis traço para os tipos de amostras analisadas. Apesar de ser constatado que houve digestão incompleta das amostras de cosméticos micelares (verificado por RMN 1H e COD), o método mostrou-se exato com base nos ensaios de recuperação para diferentes espécies de mercúrio empregando a técnica de fluorescência atômica. Contudo, vale ressaltar que a concentração de carbono residual nos digeridos pode ser um fator negativo para utilização de outras técnicas (ICP-MS e ICP OES, por exemplo), levando talvez a necessidade de ajustes no protocolo de digestão.

A oxidação direta com auxílio de antiespumantes (método alternativo) demonstrou ser um procedimento de preparo de amostra simples, rápido e eficiente (exceto para o AA e AI) frente aos procedimentos de referência empregados para matrizes complexas (digestão por micro-ondas). Neste procedimento analítico o tempo de preparo de amostra foi reduzido de 4 h (método de referência) para 5 min sem aporte de alta energia, possibilitando além da utilização de ácidos diluídos, maior frequência analítica, requisitos que atendem os parâmetros da química analítica verde.

A utilização dos álcoois (AA e AI) como antiespumantes não se mostrou efetiva, possivelmente devido a limitada transferência do analito da solução para a fase de vapor, o que comprometeu a exatidão do método. Todavia, os antiespumantes A, B e 204 foram aplicados e apresentaram eficiência na supressão de espumas, portanto, permitindo a análise direta de Hg_{total} por CV AFS em amostras de cosméticos micelares de forma precisa e exata, apresentado parâmetros de desempenho alinhados aos níveis de concentração, preconizados pelas legislações nacional e internacional para estas matrizes. Por fim, as duas abordagens desenvolvidas podem ser aplicadas para análises de controle de qualidade de cosméticos micelares e produtos utilizados para *skincare* essenciais para garantir a segurança desses produtos, tendo em vista que, espécies potencialmente tóxicas derivadas do mercúrio podem causar diversos efeitos deletérios representando um risco para a saúde dos consumidores.

3.6 Perspectivas

Desenvolver novos procedimentos de preparo de amostra, visando a degradação de surfactantes nas amostras de cosméticos micelares;

Utilizar o método desenvolvido com antiespumantes a base de silicone e éteres, para determinação de outros possíveis contaminantes, a exemplo de analitos que formam hidretos (As, Sb e Se) nos cosméticos micelares, empregando a técnica HG AFS;

Desenvolver um material de referência certificado compatível com a matriz cosmética.

REFERÊNCIAS

- ARANDA, P. R.; GIL, R. A.; MOYANO, S.; VITO, I. DE; MARTINEZ, L. D. Slurry sampling in serum blood for mercury determination by CV-AFS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2–3, p. 1399–1403, 2009.
- ARAUJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 57, p. 2121–2132, 2002.
- ALEMANHA BfR. BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG. Kosmetische Mittel: BfR empfiehlt Schwermetallgehalte über Reinheitsanforderungen der Ausgangsstoffe zu regeln, **Stellungnahme n° 025, de 5 de abril de 2006**. Disponível em: http://www.bfr.bund.de/cm/343/kosmetische_mittel_bfr_empfiehl_schwermetallgehalte_ueber.pdf. Acesso em: 21 de julho de 2020.
- ALMEIDA, I. L. S.; OLIVEIRA, M. D. R.; SILVA, J. B. B.; COELHO, N. M. M. Suitable extraction of soils and sediments for mercury species and determination combined with the cold vapor generation atomic absorption spectrometry technique. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 326–330, 2016.
- ALMEIDA, Ione Lucenir Silva. **Desenvolvimento de um método aplicado à determinação de mercúrio em amostras de álcool combustível e solos por geração de vapor frio e espectrometria de absorção atômica**. 2014. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- ALVAREZ-RIVERA, G.; LLOMPART, M.; LORES, M.; Garcia-Jares, C. Preservatives in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. *In*: Salvador, A. and Chisvert, A. (Ed.). **Analysis of Cosmetic Products**. 2. ed., Rockville, Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018. Chap. 9, p. 175–224.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemist. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *In*: Latimer Jr., W. G. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 20. ed. Rockville, USA: AOAC INTERNATIONAL, 2016. Appendix F, p. 1–18.
- ASTOLFI, M. L.; PROTANO, C.; MARCONI, E.; PIAMONTI, D.; MASSIMI, L.; BRUNORI, M.; VITALI, M.; CANEPARI, S. Simple and rapid method for the determination of mercury in human hair by cold vapour generation atomic fluorescence spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 150, p. 104186, 2019.
- BARIN, J. S.; TISCHER, B.; PICOLOTO, R. S.; ANTES, F. G.; SILVA, F. E. B. DA; PAULA, F. R.; FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: A critical study of digestion methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p. 352–358, 2014.
- BIZZI, C. A.; PEDROTTI, M. F.; SILVA, J. S.; BARIN, J. S.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted digestion methods: Towards greener approaches for plasma-

based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 8, p. 1448–1466, 2017.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 193–196, 2011.

BOROWSKA, S.; BRZÓSKA, M. M. Metals in cosmetics: Implications for human health. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 551–572, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 528 de 11/08/2021. Lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfume. Edição 151, Seção 1, p. 96. **Diário Oficial da União**, Brasília: DF, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 530, de 4 de agosto de 2021. Vol. 2021, p. 1–46, 2021. Seção 1, **Diário Oficial da União**, Brasília: DF, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: DF, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 44 de 09/08/2012. Lista de Substância Corantes permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, 2012. Seção 1, **Diário Oficial da União**, Brasília: DF, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 29 de 01/06/2012. Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes" e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: DF, 2012.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. Rev., 07, Rio de Janeiro: INMETRO, p. 28, 2018.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364–367, 1974.

BUTCHER, D. J. Atomic fluorescence spectrometry : A review of advances in instrumentation and novel applications instrumentation and novel applications. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, n. 5, p. 397–416, 2016.

CASSIDAY, L. Surfactants and skin. **INFORM: International News on Fats, Oils, and Related Materials**, v. 27, p. 694–699, 2016.

CERUTTI, S.; PACHECO, P. H.; GIL, R.; MARTINEZ, L. D. Green sample preparation strategies for organic/inorganic compounds in environmental samples. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 19, p. 76–86, 2019.

CHEN, W. N.; JIANG, S. J.; CHEN, Y. L.; SAHAYAM, A. C. Slurry sampling flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace Ge, As, Cd, Sb, Hg and Bi in cosmetic lotions. **Analytica Chimica Acta**, v. 860, p. 8–14, 2015.

CosIng - Cosmetic ingredient database. **European Commission**. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=app.welcome>>. Acesso em: 20 de jun. de 2021.

DADACH, Z. E.; AL-AMERI, K. Foaming in Seawater Backpressure Tower. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)**, v. 76, n. 1, p. 44–55, 2021.

DENKOV, N. D.; MARINOVA, K. G.; TCHOLAKOVA, S. S. Mechanistic understanding of the modes of action of foam control agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 206, p. 57–67, 2014.

DENKOV, N. D. Mechanisms of foam destruction by oil-based antifoams. **Langmuir**, v. 20, n. 22, p. 9463–9505, 2004.

DUVAL, P. B. Understanding Nitrate Chemistry – The Key to Safer and More Efficient TRU Waste Acceptance. *In*: Transactions of the American Nuclear Society. **Anais American Nuclear Society**. v. 120, n. 4, p. 185–187, 2019.

ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations (21 CFR 700.13). Subchapter G - COSMETICS: Part 700 - GENERAL, Subpart B - Requirements for Specific Cosmetic Products. *In*: Sec. 700.13. **Use of mercury compounds in cosmetics including use as skinbleaching agents in cosmetic preparations also regarded as drugs**. Pag. 141 – 142, 2022.

EUROPEAN UNION. Regulation (EC) n° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (Text with EEA relevance). **Official Journal of the European Union**, n. 1223, 2009.

FARIAS, S. L. DE; COSTA, L. G. DA; CALILI, R. F.; RIOS, R. M.; OLIVEIRA, E. C. DE. Metrological evaluation of the analytical curve for determination of very low concentrations of sulphur content in diesel oil S-10. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 852–858, 2015.

GÁMIZ-GRACIA, L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Determination of mercury in cosmetics by flow injection-cold vapour generation-atomic fluorescence spectrometry with on-line preconcentration. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 14, n. 10, p. 1615–1617, 1999.

GAO, Y.; SHI, Z.; ZONG, Q.; WU, P.; SU, J.; LIU, R. Direct determination of mercury in cosmetic samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry after dissolution with formic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 812, p. 6–11, 2014.

GARITTA, J. A.; FIALHO, L. L.; OLIVEIRA, G. S. DE; MARIA, R. M.; PIROLA, C.; FERREIRA, A. G.; NÓBREGA, J. A. Microwave-Assisted Acid Digestion: Evaluation of

Reaction Vessel Design and Performance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 4, p. 702–711, 2021.

GOMES, H. O.; CARDOSO, R. S.; COSTA, J. G. M.; SILVA, V. P.A.; NOBRE, C. A.; TEIXEIRA, R. N.P.; NASCIMENTO, R. F. Statistical evaluation of analytical curves for quantification of pesticides in bananas. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128768, 2021.

GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 909, p. 24–29, 2016.

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 396–401, 2009.

GONZALEZ-RAYMAT, H.; LIU, G.; LIRIANO, C.; LI, Y.; YIN, Y.; SHI, J.; JIANG, G.; CAI, Y. Elemental mercury: Its unique properties affect its behavior and fate in the environment. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 69–86, 2017.

GUO, M.; WANG, J.; DU, R.; LIU, Y.; CHI, J.; HE, X.; HUANG, K.; LUO, Y.; XU, W. A test strip platform based on a whole-cell microbial biosensor for simultaneous on-site detection of total inorganic mercury pollutants in cosmetics without the need for predigestion. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 150, p. 111899, 2020.

HEALTH CANADA. **Guidance on Heavy Metal Impurities in Cosmetics**. v. 632, p. 2012, 2012.

HEPP, N. M.; MINDAK, W. R.; GASPER, J. W.; THOMPSON, C. B.; BARROWS, J. N. Survey of cosmetics for arsenic, cadmium, chromium, cobalt, lead, mercury, and nickel content. **J. Cosmet. Sci.**, v. 65, p. 125–145, 2014.

ISA, I. M.; SAIDIN, M. I.; AHMAD, M.; HASHIM, N.; BAKAR, S. A.; ALI, N. M.; M.SI, S. Chloroplatinum(II) complex-modified MWCNTs paste electrode for electrochemical determination of mercury in skin lightening cosmetics. **Electrochimica Acta**, v. 253, p. 463–471, 2017.

IWEGBUE, C. M. A.; BASSEY, F. I.; TESI, G. O.; ONYELONI, S. O.; OBI, G.; MARTINCIGH, B. S. Safety evaluation of metal exposure from commonly used moisturizing and skin-lightening creams in Nigeria. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 484–490, 2015.

JIA, X.; HAN, Y.; WEI, C.; DUAN, T.; CHEN, H. Speciation of mercury in liquid cosmetic samples by ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 7, p. 1380–1386, 2011.

LAVILLA, I.; CABALEIRO, N.; COSTAS, M.; LA CALLE, I. DE; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted emulsification of cosmetic samples prior to elemental analysis by different atomic spectrometric techniques. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 109–116, 2009.

- LI, S.; WANG, M.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; YANG, B. Cloud point extraction for trace inorganic arsenic speciation analysis in water samples by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 111, p. 74–79, 20 jul. 2015.
- LINS, S. S.; VIRGENS, C. F.; SANTOS, W. N. L.; HELENA, I.; ESTEVAM, S.; CARDOSO, G.; SILVA, C.; FELIX, A.; LUIS, S.; FERREIRA, C. On-line solid phase extraction system using an ion imprinted polymer based on dithizone chelating for selective preconcentration and determination of mercury (II) in natural waters by CV AFS. **Microchemical Journal**, v. 150, p. 104075, 2019.
- LIU, M.; LIU, T.; LIU, J.; MAO, X.; NA, X.; DING, L.; CHEN, G.; QIAN, Y. Determination of arsenic in biological samples by slurry sampling hydride generation atomic fluorescence spectrometry using: In situ dielectric barrier discharge trap. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 3, p. 526–534, 2019.
- LORETZ, L. J. *et al.* Exposure data for cosmetic products: Facial cleanser, hair conditioner, and eye shadow. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1516–1524, 2008.
- LUNDOV, M. D.; MOESBY, L.; ZACHARIAE, C.; JOHANSEN, J. D. Contamination versus preservation of cosmetics: A review on legislation, usage, infections, and contact allergy. **Contact Dermatitis**, v. 60, n. 2, p. 70–78, 2009.
- MAGALHÃES, W. Gestão em P&D: Conservantes. **Cosmetics online**. 2011. Disponível em: <https://www.cosmeticsonline.com.br/noticias/detalhes-colunas1/684/conservantes>. Acesso em: 20 de ago. 2018.
- MAGALHÃES, A. C. R.; SANTOS, A. S. DOS; TAVARES, M. C.; JUNIOR, L. P.; BARIN, J. S.; SANTOS, J. C. C.; KORN, M.; SANTANA, R. M. M. A vessel-inside-vessel microwave-assisted digestion method based on SO₃ generation in situ for the mineral determination of fatty samples. **Talanta**, v. 226, p. 122094, 2021.
- MAMDOUH, A. Z.; ZAHRAN, E.; MOHAMED, F.; ZAKI, V. Nannochloropsis oculata feed additive alleviates mercuric chloride-induced toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, v. 238, p. 105936, 2021.
- MESKO, M. F.; NOVO, D. L. R.; COSTA, V. C.; HENN, A. S.; FLORES, E. M. M. Toxic and potentially toxic elements determination in cosmetics used for make-up: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1098, p. 1–26, 2020.
- MIRANDA-ANDRADES, J. R.; KHAN, S.; PEDROZO-PENÃFIEL, M. J.; ALEXANDRE, K.C. B.; MACIEL, R. M.; ESCALFONI, R.; LUIZA, M.; TRISTÃO, B.; AUCELIO, R. Q. Combination of ultrasonic extraction in a surfactant-rich medium and distillation for mercury speciation in offshore petroleum produced waters by gas chromatography cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 158, p. 105641, 2019.
- MORISSET, T.; RAMIREZ-MARTINEZ, A.; WESOLEK, N.; ROUDOT, A. Probabilistic mercury multimedia exposure assessment in small children and risk assessment. **Environment International**, v. 59, p. 431–441, 2013.

- NG, S. Y.; DEWI, F.; WANG, J.; SIM, L. P.; SHIN, R. Y. C.; LEE, T. K. Development of a cosmetic cream certified reference material: Certification of lead, mercury and arsenic mass fractions in cosmetic cream. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 389, p. 59–65, 2015.
- NÓBREGA, J. A.; PIROLA, C.; FIALHO, L. L.; ROTA, G.; CAMPOS JORDÃO, C. E. K. M. A. DE; POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, v. 98, p. 272–276, 2012.
- NOHYNEK, G. J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 239–259, 2010.
- OLIVEIRA, M. J.; CUNHA, F. A. S.; CALDAS SANTOS, J. C. Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 36, n. 4, p. 740–746, 2021.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; Vyvyan, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- PEI, H.; ZHANG, G.; GE, J.; ZHANG, L.; MA, M. Effect of the addition of low molecular weight alcohols on heavy oil recovery during alkaline flooding. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 4, p. 1301–1307, 2014.
- PINTO, V. S.; NERY, A. K.; LIÃO, E. L. M. Foodmics by ¹H NMR for monitoring of oxidative stability of margarines submited of heat treatment. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 866–873, 2019.
- PODGÓRSKA, A.; PUŚCION-JAKUBIK, A.; GRODZKA, A.; NALIWAJKO, S. K.; MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA, R.; SOCHA, K. Natural and conventional cosmetics—mercury exposure assessment. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 4088, 2021.
- PUGH, R. J. Foaming, foam films, antifoaming and defoaming. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 64, n. 95, p. 67–142, 1996.
- REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. 11. ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2016.
- REZENDE, D. A.; BITTENCOURT, R. R.; MANSUR, C. R. E. Evaluation of the efficiency of polyether-based antifoams for crude oil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 76, n. 3–4, p. 172–177, 2011.
- RIBEIRO, F. A. D. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. DA; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.
- ROCHA, D. L.; BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R. P.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. Greening sample preparation in inorganic analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 79–92, 2013.

SABER-TEHRANI, M.; GIVIANRAD, M. H.; HASHEMI-MOGHADDAM, H. Determination of total and methyl mercury in human permanent healthy teeth by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction in organic phase. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1319–1325, 2007.

SALAMA, A. K. Assessment of metals in cosmetics commonly used in Saudi Arabia. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 10, 2015.

SALVADOR, A.; MARCH, J. G.; VIDAL, M. T.; CHISVERT, A.; BALAGUER, A. General Review of Published Analytical Methods for Cosmetics. *In*: Salvador, A.; Chisvert, A. (Ed.) **Analysis of Cosmetic Products**. Elsevier, 2007. p. 72 – 82.

SÁNCHEZ-RODAS, D.; CORNS, W. T.; CHEN, B.; STOCKWELL, P. B. Atomic Fluorescence Spectrometry: a suitable detection technique in speciation studies for arsenic, selenium, antimony and mercury. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 933–946, 2010.

SILVA JUNIOR, M. M.; BASTOS SILVA, L. O.; LEAO, D. J.; LOPES DOS SANTOS, W. N.; WELZ, B.; COSTA FERREIRA, S. L. Determination of mercury in alcohol vinegar samples from Salvador, Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 47, p. 623–627, 2015.

SILVA, R. J. N. B. Spreadsheet for designing valid least-squares calibrations: A tutorial. **Talanta**, v. 148, p. 177–190, 2016.

SOO, Y. O.; CHOW, K.; UK, M.; LAM, C. W.; LAI, F. M.; SZETO, C.; UK, M.; CHAN, M. H.; LI, P. K. A whitened face woman with nephrotic syndrome. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 41, n. 1, p. 250–253, 2003.

SOUZA, L. R. R.; TEIXEIRA ZANATTA, M. B.; AMOROSO DA SILVA, I.; MESQUITA SILVA DA VEIGA, M. A. Mercury determination in soil and sludge samples by HR CS GFAAS: comparison of sample preparation procedures and chemical modifiers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 9, p. 1477–1485, 2018.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005.

STURGEON, R. E.; GUO, X.; MESTER, Z. Chemical vapor generation: Are further advances yet possible? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 4, p. 881–883, 2005.

TAKASE, I.; BORGES PEREIRA, H.; LUNA, A. S. A GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR EM ESPECTROMETRIA ATÔMICA. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1132–1144, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Resulting from the Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 4–5, 2002.

TSALEV, D. L.; SPERLING, M.; WELZ, B. On-line microwave sample pre-treatment for hydride generation and cold vapour atomic absorption spectrometry Part 2. Chemistry and applications. **Analyst**, v. 117, n. 11, p. 1735–1741, 1992.

VARDAR-SUKAN, F. CONSEQUENCES, PREVENTION AND DESTRUCTION. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 6-5, p. 913–948, 1998.

WANG, W.; BAO, N.; YUAN, W.; SI, N.; BAI, H.; LI, H.; ZHANG, Q. Simultaneous determination of lead, arsenic, and mercury in cosmetics using a plastic-based disposable electrochemical sensor. **Microchemical Journal**, v. 148, p. 240–247, 2019.

WANG, Y.; YANG, H.; PSCHENITZA, M.; NIESSNER, R.; LI, Y.; KNOPP, D.; DENG, A. Highly sensitive and specific determination of mercury(II) ion in water, food and cosmetic samples with an ELISA based on a novel monoclonal antibody. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 9, p. 2519–2528, 2012.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. Weinheim: WILEY-VCH, 1999.

ZHENG, H.; HONG, J.; LUO, X.; LI, S.; WANG, MEIXIA; YANG, B.; WANG, MEI. Combination of sequential cloud point extraction and hydride generation atomic fluorescence spectrometry for preconcentration and determination of inorganic and methyl mercury in water samples. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 806–812, 2019.

ZOU, Z.; DENG, Y.; HU, J.; JIANG, X.; HOU, X. Recent trends in atomic fluorescence spectrometry towards miniaturized instrumentation-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1019, p. 25–37, 2018.

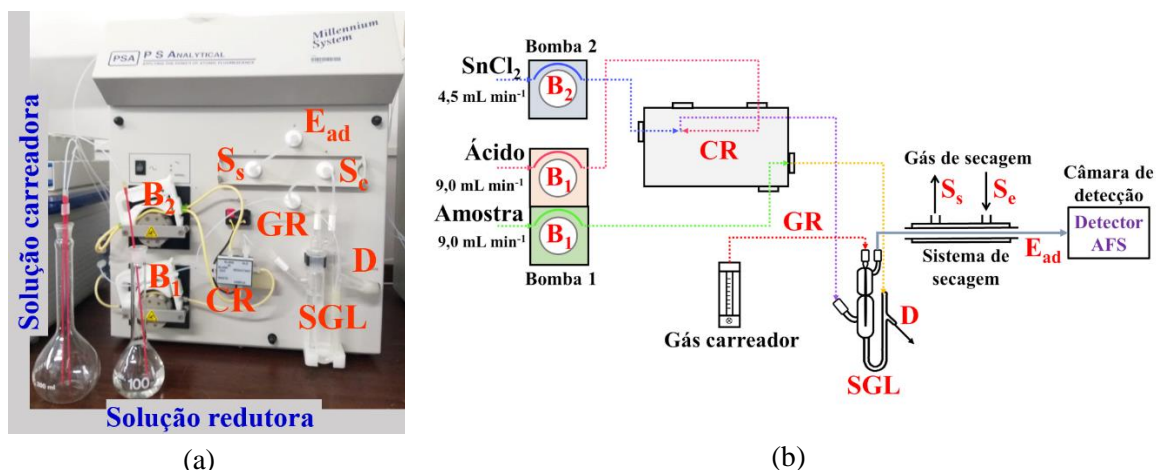
APÊNDICE A – ARTIGO 1

A.1 Determinação de mercúrio (timerosal) em vacinas usando diferentes oxidantes e espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio em ácidos diluídos

A.1.1 Procedimento de medições analíticas por CV AFS

Para as medidas dos sinais analíticos, o mercúrio orgânico (TH) foi oxidado previamente (digestão assistida por micro-ondas e/ ou decomposição oxidativa direta com KBr/KBrO_3 e KMnO_4) para Hg_{ino} e posteriormente reduzido para sua forma volátil (Hg^0) em meio ácido (HCl ou HNO_3) para determinação por CV AFS. O sistema de análise do equipamento, possui duas bombas peristálticas independentes, uma câmara de reação, um separador gás-líquido, um sistema de secagem e uma câmara de detecção composta por uma lâmpada de cátodo oco de alta intensidade (BDHCL, *Boosted – Discharge Hollow Cathode Lamps*) com comprimento de onda de 253,7 nm, correspondente a fonte de radiação específica para o mercúrio e um tubo fotomultiplicador, conforme está apresentado na Figura A1.

Figura A1 - Sistema de fluxo contínuo para determinação de mercúrio total por CV AFS.



B_1 e B_2 = bombas peristálticas; CR = célula de reação; GR = saída do gás carreador; S_e = entrada no sistema de secagem; S_s = saída no sistema de secagem; SGL = separado gás – líquido; E_{ad} = entrada do vapor Hg^0 na câmara de detecção e D = descarte.

Fonte: Autora, 2021.

No procedimento para redução do $\text{Hg}(\text{II})$, a solução para análise (padrões e/ou amostras), solução carreadora e redutora são transportadas para o sistema reacional em fluxo contínuo, com vazões de 9,0; 9,0 e 4,5 mL min^{-1} , respectivamente. Estas soluções são simultaneamente direcionadas em convergência para a célula de reação, onde ocorre a

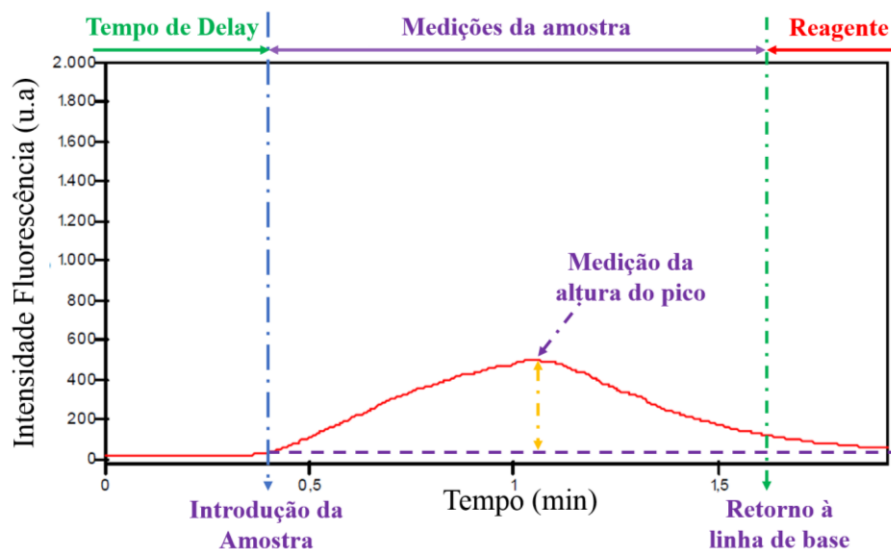
homogeneidade de todas as soluções e redução efetiva do analito. Posteriormente o vapor de mercúrio resultante (Hg^0) é transportado pelo gás carreador (argônio) com uma vazão de 250 mL min^{-1} para o separador gás-líquido, onde ocorre a drenagem do fluido, em seguida, o analito é direcionado para um sistema de secagem configurado com tubos concêntricos, denominado *Perma Pure*, pelo qual circula o gás auxiliar ou gás de secagem (ar sintético) com uma vazão de 2500 mL min^{-1} , seguidamente o Hg^0 sem umidade é carregado pelo argônio e direcionado ao caminho óptico do medidor AFS (câmara de detecção), sequencialmente o sinal analítico de fluorescência é mensurado (Figura A1-b). O detector AFS permite a seleção de quatro níveis de sensibilidade (ganho) (1; 10; 100 ou 1000 vezes), os quais promovem um amplo intervalo para as determinações das concentrações do analito.

Durante a etapa das medições analíticas, visando minimizar a aderência do analito à superfície dos frascos de vidro, onde as soluções padrão e amostras foram acondicionadas, cada frasco foi homogeneizado anteriormente a cada medição. Durante as medições consecutivas das amostras a tubulação foi lavada com água ultrapura por 2 vezes, no intervalo de cada procedimento, objetivando reduzir possíveis efeitos de memória. Além disso, foi realizada a limpeza do sistema em fluxo do equipamento com ácido clorídrico e/ou nítrico diluído ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e com água ultrapura visando remover qualquer resíduo remanescente de mercúrio.

A.1.2 Avaliação dos parâmetros instrumentais

Inicialmente, foi verificado se os parâmetros de operação (*delay*, análise e memória), sugeridos no manual do equipamento, influenciaram na sensibilidade do sinal analítico para o intervalo de concentração em estudo ($0,5 - 20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em Hg_{total}). Esses parâmetros estão associados ao ciclo de formação de vapor químico e desempenho das medições analíticas. O tempo de *delay* (TD) está relacionado ao ciclo percorrido pela amostra até a câmara de reação. No tempo de análise (TA), a amostra é introduzida no separador gás-líquido e direcionada para o sistema de detecção do AFS. Na etapa subsequente referente ao tempo de memória (TM), é cessado o bombeamento da amostra e esta é desviada para o descarte do equipamento e a solução de ácido carreador é direcionada para separador gás-líquido, estabelecendo a linha de base para as próximas medições (PSA Analytical, 2013), conforme está apresentado na Figura A2.

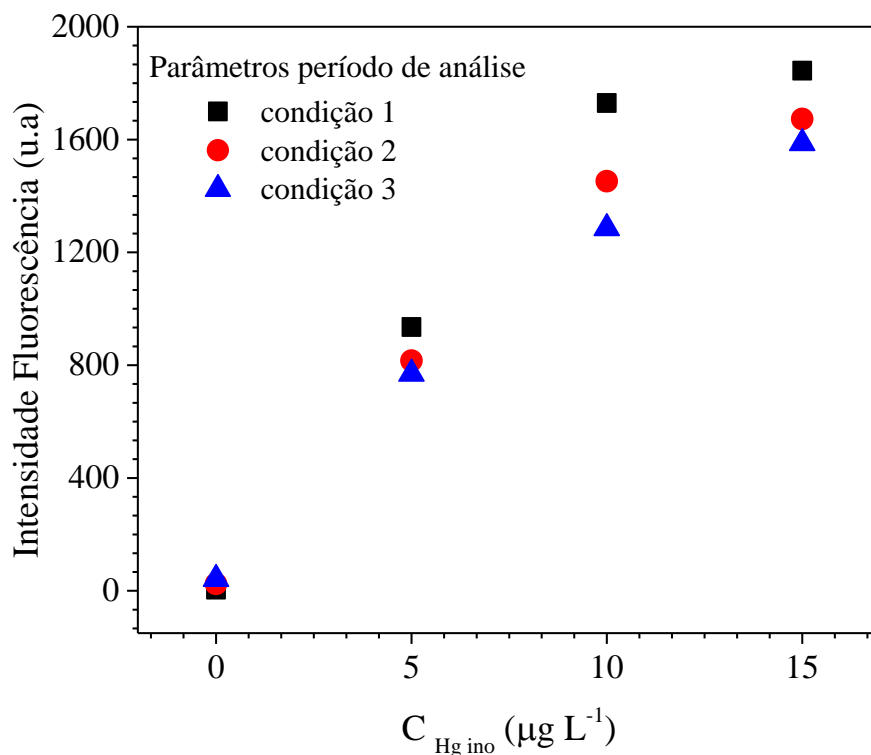
Figura A2 - Perfil sinal analítico para uma solução padrão de Hg (II) na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando os parâmetros de operação: 15s *delay*, 40s análise e 60s memória. Condições experimentais: HCl $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ acidificação do meio, KBr/KBrO₃ ($2/0,34 \text{ mmol L}^{-1}$), 20 μL de ácido ascórbico 12% (m/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L^{-1} .



Fonte: Autora, 2021.

Para avaliação dos parâmetros de operação, três condições foram avaliadas, no ganho de 10 do espectrômetro de fluorescência atômica por vapor frio: condição (1) preconizada pelo fabricante do equipamento (PSA Analytical, 2013), condição (2) e condição (3) adotada por Santos *et al.* (2021), para análises de Hg_{total} em amostras de água, sangue e urina. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura A3.

Figura A3 - Parâmetros instrumentais para determinação de mercúrio total por CV AFS empregando diferentes condições para os parâmetros de operação: (1) 15 s *delay*, 40 s análise e 60 s memória, (2) 15 s *delay*, 40 s análise e 40 s memória e (3) 5 s *delay*, 40 s análise e 40 s memória. Condições experimentais: solução padrão Hg(II) em três níveis de concentrações (5,0; 10 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$), HCl 0,60 mol L^{-1} acidificação do meio, KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L^{-1}), 20 μL de ácido ascórbico 12% (m/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L^{-1} .



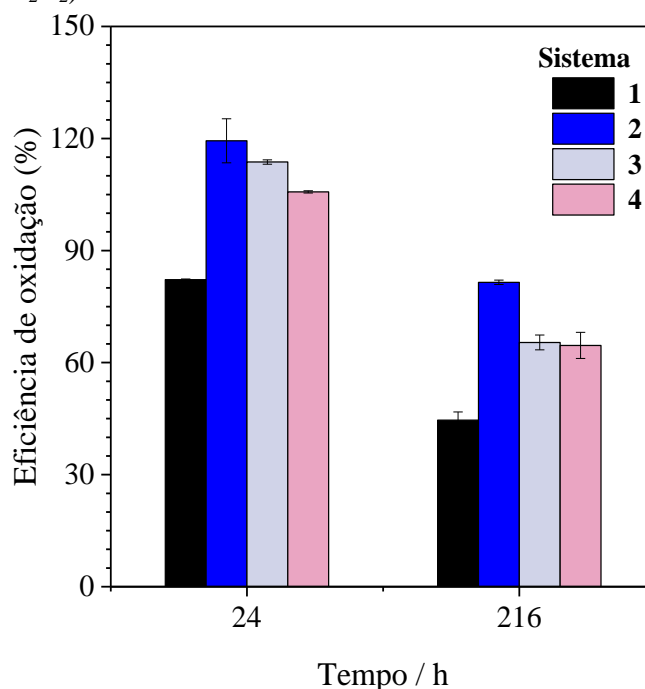
Fonte: Autora, 2021.

A condição 1, apresentou as maiores intensidades para os sinais de fluorescência, entretanto, as três condições avaliadas não diferem estatisticamente (95% probabilidade), contudo, optou-se por selecionar essa condição, sugerida pelo fabricante do equipamento, para os estudos de determinação de Hg_{total} em amostras de vacinas.

A.2 Estudo da estabilidade da solução de TH digerida

Para os quatro sistemas reacionais, empregados para digestão da solução de TH, foi realizado um estudo nas soluções digeridas, para analisar se ocorreria perdas do analito, após digestão. Para tanto, as medições de Hg_{total} por CV AFS, foram realizadas no período de até 24 h após digestão, em seguida, os digeridos foram armazenados em recipientes fechados de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração e após nove dias (216 h), as determinações foram novamente efetuadas (Figura A4).

Figura A4 - Estudo estabilidade da solução digerida de TH, empregando diferentes proporções de ácido nítrico 14 mol L^{-1} e peróxido de hidrogênio 30 % (m/m). Condições experimentais: volume de 1,5 mL TH 50 mg L^{-1} , S₁ (8 mL HNO₃); S₂ (7 mL HNO₃/1 mL H₂O₂); S₃ (6 mL HNO₃/2 mL H₂O₂) e S₄ (5 mL HNO₃/3 mL H₂O₂).



Fonte: Autora, 2021.

Como pode ser observado, foi evidenciado uma redução proeminente do analito nas soluções digeridas. No período de 24 h após a digestão, os resultados obtidos foram: ($82 \pm 0,2\%$; $119 \pm 6\%$; $114 \pm 1\%$ e $106 \pm 0,3\%$), para os sistemas 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Figura S4). Para as medições realizadas posteriormente no período de 216h, a eficiência de oxidação diminuiu para ($45 \pm 2\%$; $81 \pm 1\%$; $65 \pm 2\%$ e $64 \pm 4\%$), respectivamente. Comportamento semelhante foi observado por Gomes (2010), que avaliou a estabilidade do material digerido de amostras de arroz ao longo de 11 dias para determinação de Hg_{total} por CV AFS e foi constatado diminuição na concentração do analito neste período. Em outro estudo realizado por Rui-de-Cenzano *et al.* (2016), os autores avaliaram a perda de mercúrio em extratos de amostras de cogumelos, após diferentes dias de armazenamento e os resultados obtidos evidenciaram que as reduções nas concentrações de mercúrio são mais acentuadas nos três dias iniciais. Diante do exposto, ficou evidente que o procedimento de preparo de amostra e determinação do mercúrio, devem ser executados o mais rapidamente possível, não ultrapassando o período de 24 h, assim, esta condição foi adotada para todas as etapas de otimização e desenvolvimento do método proposto.

REFERÊNCIAS

GOMES, M.J.F. **Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados à química forense e alimentos**. 2010. 156 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

PSA Analytical, Millennium Merlin User Manual: **PSA Customer Technical Information File**, United Kingdom, 2013.

RUIZ-DE-CENZANO, M.; LÓPEZ-SALAZAR, O.; CERVERA, M. L.; LA GUARDIA, M. DE. Non-chromatographic speciation of mercury in mushrooms. **Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1774–1779, 2016.

SANTOS, M. C.; SILVA FILHO, R. C.; LEITE, A. C. R.; NASCENTES, C. C.; BOTERO, W. G.; SANTOS, J. C. C. Evaluation of Potentially Toxic Elements in Mundaú Lagoon (Maceió, AL-Brazil): Systematic Environmental Monitoring of Water and Food Quality. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 9, p. 1762–1772, 2021.

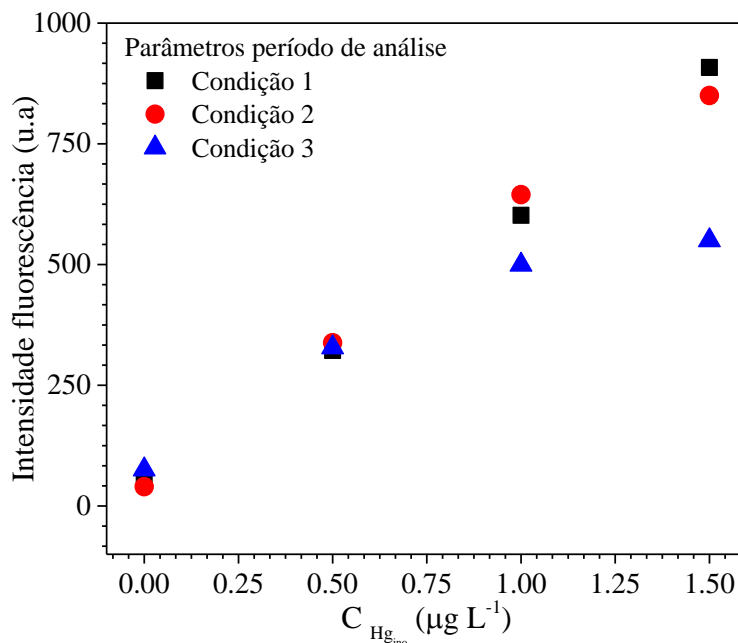
APÊNDICE B – ARTIGO 2

B.1 Avaliação de diferentes estratégias de preparo de amostra para determinação de mercúrio total em amostras de cosméticos micelares empregando CV AFS

B.1.1 Avaliação de parâmetros instrumentais

Os parâmetros instrumentais para determinação de mercúrio total por CV AFS (*delay*, análise e memória) foram avaliados quanto a sensibilidade do método. De acordo com as recomendações do fabricante do equipamento (PSA ANALYTICAL, 2013) valores de 15, 40 e 60 s (*delay*, análise, memória, respectivamente), levaram a uma condição que permite quantificar mercúrio total de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (no ganho de 10), constatado em estudos anteriores (OLIVEIRA *et al.*, 2021; TALL *et al.*, 2021) Assim, experimentos foram realizados para avaliar os parâmetros instrumentais, empregando-se o ganho de 100 e um intervalo de concentração para mercúrio de 0,1 a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura B1). Os resultados obtidos para as condições (1) e (2) foram estatisticamente similares (95% de confiança), assim, ambas as condições poderiam ser utilizadas. Contudo, os valores recomendados pelo fabricante do equipamento (condição 1) foram selecionados, e padronizou-se esta condição para o ganho de 10 e 100 para as etapas subsequentes deste trabalho.

Figura B1 - Avaliação preliminar parâmetros instrumentais para determinação de mercúrio total por CV AFS, empregando diferentes condições: (1) 15 s *delay*, 40 s análise e 60 s memória, (2) 15 s *delay*, 40 s análise e 40 s memória e (3) 5 s *delay*, 40 s análise e 40 s memória, todas os sistemas no ganho de 100. Condições experimentais: solução padrão Hg(II) em três níveis de concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), HCl 0,60 mol L^{-1} , KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L^{-1}), 40 μL de ácido ascórbico 12% (m/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L^{-1} .



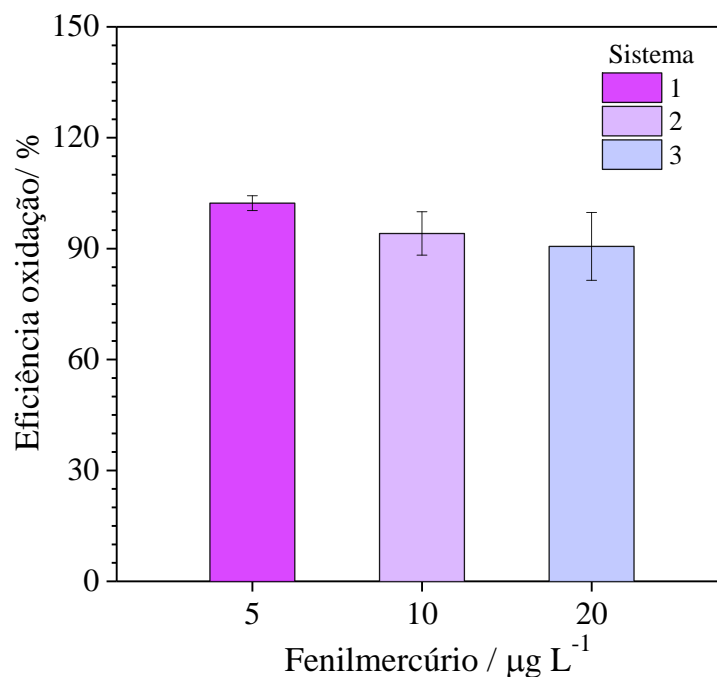
Fonte: Autora, 2021.

Por fim, dada a complexidade das matrizes cosméticas selecionadas para o estudo e considerando os diferentes tipos de surfactantes presentes (Tabela 14), é necessário enfatizar que suprimir a formação de espumas, as quais levam a interferência na geração de vapor químico para a técnica de CV AFS, constituiu o maior desafio para a determinação de mercúrio total explorando o procedimento de decomposição oxidativa direta nas amostras de cosméticos micelares. Deste modo, álcoois de baixa massa molar, derivados de éteres e compostos a base de silicone, foram avaliados como agentes antiespumantes.

B.1.2 Método oxidativo direto para soluções de FM

Previamente Oliveira *et al.* (2021), otimizaram o tipo e concentração dos ácidos inorgânicos na geração de vapor químico para TH e Hg(II) por CV AFS. Assim, a condição ótima deste trabalho foi aplicada para fenilmercúrio (FM), em três níveis de concentrações 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$), conforme Figura B2.

Figura B2 - Avaliação do efeito do ácido clorídrico na eficiência de oxidação de FM a Hg(II). Condições experimentais: HCl 0,60 mol L⁻¹, KBr/KBrO₃ (2/0,34 mmol L⁻¹); tempo de reação 5,0 min, 40 μL ácido ascórbico 12 % (m/v), solução carreadora HCl 20% (v/v) e solução redutora SnCl₂ 90 mmol L⁻¹.



Fonte: Autora, 2021.

Os resultados obtidos (Figura B2), mostraram que em meio de HCl 0,60 mol L⁻¹ ocorreu oxidação efetiva do FM a Hg(II). Para os níveis de concentrações do analito avaliados, a eficiência de oxidação variou de 91 ± 9 a 102 ± 2%, ($n = 3$). Estes resultados foram similares aos obtidos para solução de TH para os mesmos níveis de concentrações (100 ± 6 a 103 ± 5%), ($n = 3$), evidenciando a eficácia da metodologia empregada para as soluções de diferentes compostos organomercuriais.

B.1.3 Digestão assistida por micro-ondas para soluções de FM

Para avaliar a efetividade do procedimento de digestão para solução de FM, aplicou-se o procedimento otimizado por Oliveira *et al.* (2021) com soluções e amostras contendo TH. Sendo assim, seguiu-se abordagem analítica empregada para o timerosal para soluções de FM a 20 μg L⁻¹. Os resultados obtidos indicaram eficiência na decomposição, uma vez que, o mercúrio inorgânico quantificado (como Hg_{total}) perfaz 100 ± 3% ($n = 3$), em relação

ao mercúrio orgânico presente no meio na forma de FM. Ressalta-se que este procedimento foi concordante com os valores obtidos para o TH ($106 \pm 1 \%$, $n = 3$).

B.1.4 Avaliação da sensibilidade para determinação de mercúrio total após preparo de amostra por micro-ondas nas amostras de cosméticas micelares por CV AFS

Nas amostras de cosméticos micelares avaliadas o mercúrio pode ser utilizado como conservante organomercurial, na forma de sais de fenilmercúrio e timerosal, dessa forma, aplicando-se a digestão assistida por micro-ondas ocorre a decomposição da fração orgânica, e assim, apenas o mercúrio inorgânico presente no meio, é disponibilizado para quantificação por CV AFS. Desta maneira, nas condições otimizadas (Oliveira *et al.*, 2021), realizou-se o procedimento de pré-digestão a temperatura ambiente, previamente a digestão assistida por micro-ondas para quatro amostras cosméticas (S1, S2, S5 e S6) (Tabela 14), em triplicata, utilizando volume de amostra de 1,0 mL. Na solução resultante o volume foi completado com água ultrapura para 25,0 mL e a acidez para os digeridos finais foi determinada ($3,02 \pm 0,10 \text{ mol L}^{-1}$).

Sequencialmente, a compatibilização da acidez do meio reacional foi efetuada, com solução de HNO_3 1 mol L^{-1} para determinação de mercúrio total ($0,50 - 20 \mu\text{g L}^{-1}$). Seguidamente após a redução do Hg(II) empregando SnCl_2 em meio ácido, as medições analíticas foram efetuadas no ganho de 10 do espectrômetro de fluorescência atômica por vapor frio e observou-se que os sinais analíticos, não apresentaram variações na linha base, evidenciando, possivelmente, que as concentrações do mercúrio estavam abaixo do limite de detecção da técnica. Uma vez que as amostras foram diluídas 5000 vezes, é relevante destacar que, a sensibilidade do espectrômetro de fluorescência atômica foi alterada para garantir a quantificação do analito em menores níveis de concentração. Neste sentido, para fins comparativos e visando aprimorar as condições otimizadas, optou-se por realizar novos experimentos, empregando-se fatores de diluições menores (60 vezes) e efetuando-se as medições analíticas em uma sensibilidade maior para a técnica de CV AFS (ganho 100) com intervalo de concentração ($0,10 - 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Assim, cabe salientar que, o estudo empregando estas variações instrumentais e diferentes sensibilidades foi primordial, para evitar diluições excessivas das soluções digeridas e possibilitar a quantificação do analito, dessa forma, o ganho de 100 foi selecionado para os experimentos subsequentes.

B.1.5 Avaliação do volume das amostras de cosméticos micelares para o método de oxidação direta

Para aplicação da reação de bromação em amostras de cosméticos micelares, inicialmente avaliou-se a viabilidade da aplicação das condições otimizadas por Oliveira *et al.* (2021) para amostras de vacinas, neste caso, sem adição de antiespumantes no meio reacional. Para tanto, foram avaliados diferentes volumes (0,125 - 2,0 mL) das amostras S1, S2 e S5 (Tabela 14), quanto a recuperação de TH ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) no meio. Para volumes menores das amostras de cosméticos micelares, não foi observado variabilidade do sinal analítico durante as medições por CV AFS, entretanto, as recuperações (em %) obtidas foram: S1 (46 ± 2 e 34 ± 4), S2 (39 ± 2 e 17 ± 1) e S5 (59 ± 2 e 45 ± 3), respectivamente para os volumes de 125 e 250 μL . Neste caso, os valores menores para as recuperações obtidas podem estar relacionadas a interferências na geração do vapor químico, transferência e/ou transporte do analito devido a composição da matriz, visto que, a formação de espumas diminui consideravelmente e até impede a geração de vapor de Hg^0 (MADRID *et al.*, 1994). Para maiores volumes da amostra de cosméticos micelares (0,50; 1,0 e 2,0 mL), ocorreu elevada variabilidade sinal analítico, com o surgimento de múltiplos picos impossibilitando a continuidade dos experimentos.

É de suma importância apontar que, o volume da amostra está diretamente relacionado com a quantidade de espumas formadas no meio de reação (devido ao teor de surfactantes). Portanto, para quantidades mais elevadas das amostras, a geração de espumas foi intensificada e com isso, comprometeu-se a precisão das medidas de intensidade de fluorescência e a estabilidade do sinal analítico (Li *et al.*, 2015), impossibilitando assim, a aplicação do método de oxidação direta. Sendo assim, objetivando-se a resolução desta limitação para análise direta por CV AFS, optou-se pela adição de antiespumantes no meio reacional para assegurar a desestabilização efetiva das espumas, o que é essencial para determinação da concentração de mercúrio nas amostras, sem efeito de matriz. Deste modo, para evitar diluições excessivas das amostras de cosméticos micelares, o volume de 2,0 mL foi adotado para os estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- LI, S.; WANG, M.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; YANG, B. Cloud point extraction for trace inorganic arsenic speciation analysis in water samples by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 111, p. 74–79, 2015.
- MADRID, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CÁMARA, C. Reduction of interferences by hydride-forming and transition metals in continuous-flow mercury cold vapour generation using micellar media. **Spectrochimica Acta - Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 49, n. 2, p. 163–170, 1994.
- OLIVEIRA, M. J.; CUNHA, F. A. S.; CALDAS SANTOS, J. C. Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 36, n. 4, p. 740–746, 2021.
- PSA Analytical, **Millennium Merlin User Manual: PSA Customer Technical Information File**, United Kingdom, 2013.
- TALL, A.; COSTA, K. R.; OLIVEIRA, M. J.; TAPSOBA, I.; ROCHA, U.; SALES, T. O.; GOULART, M. O. F.; SANTOS, J. C. C. Photoluminescent nanoprobe based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines. **Talanta**, v. 221, p. 121545, 2021.

APÊNDICE C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

C.1 Trabalhos científicos publicados em periódicos e anais de congressos

DADOS CURRICULARES

MARIA JANAÍNA DE OLIVEIRA

Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia (IQB).
Tabuleiro do Martins, 57072900 - Maceió, AL – Brasil.

E-mail: janaoliveiraqi@gmail.com

mjo.janaina@gmail.com

Formação Acadêmica

2017 – 2022: Doutoranda em Química e Biotecnologia

Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceió, Alagoas.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2010-2012: Mestrado em Engenharia Química

Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Campina Grande, Paraíba.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2005-2009: Graduação em Química Industrial.

Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Paraíba.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Artigos publicados em periódicos

CUNHA, F. A. S.; OLIVEIRA, M. J; FLOREZ-RODRIGUEZ, P.P.; SANTOS, J.C.C.
Mercury speciation in estuarine water using dithiol-based magnetic solid-phase extraction and cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 192, p. 106412, 2022.

LIMA, EDUARDO A.; CUNHA, F. A.S.; OLIVEIRA, M. J.; LYRA, W. S.; JUNIOR, M. M.S.; SANTOS, J. C.C.; FERREIRA, S. L.C.; ARAUJO, M. C.U.; ALMEIDA, L. F. Fast automated method for the direct determination of total antimony in grape juice samples by hydride generation and atomic fluorescence spectrometric detection without external pretreatment. **Food Chemistry**, v. 368, p. 132194, 2022.

GIERTYAS, C. J.; SILVA, V. E.; OLIVEIRA, M. J.; FREIRE, E. S.; SANTOS, J. C. C.; ALMEIDA, R. M.; MENEGHETTI, M. R.; BORTOLUZZI, J. H. Atomic Absorption Spectrometry as an Alternative to Determine the Presence of Gold Nanoparticles on or in Silica Matrix. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, p. 406-412, 2022.

OLIVEIRA, M. J.; CUNHA, F. A. S.; SANTOS, J. C.C. Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 36, p. 740-746, 2021.

SOARES, E.C.; BISPO, M. D.; VASCONCELOS, V. C.; SOLETTI, J. I.; CARVALHO, S. H. V.; OLIVEIRA, M. J.; SANTOS, M. C.; SANTOS, E.F; NOGUEIRA, A. S. P.; CUNHA, F. A. S.; SANDES, R. D. D.; SANTOS, R. A. R.; NETA, M. T. S. L.; NARAIN, N.; GARCIA, C. A. B.; COSTA, S. S. L.; SANTOS, J. C. C. Oil impact on the environment and aquatic organisms on the coasts of the states of Alagoas and Sergipe, Brazil - A preliminary evaluation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 171, p. 112723, 2021.

TALL, A.; COSTA, K. R.; OLIVEIRA, M. J.; TAPSOBA, I.; ROCHA, U.; SALES, T. O.; GOULART, M. O. F.; SANTOS, J. C. C. Photoluminescent nanoprobe based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines. **Talanta**, v. 221, p. 121545, 2021.

Trabalhos publicados em anais de congressos

SANTOS, J.S.; OLIVEIRA, M.J.; COUTRO, W. K. T. C, OLIVEIRA, K.A.; SANTOS, J. C.C. Determination of thimerosal in vaccines using microfluidic devices (μ pads) as an analytical platform. *In: VI Simpósio Nordestino Virtual de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2021.

OLIVEIRA, M.J., BOTERO, W.G.; SANTOS, J.C.C. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de espécies potencialmente tóxicas em vacinas e cosméticos. *In: I Webinário de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2020.

OLIVEIRA, M. J.; CUNHA, F. A. S.; SANTOS, J. C. C. Evaluation of for direct determination of thimerosal, an organic compound of mercury, by atomic fluorescence spectrometry. *In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Joinville, Santa Catarina, 2019.

OLIVEIRA, M. J.; CUNHA, F. A. S.; SANTOS, J. C. C. Sample preparation strategies for thimerosal determination by atomic fluorescence spectrometry in vaccines. *In: V Simpósio Nordestino de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2019.

CUNHA, F.A.S.; OLIVEIRA, M.J.; SANTOS, J.C.C. Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com ditiol aplicadas à especiação de mercúrio em água estuarina por CV AFS. *In: V Simpósio Nordestino de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2019.

NOGUEIRA, A. S. P.; OLIVEIRA, M. J.; ANUNCIACAO, D. S.; SANTOS, J. C. C. Diagnóstico comportamental entre espécies de arsênio e substâncias húmicas oriunda de turfa em diferentes pH. *In: 5º Congresso Uruguayo de Química Analítica*. Montevideú, Uruguai, 2018.

FERNANDES, C. L.; NASCIMENTO, P. H. L.; LIMA, J. C. R.; OLIVEIRA, M. J.; NOGUEIRA, A. S. P. Cosméticos como tema gerador no ensino de química: refletindo sobre a toxicidade dos metais em sala de aula. *In: III Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências*, Campina Grande, Paraíba, 2018.

CUNHA, F. A. S.; OLIVEIRA, M. J.; SANTOS, J. C. C. Funcionalização de nanopartículas magnéticas de magnetita empregando 1,3,4-tiadiazol-2,5-ditioi para a concentração de espécies de mercúrio. *In: 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e o 7º CIAQA Congresso Ibero-americano de Química Analítica*, Caldas Novas, Goiás, 2018.

NOGUEIRA, A. S. P.; OLIVEIRA, M. J.; BOTERO, W. G.; SANTOS, J. C. C.; ANUNCIACAO, D. S. Avaliação da interação de diferentes espécies de arsênio com substâncias húmicas de turfa. *In: 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e o 7º CIAQA Congresso Ibero-americano de Química Analítica*, Caldas Novas, Goiás, 2018.

NOGUEIRA, A. S. P.; ANUNCIACAO, D. S.; OLIVEIRA, M. J.; BOTERO, W. G.; SANTOS, J. C. C.; FREIRE, E. S. Study of interaction between inorganic species of arsenic and humic substances around of soil. *In: IV Simpósio Nordestino de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2018.

Premiações

Prêmio Produção Discente (PPGQB)- Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids. *In: VI Simpósio Nordestino Virtual de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2021