UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

Programa de Pós-Graduação em Biociências

CAIENE DE JESUS OLIVEIRA RODRIGUES

Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de Mercúrio em vacinas

Vitória da Conquista – BA

2024

CAIENE DE JESUS OLIVEIRA RODRIGUES

Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de Mercúrio em vacinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Santos Souza
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista – BA

2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

R696

Rodrigues, Caiene de Jesus Oliveira.
Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de Mercúrio em vacinas. / Caiene de Jesus Oliveira Rodrigues. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.
94 f.: il.
Orientador: Prof. Dr. Anderson Santos Souza.
Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Mercúrio. 2. Microextração em Fase Líquida. 3. Líquidos Iônicos. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Souza, Anderson Santos. III. Título.

CDU: 543.42(043.3)

Elaborado por Marcos Aurélio Ribeiro da Silva CRB5/1858.

CAIENE DE JESUS OLIVEIRA RODRIGUES

"Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de Mercúrio em vacinas"

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 01/11/2024

Anderson S. Souza

Prof. Dr. Anderson Santos Souza (Orientador)
(Universidade Federal da Bahia)

Juliano G. Amaral

Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)

Dilaine Suellen Caires Neves

Prof.ª Dr.ª Dilaine Suellen Caires Neves (Examinadora)
(Universidade Federal da Bahia)

Dedico este trabalho ao Deus do universo! Jeová Deus

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, rendo Graças e Louvores! De fato, nada seria possível sem a Sua mão. Obrigada, por Sua presença em cada momento!

Ao meu orientador, que foi um mestre durante todo processo. Passamos por tantas incertezas, desafios e exaustões, e você sempre com muito cuidado, respeito e carinho me ensinando, orientado e corrigindo! A sua frase ficou marcada: “Caiene! A hora de errar é agora, qualquer dúvida, por menor que seja, me pergunte!” e aqui estamos. Conseguimos, Anderson! Obrigada por todo apoio, muito obrigada pela paciência comigo.

Ao meu esposo Mauricio, minha gratidão por todo apoio, incentivo, cuidado e cumplicidade em todo processo. Chorar e sorrir comigo. Hoje nós vibramos pela conquista em dose dupla, a conclusão desta etapa e a concretização da nossa cumplicidade com nosso filho(a) que está a caminho! Obrigada, meu amor!

Minha Mãe, Janete e meu Pai, Edilson, obrigada por me incentivar nos caminhos dos estudos, por se orgulhar e lutar comigo. Por sonhar com a conclusão, chorar e me acolher em tantos momentos. Como digo sempre, essa conquista é nossa. E é por vocês sempre! Os Amo muito, a minha base de vida!

Às minhas irmãs, Francielle e Caielle, vocês sempre foram a minha verdadeira torcida. Saber que posso contar com vocês para tudo faz a caminhada mais leve! Meus sobrinhos, Lara, Samuel, João, Maria e Esther que me alegram e que fizeram parte desde a matricula até a reta final. Vocês foram uma válvula de escape, com abraços, beijos, brincadeiras e sorrisos!

A minha sogra, Mª da Glória, suas orações foram tão importantes, sempre com palavras de encorajamento e esperança, obrigada por me ouvir e aconselhar. A Mirim, o seu esposo, por todo cuidado de pai, não tenho palavras para te agradecer, obrigada por tudo! Muito obrigada!

Minha cunhada Michele, seu esposo Ronaldo, uma família linda e que me apoiou e me compreendeu nas ausências em momentos familiares. Obrigada, pelo apoio e carinho!

Robson, como sou grata a Deus por sua vida! Obrigada por todo apoião, palavras de incentivo, conselhos e ensinamentos. E principalmente, por ter dito um dia: “Na

UFBA tem uma pós-graduação com o perfil que você procura!” Foi através da sua vida que conheci o Biociências. Obrigada, por me ouvir e me deixar compartilhas angustias e alegrias. Seus conselhos, levarei sempre comigo. Amo a sua vida!

Amós E Alice vocês são pesquisadores nato! Obrigada, por ter feito parte da construção deste trabalho. Por compartilhar experiencias e risadas durantes os experimentos!

Flávio uma enciclopédia ambulante! Quantas vezes me ajudou com socorros, ideias, instruções e compartilhamento de conhecimentos. As conversas e risadas aliviavam tanto! Muito obrigada.

Dila, como foi bom dividir laboratório com você. Inteligente, eficaz. Sempre com uma resposta para meus questionamentos! Você construiu este projeto comigo, por várias vezes deixou os seus ensaios experimentais para me orientar! Muito, muito obrigada!

Janeide, obrigada pela sensibilidade durante todo o processo, pelos corres entre um laboratório e outro em busca de materiais e aparelhos, por seu abraço quando me via. Obrigada, Jan!

Aos meus amigos, Claudia, Karol, Leo, colegas do Colégio Kleber Pacheco e as amigas da dança, por me apoiar e com palavras de carinho e leveza me incentivando, pelas orações e torcida fiel. Muito obrigada!

Não te mandei Eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.

Josué 1:9

RODRIGUES, Caiene de Jesus Oliveira. Desenvolvimento de método analítico baseado na microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de mercúrio em vacinas. 94 f. il. 2024. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

RESUMO

Os métodos de miniaturização têm alcançado destaque nas configurações dos métodos analíticos, com o objetivo principal diminuir o uso de reagentes nocivos lançados ao meio ambiente, além também do menor tempo de extração. Neste trabalho foi desenvolvido um método baseado na microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (USDMLLE) para a determinação de mercúrio por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis. O procedimento baseia-se na utilização da mistura do Líquido Iônico, hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio $[C_6MIM][PF_6]$, como solvente extrator, a ditizona como agente complexante e radiação ultrassônica como dispersor em uma solução aquosa contendo mercúrio. Após a turvação, a mistura é centrifugada para a separação das fases. Posteriormente, a fase enriquecida é recolhida e o teor de mercúrio é dosado por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis. O pH da solução-tampão, a concentração do complexante, o volume do líquido iônico foram as variáveis otimizadas utilizando estratégia multivariada. Os limites de detecção e quantificação, calculados sob condições otimizadas foram, respectivamente 0,031 $\mu.L^{-1}$ e 0,103 $\mu.L^{-1}$. O fator de enriquecimento obtido foi de 403 vezes. O procedimento foi aplicado à determinação de mercúrio em amostras de vacinas de difteria, tétano, coqueluche – DTP e hepatites A e B que utilizam timerosal como conservantes. O método proposto é simples, rápido, eficiente e não utiliza solventes orgânicos no processo de extração líquido-líquido.

Palavra Chave: Mercúrio, USDMLLE, Líquido iônico

RODRIGUES, Caiene de Jesus Oliveira. Development of an analytical method based on dispersive liquid-liquid microextraction for determining mercury in vaccines. 94 f. ill. 2024. Dissertation (Master's) - Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

ABSTRACT

Miniaturization methods have achieved prominence in the configurations of analytical methods, with the main objective of reducing the use of harmful reagents released into the environment, in addition to reducing extraction time. In this work, a method based on ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USDMLLE) was developed for the determination of mercury by UV-Vis molecular absorption spectrophotometry. The procedure is based on the use of a mixture of the Ionic Liquid, 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C_6MIM][PF_6], as an extracting solvent, dithizone as a complexing agent and ultrasonic radiation as a disperser in an aqueous solution containing mercury. After turbidity, the mixture is centrifuged to separate the phases. Subsequently, the enriched phase is collected and the mercury content is measured by UV-Vis molecular absorption spectrophotometry. The pH of the buffer solution, the concentration of the complexing agent, and the volume of the ionic liquid were the variables optimized using a multivariate strategy. The detection and quantification limits, calculated under optimized conditions, were 0,031 $\mu.L^{-1}$ and 0,103 $\mu.L^{-1}$, respectively. The enrichment factor obtained was 403 times. The procedure was applied to the determination of mercury in samples of diphtheria, tetanus, whooping cough – DTP and hepatitis A and B vaccines that use thimerosal as preservatives. The proposed method is simple, fast, efficient and does not use organic solvents in the liquid-liquid extraction process.

Keyword: Mercury, USDMLLE, Ionic Liquid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mercúrio elementar
Figura 2: Classificação periódica do mercúrio (Hg)
Figura 3: Figura 3: a) Cinábrio b) Corderoite c) Livingstonite
Figura 4: Ciclo do mercúrio
Figura 5: Metilmercúrio
Figura 6: Etilmercúrio
Figura 7: Representação da estrutura química do timerosal
Figura 8: Dissociação do Timerosal em tiosalicilato e etilmercúrio
Figura 9: Ilustrações das principais componentes do aparelho espectrofotômetro.
Figura 10 Representação da técnica de extração líquido-líquido
Figura 11: Representação micro extração em gota suspensa da DI-SDME e HF-SDME.
Figura 12: Representação micro extração em fase líquida com fibra oca.
Figura 13: Representação micro extração liquido líquido dispersiva DLLME.
Figura 14: Esquema da injeção da mistura de solventes na amostra.
Figura 15: Esquema da injeção da mistura de solventes na amostra.
Figura 16: Íons constituintes de Líquidos iônicos cátions à esquerda e ânions à direita.
Figura 17: Principais cátions de líquidos iônicos.
Figura 18: Frascos de vacinas adquiridas da cidade de Itambé-Ba
Figura 19: Pré-concentrado antes da leitura. À esquerda o branco, à direita amostra

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características analíticas dos métodos propostos para o mercúrio DMLLE Vórtex.

Tabela 2: : Matriz de planejamento fatorial de 2 níveis.

Tabela 3: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial

Tabela 4 Tabela 4: Matriz de planejamento fatorial de dois níveis para teste de Robustez.

LISTA DE ABREVIATURAS

LLE	Liquid-Liquid Extraction
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
UV-Vis	Ultravioleta Visível
Hg	Mercúrio
OMS	Organização Mundial da Saúde
MeHg	Metilmercúrio
EtHg	Etilmercúrio
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
DTP	Difteria, Tétano e Coqueluche
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
GACVS	Consultivo Global sobre Segurança de Vacinas
ppm	Parte Por Milhão
USP	Universidade de São Paulo
CV-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-OES	Plasma Indutivamente Acoplado Espectrometria de Emissão Óptica
CV-AFS	Espectroscopia de Fluorescência Atômica com Vapor Frio
CVG-ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Geração de Vapor Frio.
AFS	Espectrometria de Fluorescência
MS	Espectrômetro de massa
SPE	Solid Phase Extraction
LPME	Liquid Phase Microextraction
LLME	Liquid-Liquid Microextraction
SDME	Single Drop Microextraction
DI-SDME	Direct Single Drop Microextraction
HS-SDME	Headspace Single Drop Microextraction
HF-LPME	Hollow Fiber - Liquid Phase Microextraction

LI	Líquido Iônico
IL-DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Using Ionic Liquids
USAEME	Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction
USADLLME	Ultrasound Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
LI-USADLLME	Ultrasound Assisted Dispersive Emulsification Microextraction Using Ionic Liquids
USVADLLME	Ultrasound Vortex Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
VALLME	Vortex Assisted Liquid-Liquid Microextraction Emulsification
HNO_3	Ácido nítrico
HCl	Ácido Clorídrico
pH	Potencial hidrogeniônico
Fe	Ferro
Pb	Chumbo
Cu	Cobre
NaOH	Hidróxido de Sódio
UFBA	Universidade Federal da Bahia
H_2O_2	Água oxigenada
$[C_6MIM][PF_6]$	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio
Hg-Dtz	Complexo Ditizona Mercúrio
FE	Fator de Enriquecimento
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
DPR	Desvio Padrão Relativo
CV	Coeficiente de Variação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 01

2. REVISÃO DA LITERATURA 03

2.1 Mercúrio 03

2.1 Timerosal 09

2.2.1 Vacinas 09

2.3 Técnicas de Quantificação do mercúrio 11

2.3.1 Espectrofotometria na região UV-Vis 13

2.4 Etapa de Extração 15

2.4.1 Extração Líquido-Líquido LLE 17

2.4.2 Microextração 19

2.5 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva - DLLME 22

2.5.1 Fatores que influenciam na recuperação do analito 28

2.6 Líquido iônico 28

2.7 Microextração líquido-líquido assistida por ultrassom 31

3. JUSTIFICATIVA 32

4. OBJETIVOS 34

4.1 Geral 34

4.2 Específico 34

5. MATERIAIS E MÉTODOS 35

5.1 Instrumentação 35

5.2 Reagentes 35

5.3 Preparo de Soluções 36

5.3.1 Solução referência 36

5.3.2 Solução estoque ditizona 36

5.3.3 Soluções-tampão 36

5.4 Amostragem 37

5.5 Tratamento das Amostras 37

5.5.1 Digestão da amostra 37

5.5.2 Procedimento de pré-concentração 38

5.6 Planejamento experimental 38

5.6.1 Planejamento univariado 39
5.6.2 Planejamento fatorial 39
5.6.3 Matriz Box-Behnken 41
5.7 FIGURAS DE MÉRITO 41
5.7.1 Linearidade e fator de enriquecimento 42
5.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação 42
5.7.3 Precisão 43
5.7.4 Exatidão 44
5.7.5 Robustez 44
5.7.6 Interferentes 45
5.8 APLICAÇÃO 46
6. REFERÊNCIAS 47
7. ARTIGO 55
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 94

1. INTRODUÇÃO

Os metais pesados, são elementos químicos que apresentam alta densidade e são caracterizados como tóxicos ao meio ambiente e à saúde humana, mesmo em pequenas doses. Estes metais como o Arsênio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Mercúrio, Níquel, Alumínio são encontrados na natureza e nas atividades humanas, e em várias atividades indústrias (https://www.ufsm.br/laboratorios/laqia/metais-pesados-heavy-metals).

O Mercúrio, por exemplo, pode existir no ambiente em várias formas físicas e químicas, forma orgânica, inorgânica e mercúrio elementar (Hg^0), que é um líquido à temperatura ambiente. Contudo, em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), tendo em vista a tendência mundial da diminuição da exposição de seres humanos a produtos à base de derivados de mercúrio, determinou a proibição do uso deste metal pelas indústrias, exceto na produção de vacinas (DEUS, 2014; TALL *et al*., 2021).

Vacinas multidoses, faz uso do conservante timerosal, uma forma orgânica do mercúrio, em concentração segura para a saúde humana, o que o torna um produto restrito a produtores públicos, como o Instituto Butantan. As dosagens são cuidadosamente testadas e monitoradas pelos fabricantes (MORAES *et al*., 2008). Assim, o monitoramento do timerosal em vacinas e o desenvolvimento de técnicas de análise para o mercúrio e sua quantificação em diferentes matrizes tem despertado a atenção da comunidade científica (ALTO *et al*., 2021; BISINOT *et al*., 2006; TALL *et al*., 2021).

A escolha e o desenvolvimento de técnica de quantificação do mercúrio dependem de diversos fatores, como a natureza do metal (inorgânico ou orgânico), incluindo a matriz da amostra, o nível esperado de concentração de mercúrio e os recursos disponíveis (BISINOTI et al., 2006; STAUN, 2018). Isto porque a maioria das instrumentações existentes não permitem analises de amostras em sua forma original, fazendo necessário o preparo de amostras (MENG e ANDERSON, 2012).

Os procedimentos de preparo da amostra, incluem várias etapas: solubilização, extração, isolamento e/ou pré-concentração por meio de extração de compostos de interesse da matriz (PICÓ, 2012). As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível, pois, ao final da técnica é obtido uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico. Esta é uma etapa delicada, lenta e requer muitos cuidados, pois, apresenta possibilidade de contaminação e a perda das espécies de interesse durante o manuseio da amostra, por isso, esta etapa torna-se desafiadora (FERREIRA *et al.*, 2015).

Uma das técnicas mais utilizadas para extração é a Extração Líquido-Líquido – LLE, sigla da expressão em inglês Liquid-Liquid Extraction, uma operação unitária que consiste na distribuição ou partição de solutos entre duas fases líquidas nas quais é diferentemente solúvel. Basicamente esta extração tem a participação de três componentes: analito, que é a espécie desejada no processo; solução, onde o analito está misturado; e solvente, liquido adicionado à mistura, a fim de separar o soluto da solução, também chamado de extrator. Assim, ao adicionar o solvente à solução, o analito é extraído e concentrado na fase extratora (MARTINS *et al.*, 2012).

Apesar de sua eficiência na remoção de interferentes e na pré-concentração de analitos, o processo de extração líquido-líquido é responsável pela geração de grandes volumes de resíduos de solventes orgânicos, o que causa grandes impactos ambientais e também envolve repetições do processor que estão associadas com as perdas de analito e ocorrência de contaminação. Para minimizar os efeitos de contaminação, perda do analito e até diminuir os impactos ambientais, o desenvolvimento de procedimentos miniaturizados e que usem solventes verdes tem sido proposto. (LEITE, 2016).

O formato miniaturizado de LLE, a microextração, cobre um conjunto de procedimentos em microescala e minimizados por solvente, pois, reduz significativamente a proporção entre o volume do solvente e o volume da fase aquosa. Está técnica, demonstrou ser confiável por estarem mais relacionadas à alguns princípios da Química Verde com uso de volumes de solventes na faixa de

µL e pela miniaturização reduz os erros cometidos durante o preparo da amostra (MALTEZ, 2007; SULIMAN *et al.*, 2021).

Diante disso, este trabalho se preocupou em desenvolver um novo método de quantificação de mercúrio, que usou como princípio a técnica analítica, microextração dispersiva líquido-líquido, com expressão em inglês, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction – DLLME, que é baseado em um sistema de solvente de três componentes a amostra, o solvente dispersor e extrator, com extração líquido-líquido homogênea e extração de ponto de nuvem.

Nesta técnica houve substituição dos solventes orgânicos extrator e dispersor, por liquido iônicos e força mecânica respectivamente, proporcionando ao método baixo impacto ambiental e ainda contribuir com uma nova forma de controle do teor de mercúrio presente nas vacinas (BISINOT *et al.*, 2006). Para a análise do mercúrio foi usado o aparelho comumente encontrado nos laboratórios de química analítica o espectrofotômetro de absorção molecular, que apresenta rapidez, baixo custo e de fácil manuseio em seu sistema, comparado a outros aparelhos usados na quantificação do mercúrio. Apesar de muitos procedimentos de microextração por solvente para determinação de mercúrio terem sido relatados, o número de procedimentos associados à detecção de UV-Vis também é bastante limitado. Desse modo, com o emprego desse método é possível reduzir erros resultantes dos procedimentos analíticos com muitas etapas, diminuir impactos ao meio ambiente e riscos ao operador. A técnica por sua vez, será aplicado em amostra de vacinas de Caxumba, Influenza, Hepatite B, Difteria + Coqueluche e Febre amarela, que utilizam timerosal como conservantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mercúrio

O mercúrio é um metal encontrado na forma líquida (Figura 1) a condições normais de temperatura e pressão. De cor prateada, dúctil, denso e volátil, este

elemento químico de número atômico 80 e símbolo Hg, é representado no grupo IIB do sistema de classificação periódica (Figura 2) (COSTA *et al.*, 2014; FRANCISCO, 2022).

Figura 1: Mercúrio elementar.

Fonte: COLASSO, 2020.

Uma característica particular do Hg é apresentar subníveis eletrônicos preenchidos em sua configuração eletrônica [Xe] $4f^{14}5d^{10}6s^{2}$ o que torna este elemento ligeiramente inerte, ou seja, em ligações químicas não doa seus elétrons com tanta facilidade. Entretanto, este elemento pode formar ligações covalentes estáveis com átomos de carbono, existindo assim, uma grande variedade de substâncias orgânicas deste metal, chamado de organometálico (FRANCISCO, 2021).

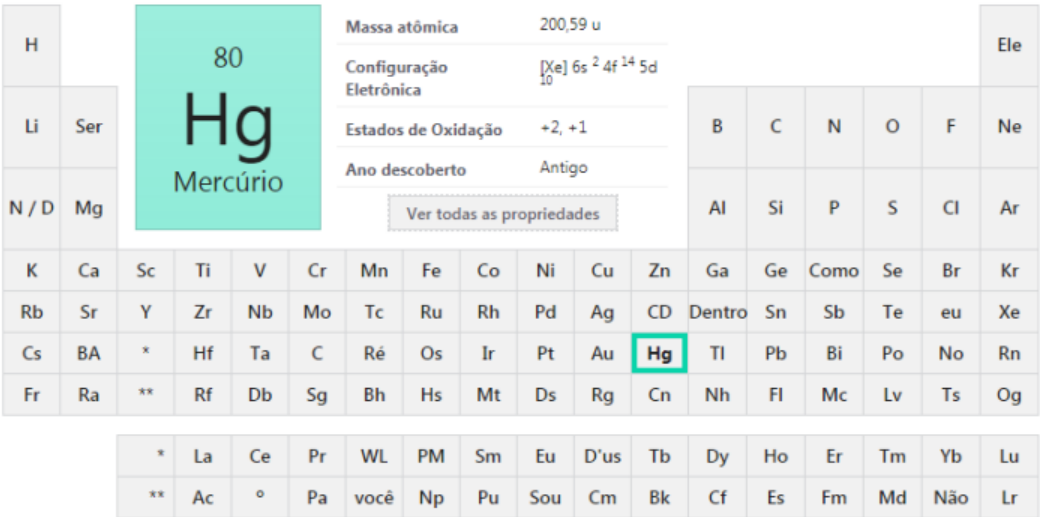

Figura 2: Classificação periódica do mercúrio (Hg).

Fonte: FRANCISCO, 2021.

Quando aquecido, mesmo a temperaturas relativamente baixas, o mercúrio passa para o estado vapor, predominantemente na forma monoatômica (Hg°, elementar), o que facilita sua adesão preferencial a outros metais, como o ouro, prata e o chumbo, conhecidos como amálgamas. Essa liga metálica, foi muito utilizada em procedimentos odontológicos para tratamento de cárie, por suas características de manejo e baixos custos (CARMONA *et al*., 2013; FELIX, 2022; OLIVEIRA *et al*., 2012).

O mercúrio (Hg) é um elemento que ocorre naturalmente na crosta terrestre e pode ser encontrado em minerais como: cinábrio (Figura 3a), nome usado para o sulfeto de mercúrio (II); corderoite (Figura 3b) um mineral de cloreto de sulfeto de mercúrio extremamente raro, e livingstonite (Figura 3c) um mineral sulfossal de antimônio de mercúrio (CAÑARI-CHUMPITAZ, 2019). Bem como, a desgaseificação natural da crosta terrestre e as atividades antropogênicas como a mineração de carvão e ouro, e a combustão de carvão e combustíveis. Além das aplicações do mercúrio em diversos instrumentos como barômetros, termômetros, esfigmômetros, interruptores, lâmpadas fluorescentes, eletrodos, amálgamas dentárias e, em algum momento da medicina, com compostos antissépticos como o timerosal, além da mineração/fundição de metais não ferrosos, a incineração de resíduos, a produção de eletrônica e a indústria de cloro e álcalis mostram a grande versatilidade desse elemento (CAÑARI-CHUMPITAZ, 2019; MARIANO, 2022; WANG *et al*., 2024).

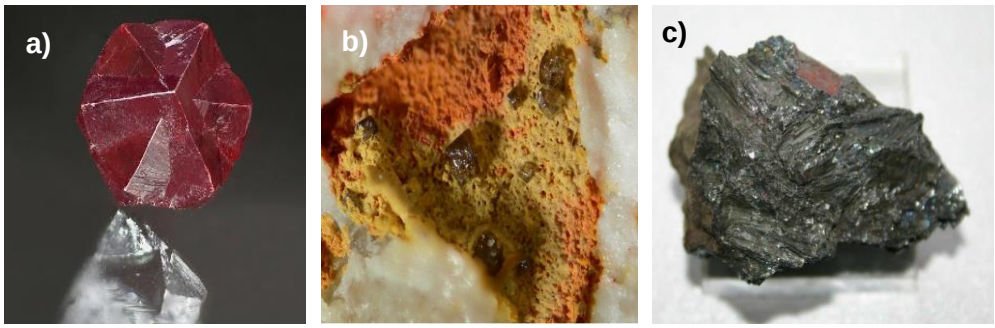

Figura 3: a) Cinábrio b) Corderoite c) Livingstonite.

Fonte: RALPH e YEE, 2024.

A combustão do carvão libera vestígios de Hg na atmosfera (Figura 4), tornando-o móvel e depositando-o nas águas superficiais que é adsorvido em partículas suspensas, que são importantes para o transporte e precipitação de Hg nos solos superficiais e nos sedimentos. Desta forma o mercúrio e seus compostos podem sem encontrados na atmosfera, na água, no solo e nos alimentos o que torna significativa a disposição deste metal no ambiente (VAN ROOYEN *et. al.*, 2023).

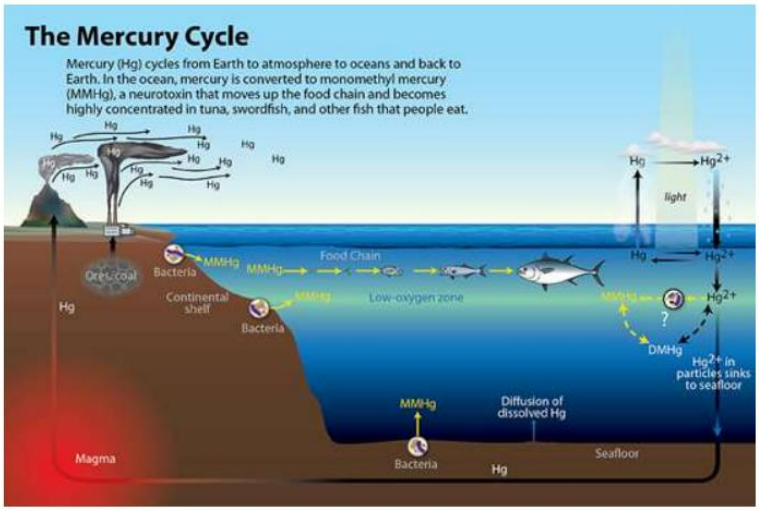

Figura 4: Ciclo do mercúrio

Fonte: SECA, 2016.

Assim, quando distribuído no meio ambiente, o mercúrio sofre complexas alterações químicas e físicas (BOISCHIO, 2015), onde pode assumir 3 formas: elementar, que é a forma metálica; o inorgânico e o orgânico (UJAZ, 2023). LAUDATI *et al.*, (2019), define as formas do Hg como:

> 1) **Mercúrio metálico**: como descrito, é um metal prateado líquido (Figura 2) e volátil, capaz de produzir vapores inodoros e incolores à temperatura ambiente. É a forma mais pura do mercúrio, também conhecido como mercúrio elementar.
>
> 2) **Mercúrio inorgânico**: tipo de mercúrio presente nos sais obtidos através de sua combinação com outros elementos, como cloro, oxigênio e enxofre. Os sais mais comuns são o sulfeto de mercúrio (II), cloreto de mercúrio (I e II) e acetato de mercúrio (II).
>
> 3) **Mercúrio orgânico**: presente em compostos resultantes da combinação entre mercúrio e diferentes cadeias carbônicas, os chamados compostos organomercuriais, como metil, etil e dimetil mercúrio, que são de alta toxicidade para o homem.

A disposição deste elemento no meio ambiente são motivo de grandes preocupações. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o mercúrio faz parte dos dez poluentes de particular preocupação para a saúde pública, um metal pesado com capacidade de bioacumulação e neurovirulência, o que possui alto risco para o ambiente circundante (AJSUVAKOVA *et al*, 2020; IJAZ *et al*., 2021; Lin *et al*., 2022).

De acordo com Felix (2022), a 20 °C uma atmosfera saturada por Hg^o contém cerca de 13 mg/m^3, quantidade considerada altamente tóxica, visto que, um estudo - Diagnóstico Preliminar sobre o Mercúrio no Brasil - a exposição aos vapores de Hg^o a 1,2 mg por algumas horas pode causar bronquite química e em seguida fibrose, além de dispneia, distúrbios visuais, falta de coordenação motora, alterações neuromusculares, dores de cabeça, insônia, perdas de memória (BERNHOFT, 2012). Em períodos mais longos, o mercúrio pode causar problemas ao sistema nervoso central e à tireoide, como doenças neurológicas, neurodegenerativas, cardiovasculares, podendo ser fatal (ANVISA, 2019; UJAZ, 2023; YANG *et al*., 2011).

Na sua versão natural, o metilmercúrio – MeHg, de estrutura molecular Figura 5, é ressaltado como a variante mais nociva, em grande parte originado biologicamente por bactérias como uma forma natural de desintoxicação. Nos animais mamíferos, o metil-Hg se acumula principalmente no sistema nervoso central devido à sua ligação com aminoácidos presentes em grande quantidade nesse sistema, resultando em problemas neurais e, por fim, em paralisia e óbito (SANTOS *et al*., 2016; SHIWEN, 2024).

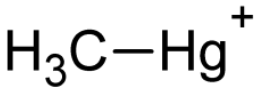

Figura 5: Metilmercúrio

A sua toxicidade foi descoberta devido ao ocorrido na Bacia de Minamata localizado no Japão, conhecido como Mal de Minamata, onde, durante 20 anos uma empresa despejou lixo industrial contendo mercúrio à Bacia, envenenando peixes, moluscos e aves marinhas. Anos depois, habitante, aves e animais domésticos da região apresentavam sintomas em comum, como: convulsões

severas, surtos de psicose, perda de consciência, febre muito alta e, posteriormente, morte. Os pacientes tinham um fato em comum o grande consumo de pescados daquela região ao longo dos anos (BOISCHIO, 2015; CAMPOS, 2022; PIRES, 2018; SHIWEN, 2024; YANG *et al.*, 2022).

No Brasil, a intoxicação por MetHg, tem sido relatada no território amazônico, aos consumidores de pescados em regiões próxima a atividades de garimpo (RAMOS *et al.*, 2020) devido a capacidade do metil mercúrio acumula-se através de corpos superficiais, bem como sua entrada antrópica no ambiente e a biota através da cadeia alimentar (BRADLEY *et al.*, 2017; RAHMAN e SINGH, 2019), fazendo com que o consumo de peixe seja a principal fonte de exposição deste composto, visto que, a dieta seja uma rota significativa de exposição humana ao metilmercúrio (BISINOTI, *et al.*, 2004; LLOP *et al.*, 2012; ZIMMERMANN *et al.*, 2013).

O **etilmercúrio** – EtHg (Figura 6), um outro composto organomercurial, que apresenta características químicas parecidas ao metilmercúrio, é a forma mais amplamente utilizada deste mercúrio orgânico. É um composto que foi muito usado como conservante e antisséptico em muitos insumos farmacológicos e vacinas. sendo a principal fonte de exposição humana ao EtHg é por vacinas (TALL *et al.*, 2021).

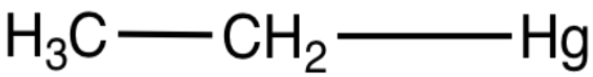

Figura 6: etilmercúrio

O uso deste organomercurial, também chamado de timerosal, em vacinas se deve ao fato de apresentar propriedades antisséptica. Em concentrações de 0,001% a 0,01% o timerosal demonstrou ser eficaz na eliminação de um amplo espectro de patógenos passando a ser amplamente utilizado, também, como conservante para matar bactérias e prevenir contaminação em pomadas antissépticas, colírios e sprays nasais (ANVISA, 2015; BRUNSON, 2020).

Contudo, em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), tendo em vista a tendência mundial da diminuição da exposição de seres humanos

a produtos à base de derivados de mercúrio, determinou a proibição do uso de timerosal pelas indústrias, exceto na produção de vacinas (DEUS, 2014; TALL *et al.*, 2021). Desta forma, o Sistema Único de Saúde (SUS) e a saúde suplementar brasileira utilizam o Timerosal restrito à produção de vacinas, o que o torna um produto de base tecnológica restrita a produtores públicos, especificamente um produtor, o Instituto Butantan, que é o importador autorizado pela ANVISA a manter estoques do produto no Brasil (DEUS, 2014).

2.2 Timerosal

2.2.1 Vacinas

As formulações das vacinas podem ser divididas em dois grupos: doses individuais e outra forma combinada também conhecidas por multidose, como a tríplice bacteriana (difteria, tétano, coqueluche), tríplice viral (sarampo, caxumba, rubéola), pentavalente (DTP, hepatite B e *Haemophillus influenzae*). As vacinas multidose apresentam vantagens em termo de custo e menor volume para armazenagem, sendo os mais frequentes em saúde pública (HOMMA, 2011; SILVA, SIRQUEIRA, SIRQUEIRA 2022).

Durante a administração de vacinas multidose diversas vezes agulhas são inseridas num mesmo frasco para retirada da dose de vacina a ser aplicada, o que expõe o conteúdo ao crescimento de fungos e bactérias. A essas vacinas os laboratórios farmacêuticos utilizam o antisséptico timerosal para impedir o risco de contaminação durante a abertura e manipulação (BAXTER, 2007; CUNHA *et al.*, 2020; STELLA, 2016).

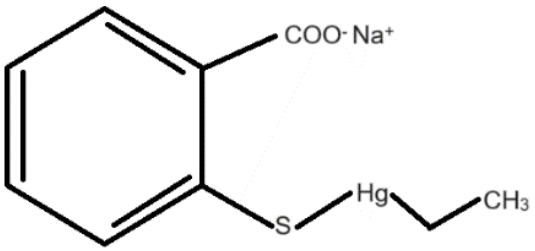

Figura 7: Representação da estrutura química do timerosal

Da massa total deste composto, 49,6% do seu peso correspondente ao mercúrio. Nas vacinas, as proporções de timerosal variam com o tipo de vacina e de fabricante entre concentração 0,003 a 0,01% (m/v). A exemplo disso, uma vacina contendo o conservante a 0,01%, um equivalente a 50 microgramas de timerosal em uma dose de 0,5 ml, contém aproximadamente 25 microgramas de mercúrio. As vacinas contra hepatite B, a tripla, DTP (difteria, tétano e coqueluche) são alguns exemplos em que a concentração de timerosal é de cerca de 50 µg por dose de 0,5 ml ($C_{timerosal}$ = 100 $mg.L^{-1}$). No Brasil as vacinas BCG (Tuberculose), hepatite B e influenza (gripe) também contém timerosal (CUNHA *et al*., 2020; DÓREA *et al*., 2013; LIMA, 2012; TALL *et al*.; 2021). Consultivo Global sobre Segurança de Vacinas - GACVS e a Organização Mundial de Saúde – OMS endossam por unanimidade o uso do timerosal como conservante em vacinas (RODRIGUEZ, 2010), com um limite de timerosal de ≤ 200 ppm (ANVISA, 2019; LIMA, 2012).

As estimativas iniciais de risco para o etilmercúrio foram estabelecidas com base em estudos de toxicidade oral de metilmercúrio devido à falta de evidências sobre o comportamento do timerosal no corpo de mamíferos. No entanto, os novos dados apontam que o metabolismo e a cinética de disposição dos tecidos diferem consideravelmente entre etilmercúrio e metilmercúrio. A meia-vida do etilmercúrio é curta (menos de uma semana) em comparação com o metilmercúrio (1,5 meses), tornando a exposição ao etilmercúrio no sangue comparativamente breve. Além disso, o etilmercúrio é excretado ativamente pelo intestino, ao contrário do metil mercúrio que se acumula no corpo (JAZ, 2023); (FRANCO *et al*., 2023).

Em 2014, uma pesquisadora da Universidade de São Paulo – USP, após a administração do timerosal em camundongos, observou que “o etilmercúrio converte-se rapidamente em mercúrio inorgânico”. Além de que estudos experimentais com o timerosal em experimentos *in vivo*, indicam sua meia-vida mais curta em comparação com metilmercúrio, o que explica sua menor potência neurotóxica. A degradação do timerosal no organismo produz etilmercúrio e ácido tiosalicílico conforme a equação de reação representada na Figura 8 (LLOP *et al*., 2012; STELLA, 2016; ZIMMERMANN *et al*., 2013).

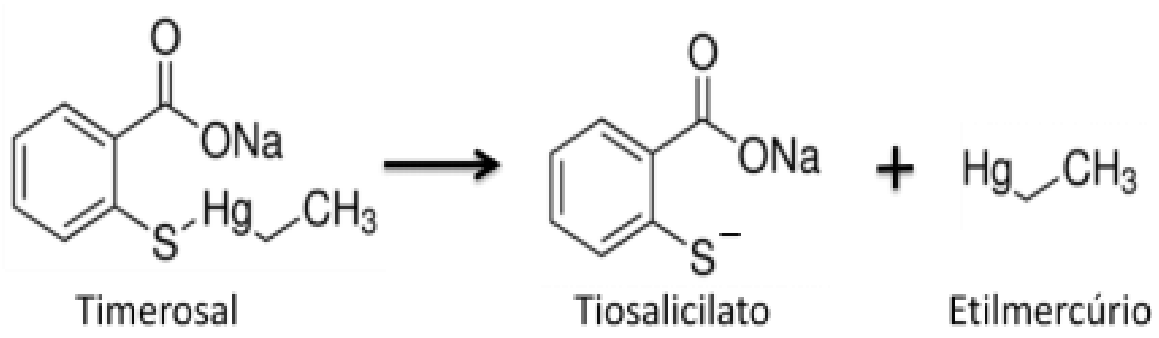

Figura 8: Dissociação do Timerosal em tiosalicilato e etilmercúrio.

As vacinas são cuidadosamente testadas e monitoradas pelos fabricantes e sistemas de saúde nos países onde são usadas (MORAES *et al.*, 2008). Portanto, a concentração de timerosal nas vacinas deve ser restrita a limites seguros para minimizar os efeitos negativos em humanos. O monitoramento rotineiro de vacinas, relacionado à degradação do timerosal, requer métodos analíticos de fácil uso e alto rendimento, que sejam sensíveis o suficiente para determinar o mercúrio total nessas amostras. Além disso, é altamente desejável que os métodos desenvolvidos cumpram os princípios da química analítica verde (FRANCO *et al.*, 2023). Assim, o monitoramento do timerosal em vacinas e devido aos aspectos relacionados à toxicidade do mercúrio, o desenvolvimento de técnicas de análise para este metal e sua quantificação em diferentes matrizes tem despertado a atenção da comunidade científica (ALTO *et al.*, 2021; BISINOT *et al.*, 2006; TALL *et al.*, 2021).

2.3 Técnicas de Quantificação do mercúrio

A quantificação do mercúrio é um tema de suma importância, dada a toxicidade desse metal pesado e seu impacto ambiental e na saúde pública. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas ao longo dos anos para quantificar com precisão os níveis de mercúrio em diferentes matrizes, como água, solo, ar e tecidos biológicos. A escolha da técnica de quantificação do mercúrio depende de diversos fatores, a natureza do metal (inorgânico ou orgânico), incluindo a matriz da amostra, o nível esperado de concentração de mercúrio e os recursos disponíveis (BISINOTI *et al.*, 2006; STAUN, 2018).

Na análise química, são empregadas técnicas de separação acopladas a técnicas de detecção de alta sensibilidade. A etapa de determinação do mercúrio é relativamente simples e tem sido frequentemente realizada utilizando a técnica de geração de vapor acoplada às técnicas espectrométricas, que são destaques na quantificação deste metal. Os métodos espectroscópicos comumente utilizados na análise do mercúrio são (FERREIRA *et al.,* 2015):

- Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio (CV-AAS),
- Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS),
- Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS),
- Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS),
- Plasma Indutivamente Acoplado Espectrometria de Emissão Óptica (ICP-OES),
- Espectroscopia de Fluorescência Atômica com Vapor Frio (CV-AFS),
- Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Geração de Vapor Frio (CVG-ICP-MS).
- Espectrometria de Fluorescência (AFS) e
- Espectrofotometria no UV-Vis (ALTUNAY, 2018; AUGELLI *et al*., 2005; LIMA e DOMINGOS, 2013; SCHLATHAUER *et al.,* 2019; SOARES *et al*., 2015).

Em decorrência da instabilidade do mercúrio em sua forma elementar, é possível analisá-lo sem a necessidade de chama, através da técnica conhecida como Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio. Nesse método, os íons do metal são inicialmente convertidos para sua forma elementar e transportados por um gás até o ponto de análise óptica, onde os átomos interagem com a radiação. Uma outra configuração do CV-AAS é a técnica de espectrofotometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS) que é baseada na identificação da emissão de fluorescência produzida pelo mercúrio. Os átomos de mercúrio são excitados a partir do seu estado fundamental para o estado excitado quando expostos a uma radiação de 253,7 nm de comprimento de onda. O mercúrio é especialmente adequado para este tipo de fluorescência devido à sua capacidade

de absorver e emitir na mesma faixa de comprimento de onda. Contudo, estas técnicas podem sofre interferências dos gases utilizados, além de que detectam o mercúrio apenas na sua forma elementar Hg^0 (MARTINIATO *et al*., 2008; MICARONI *et al*., 2000).

O método colorimétrico também foi relatado por Barbosa, (2001) como uma técnica bastante convencional na década de 50 e 60. Nesse método é comum o uso da ditizona como agente colorimétrico, que reage com o mercúrio para formar um complexo colorido que absorve na região do visível (490 nm). Apesar da sua simplicidade, baixo custo e rapidez, este método sofre interferência de diversos elementos, exigindo várias etapas de separação (BAÊTA, 2004).

Dentre os métodos espectroscópicos, apenas a espectrofotometria no UV-Vis e Espectrômetro de massa – MS possibilitam a determinação tanto de analitos orgânicos quanto inorgânicos. As demais são empregadas apenas para determinar analitos inorgânicos, dentre os quais se destacam as espécies metálicas (SOUSA *et al*., 2015; TRACEY e KOIDE, 2014).

Antes da analise em espectrofotômetro, é necessário o tratamento da amostra, que envolvem 80% do tempo total da quantificação e é tradicionalmente descrita como o gargalo na análise, por ser delicada e importante na extração do analito (MENG e ANDERSON, 2012; INAUDI *et al*., 2022). As abordagens convencionais de preparação de amostras é a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (Solid Phase Extraction – SPE) (PICÓ, 2012).

2.3.1 Espectrofotometria na região UV-Vis

Os espectrofotômetros são aparelhos que mede a intensidade da luz após passar por uma amostra. A medida ocorre pela razão entre as potências de dois feixes. São reconhecidos pelas vantagens relacionadas fácil manuseio, com respostas rápidas, interpretação simples e confiáveis. Além de ser robusto e custo operacional relativamente baixo (ALVES et al., 2010).

A maioria dos espectrofotômetros cobre a região do espectro eletromagnético UV/visível e, ocasionalmente, a região do infravermelho próximo, aproximadamente de 190 nm a 800 nm. O instrumento espectroscópico consiste em componentes básicos para uso nas regiões do UV/visível e IV como: Uma fonte estável de energia radiante; Um seletor de comprimento de onda que isola uma região limitada do espectro para a medida; Um ou mais recipientes para a amostra conhecida por cubeta; Um detector de radiação, o qual converte a energia radiante para um sinal elétrico mensurável; e Uma unidade de processamento e de leitura do sinal, geralmente constituída por um circuito eletrônico e, nos instrumentos modernos, por um computador, conforme a ilustração da figura 9 (SKOOG, 2006).

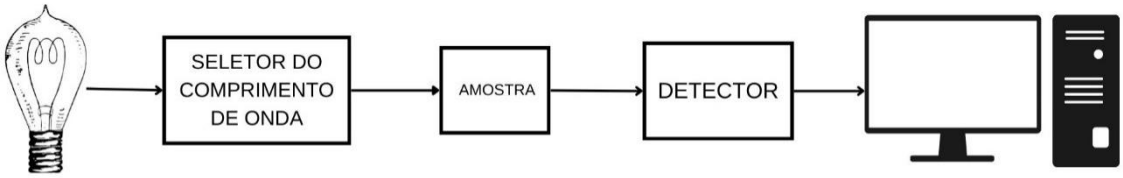

Figura 9:Ilustrações das principais componentes do aparelho espectrofotômetro.

A técnica baseia-se na absorção de radiações por moléculas e íons presentes em uma substância colorida que absorve seletivamente um comprimento de onda da região visível do espectro eletromagnético. Um feixe de radiação monocromático com potência P_0 passa através de uma cubeta de vidro ou quartzo, com um caminho óptico de b cm, contendo um liquido onde parte da radiação é absorvida pela solução, sofrendo uma atenuação, denominada como P ou absorbância A. A relação entre P e P_0 fornece os valores de transmitância, ou porcentagem de radiação absorvida. Essa relação é conhecida como Lei de Lambert-Beer e é baseada na medida da transmitância $T = P/P_0$, a qual mostra que adições sucessivas de moléculas de igual poder de absorção situadas no percurso de um feixe de radiação monocromática absorvem iguais frações de energia radiante que os atravessa. A concentração c de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorbância, onde e representa a absortividade molar (GOMES et al., 2008).

Para análises em espectrofotômetros é necessário recorrer a etapas preliminares para separação e concentração dos elementos desejados, com consequente aumento de sensibilidade. São empregados procedimentos de preparo da amostra, os quais incluem várias etapas: coleta, armazenagem, solubilização, extração, pré-concentração, isolamento dos compostos de interesse e análise qualitativa e quantitativa (CARASEK e SCHARF, 2002).

Desta forma, muitas das inovações referentes à espectrofotometria consistem em estratégias para aumento de sensibilidade, visando ampliação da faixa de aplicação da técnica e permitindo, em alguns casos, que medidas em concentrações da ordem de $nmolL^{-1}$ sejam efetuadas (ROCHA, TEXEIRA, 2006). O controle e a qualidade do processo de preparação de amostra são fundamentais para a certificação e validação de um método. O desempenho de procedimentos de análise elementar pode ser afetado pela etapa de preparo de amostra, que frequentemente é a etapa que demanda mais atenção do analista (EMBRAPA).

2.4 Etapa de Extração

Em um procedimento analítico, a primeira etapa consiste no tratamento e preparação da amostra para a fase de separação dos componentes, durante a qual a amostra é transformada de sua forma original para uma forma mais conveniente e/ou adequada para a análise. É uma etapa essencial nos procedimentos de análise e desempenha um papel crucial na extração dos analitos alvo e na remoção de interferências da amostra, especialmente na análise de traços e de matrizes complexa (DULSKI, 2020).

A eficiência de um método analítico é determinada, pela qualidade de suas etapas, com seus erros experimentais. Ainda não existe um método ou técnica universal para o preparo de amostra, visto que todas as opções usuais apresentam vantagens e desvantagens. Contudo, um protocolo de preparação de amostra deve atender aos seguintes requisitos (CHEN *et al.*, 2021):

(1) alta eficiência de extração para analitos alvo com poucas etapas;

(2) baixo custo e rápido;

(3) facilmente acoplado com instrumento analítico;

(4) química verde com baixo uso de solvente, baixa toxicidade e ecologicamente correto.

Logo, a escolha da forma mais adequada será feita com a comparação entre as vantagens e as desvantagens no preparo da amostra, levando em consideração o maior número de vantagens que tem. As etapas para o preparo de uma amostra são, comumente: armazenagem, solubilização, extração, pré-concentração, isolamento dos compostos de interesse (DULSKI, 2020).

As peculiaridades dos analitos e sua faixa de concentração é um fator importante no preparo da amostra, pois, elementos em concentrações muito baixas não são facilmente detectados por técnicas espectrométricas, por exemplo. Desta forma, o método de pré-tratamento da amostra é usado para enriquecimento do analito. A aplicação das etapas de extração e pré-concentração dos analitos, aumentam a sensibilidade, seletividade e precisão na hora da detecção do elemento e ainda reduz interferências decorrentes da matriz da amostra e de possíveis contaminantes (LEITE, 2016; ORLANDO *et al.*, 2017).

As etapas de extração e pré concentração dos analitos são consideradas as etapas mais vulneráveis e determinante de todo o procedimento analítico, apresentarem a possibilidade de contaminação e a perda das espécies de interesse durante o manuseio da amostra (SILVA *et al.*, 2023). Apresentam características que devem ser levadas em consideração durante a escolha do método, como:

i) ser simples;

ii) ser rápida;

iii) ter custo baixo;

iv) fornecer extratos relativamente livres de interferentes;

v) ter recuperações altas, com boa exatidão e precisão, para os analitos de interesse.

Técnicas clássicas de extração de amostras, como Lixiviação ácida e separação em coluna de troca iônica, para determinar o mercúrio orgânico (MeHg)

em tecidos biológicos, extração com HNO_3 (30%) e ultrassom, que permite extrair o mercúrio de sedimentos marinhos sem dissolver completamente a amostra, têm sido usada para extração de mercúrio. Porém, é a extração líquido-líquido que é amplamente aplicada como uma ferramenta para a preparação de amostras antes da análise. É uma operação básica de separação de compostos com diferentes características de solubilidade face a solventes orgânicos e aquosos imiscíveis entre si (HEREIJGERS *et al.*, 2013; PENG *et al.,* 2020).

2.4.1 Extração Líquido-Líquido LLE

A extração por solvente apresenta interesse maior em processos de separação relacionadas a analise inorgânica e na separação de metais. Os métodos de extração são geralmente escolhidos em preferência aos métodos de troca iônica para separação de metais devido a rapidez o grande volume de solvente no qual os constituintes de interesse podem ser obtidos e algumas vez a não necessidade de agentes mascarantes na solução (SALES, 2019).

A extração líquido-líquido (LLE) baseia-se na Lei de Distribuição em que acontece a partição do analito entre duas fases líquidas imiscíveis entre si. Basicamente esta extração tem a participação de três componentes: analito, que é a espécie desejada no processo; solução, onde o analito está misturado; e solvente, liquido adicionado à mistura, a fim de separar o soluto da solução, também chamado de extrator. Assim, ao adicionar o solvente à solução, o analito é extraído e concentrado na fase extratora (Figura 10) (MARTINS *et al.*, 2012).

A eficiência da extração depende da afinidade do analito pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. As fases devem entrar em contato de forma mais eficiente possível, para que possa haver a extração de todo ou da maior parte do componente a ser extraído e posteriormente as fases devem ser fisicamente separadas para detecção adequada do componente a ser extraído (CHEN *et al.*, 2021).

A escolha do solvente extrator deve ser avaliada de acordo com as propriedades das espécies puras como: ponto de ebulição, ponto crítico, densidade, volatilidade, ponto de fusão e pressão de vapor, assim como também devem ser comparadas propriedades de interação entre os compostos como difusividade e toxicidade. Além dos padrões, de estabilidade, viscosidade, volatilidade, seletividade, coeficiente de distribuição, miscibilidade em água, constante dielétrica, toxicidade, capacidade corrosiva e custo. Além disso, com as novas regulamentações ambientais, a não toxicidade do solvente deve ser rigorosamente considerada (LEITE, 2016; LOPES, 2012; MACHADO, 2007).

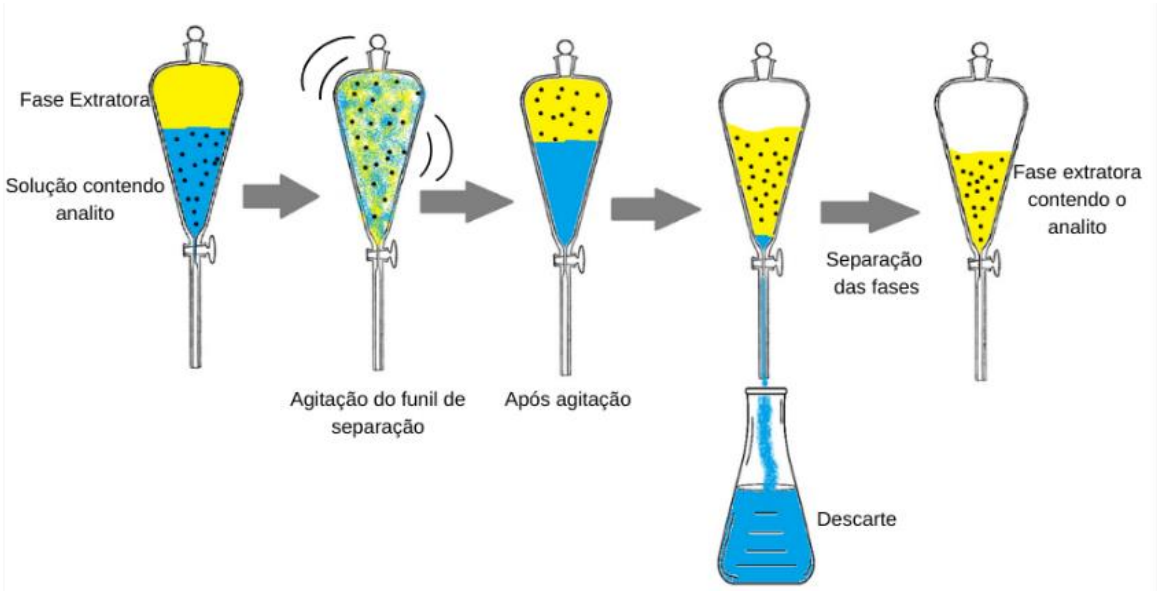

Figura 10: Representação da técnica de extração líquido-líquido.

Uma das vantagens da ELL em relação ao solvente extrator é o uso de uma variedade de solventes puros que apresentam uma ampla faixa de solubilidade e alta seletividade para alguns analitos que estão disponíveis comercialmente. Apesar da alta reprodutibilidade da técnica, a mesma apresenta tendência à formação de emulsão, o que demanda tempo e trabalho laboratorial intenso; tem baixo potencial de automação; as impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando na repetição do processo e uso de grandes volumes de solventes de alta pureza, o que a torna custosa e tóxica com a produção de perigosos resíduos laboratoriais e ainda imprópria para analises em nível de traços (QUEIROZ, 2001).

A utilização de solventes orgânicos em procedimentos analíticos é uma questão que tem sido alvo de preocupação constante, pois consome uma grande quantidade de solventes orgânicos, que geralmente são relativamente voláteis, combustíveis, tóxicos para a saúde humana, prejudiciais ao meio ambiente e caros. Esforços consideráveis têm sido dedicados à redução do uso de solventes orgânicos e à superação destas desvantagens. As tendências atuais nos métodos de preparação de amostras, estão voltadas para métodos que sejam rápidos e econômicos, eficientes e ambientalmente corretos, considerando o atual enfoque na química verde (MENG e ANDERSON, 2012).

> No início da década de 90, uma nova tendência na maneira como a questão dos resíduos químicos deve ser tratada começou a tomar forma. Esta nova visão do problema, com a proposição de novas e desafiadoras soluções, considera que, fundamentalmente, é preciso buscar uma alternativa que evite ou minimize a produção de resíduos, em detrimento da preocupação exclusiva com o tratamento do resíduo no fim da linha de produção ("end of pipe"). Este novo direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente vem sendo chamado de "green chemistry", ou química verde, química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química autossustentável (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Para isso um método não convencional que está ganhando destaque na extração ou preparação de amostras são os métodos baseados em microextração. Quanto aos procedimentos de extração, a técnica de microextração em fase líquida (Liquid Phase Microextraction – LPME) tem se destacado, devido à sua alta seletividade e especificidade na extração, à geração de baixos volumes de resíduos orgânicos e à capacidade de utilização de solventes com pouco impacto ambiental (SULIMAN *et al.*, 2020).

2.4.2 Microextração

A microextração é formato miniaturizado de ELL que cobre um conjunto de procedimentos em microescala e minimizados por solvente, pois, reduz significativamente a proporção entre o volume do solvente e o volume da fase

aquosa. Está técnica, demonstrou ser confiável por estarem mais relacionadas à Química Verde e por proporcionarem ao analista maior grau de automação é simples de usar, reprodutível, além de geralmente ser um procedimento rápido e barato, uso de volumes de solventes na faixa de µL e caracterização pela acessibilidade e dependência de materiais amplamente disponíveis e pela miniaturização reduz os erros cometidos durante o preparo da amostra (MALTEZ, 2007; SULIMAN *et al*., 2021).

Neste contexto, diferentes configurações nos métodos de operação das técnicas microextração líquido-líquido (Liquid-Liquid Microextraction – LLME) têm surgido de acordo com a forma que a fase líquida extratora se encontra, que podem ser divididas em três grandes categorias: microextração em gota suspensa (SDME), microextração em fase liquida com fibra oca (HF-LPME) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (PINTO e PREDOSO, 2015):

A **microextração de gota única** (Single Drop Microextraction –SDME) apresenta configuração com um tubo capilar de sílica fundida de 100 µm de diâmetro com a extremidade recoberta por um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. Quanto maior a afinidade do analito pela fase extratora em relação à matriz, maior será a quantidade extraída. Essa extração pode ser de dois tipos: imersão direta (DI-SDME) e imersão indireta ou headspace (HS-SDME). Na DI-SDME a fibra é mergulhada diretamente na solução da amostra com analito não volátil, que é submetida à agitação (Figura 11). Caso o analito seja volátil a extração é indireta, pois a fibra não entra em contato direto com a solução. A amostra é aquecida e os componentes voláteis são extraídos para a fibra pelo processo de sorção. Contudo, a técnica apresenta baixos valores de recuperação (PINTO e PEDROSO., 2015).

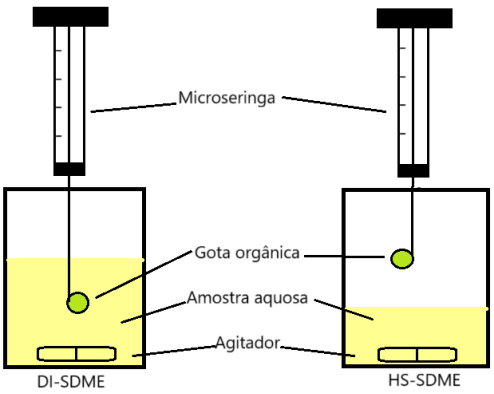

Figura 11: Representação micro extração em gota suspensa: à esquerda imersão direta (DI-SDME) e à direta imersão indireta ou headspace (HS-SDME). Fonte**:** LIN *et al.*, 2013 (Adaptado).

A **microextração em fase líquida com fibra oca** (Hollow Fiber - Liquid Phase Microextraction – HF-LPME) baseia-se na extração de analitos através dos poros de uma membrana capilar, fibra oca, contendo um solvente orgânico de extração hidrofóbico estabilizado dentro dos poros. O interior da fibra é preenchido com uma fase aceptora (pode ser aquosa ou orgânica) que não entra em contato direto com a fase doadora permitindo aplicar agitação constante durante a extração (Figura 12). Após o término da extração, a fase aceptora é então analisada através de uma técnica selecionada (OLIVEIRA *et al.,* 2008).

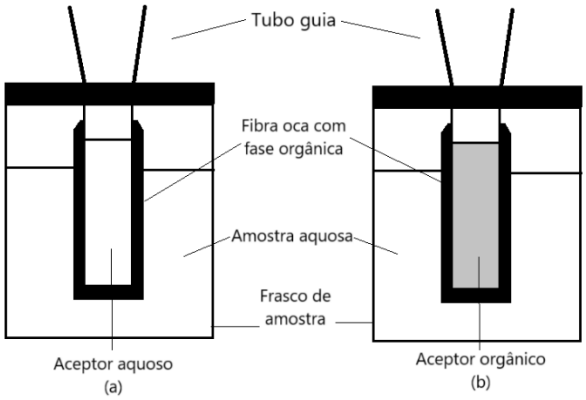

Figura 12: Representação micro extração em fase líquida com fibra oca. Fonte: SANTOS, 2016 (Adaptado).

A **microextração líquido-líquido dispersiva** (DLLME - *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), um método de separação e pré-concentração, é essencialmente uma forma miniaturizada de LLE que se baseia na partição dos

analitos utilizando pequenas quantidades de solventes dispersores e extratores os quais fazem parte de duas fases imiscíveis uma aquosa e a outra orgânica (SANTOS, 2016). Este método é baseado em um sistema de solvente de componente ternário no qual o solvente de extração e o solvente de dispersão são rapidamente injetados em uma matriz de amostra aquosa para formar uma solução emulsionada. Uma vez que o extratante é altamente disperso na fase aquosa, o equilíbrio de extração pode ser alcançado rapidamente em poucos segundos (Figura 13) (CHANG *et al.*, 2012).

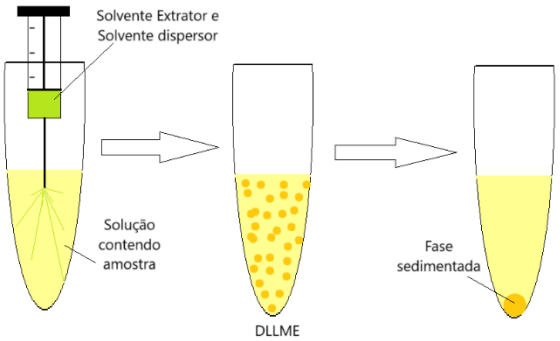

Figura 13: Representação micro extração liquido líquido dispersiva DLLME
Fonte: LIN *et al.*, 2013 (Adaptado).

2.5 Microextração Liquído-Liquído Dispersiva - DLLME

A microextração dispersiva líquido-líquido – DLLME foi desenvolvida em 2006 por Rezae e colaboradores para a determinação de traços de poluentes orgânicos e íons metálicos em amostras ambientais. É uma técnica de extração e pré-concentração de amostras que não necessita de um tempo longo para alcançar o estado de equilíbrio pois, gera um aumento da área de contato entre a amostra e o solvente extrator e com isso possui uma elevada eficiência e altos fatores de enriquecimento, atende aos requisitos de miniaturização, baixo custo e consumo de solventes orgânicos, rapidez e eficiência de extração e com alto potencial para aplicação direta em campo (CARNEIRO, 2014; XIAO-HUAN, 2009; ZGOLA *et al.*, 2011).

É baseado em um sistema de solvente de três componentes a amostra, o solvente dispersor e extrator, com extração líquido-líquido homogênea e extração de ponto de nuvem. Neste método, um solvente de alta ou baixa densidade (em comparação com a densidade da água), que é chamado de solvente de extração, é misturado com um solvente polar miscível em água (solvente dispersivo) em proporções adequadas e a mistura é então rapidamente injetado na amostra aquosa por meio de uma seringa, e um estado turvo, consistindo de gotículas finas do extratante dispersas na fase aquosa, é formado (CINELLI *et al*., 2013; FARAJZADEH, MOGADDAN e AGHDAN, 2013; SANTOS, 2016).

A técnica se baseia no princípio da partição entre a fase doadora (amostra) e aceptora (solvente orgânico), onde a polaridade do analito é que determina sua solubilidade na fase aceptora. A extração do analito nesta técnica acontece em dois passos (SANTOS, 2016; REZAE *et al*., 2006):

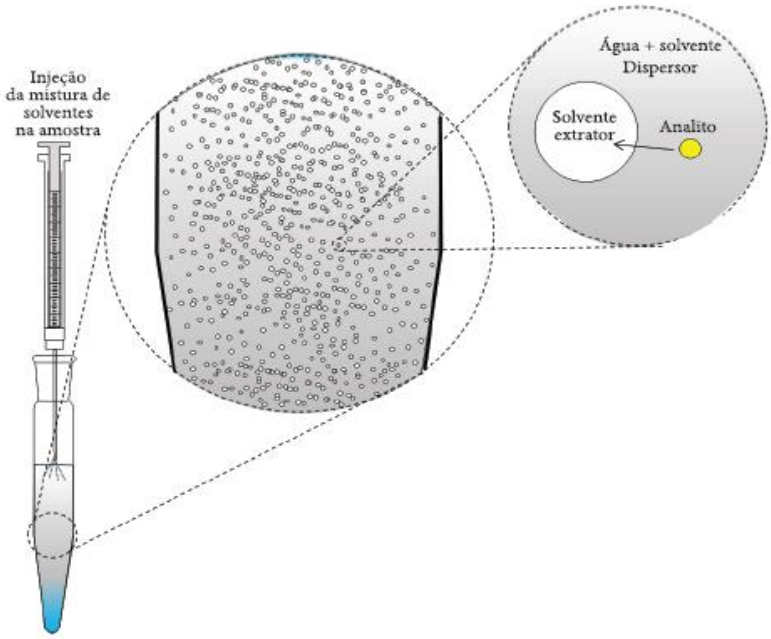

Figura 14: Esquema da injeção da mistura de solventes na amostra.

Fonte: MARTINS *et al*., 2012.

1. A injeção para uma amostra aquosa (até 10 ml) de uma quantidade relativamente pequena de um solvente de extração imiscível em água (10 - 50 µL) dissolvida em 0,5 - 02 ml de um solvente solúvel em água. O analito na amostra é extraído para o interior de gotículas do solvente de extração através da formação

de complexo (Figura 14), e então uma solução turva é formada. Ao aparecer este ponto nebuloso, as interações entre o analito e gotículas muito finas do solvente de extração são aumentadas e consequentemente o analito é transferido rapidamente para a fase de extração (SU e JEN, 2010).

2. Após a extração, a separação das fases é realizada por centrifugação, as gotículas finas se unem e são separadas da fase aquosa (Figura 15)

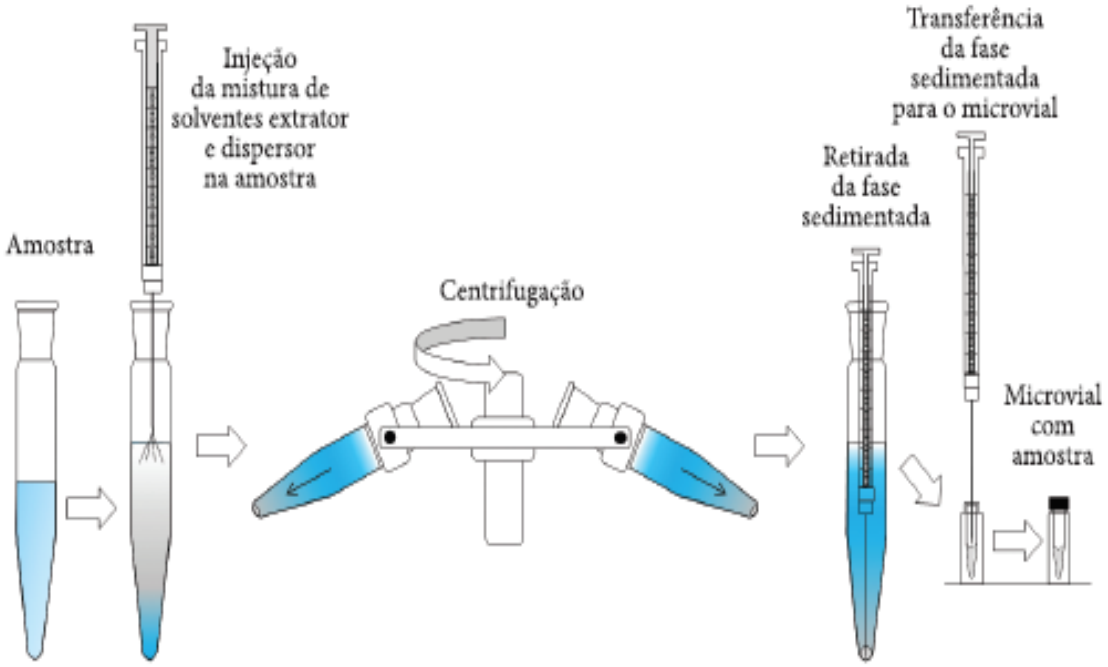

Figura 15: Esquema da injeção da mistura de solventes na amostra.
Fonte: MARTINS *et al.*, 2012

A razão entre o volume de fase aceptora e de fase doadora é da ordem de microlitros e mililitros, respectivamente, o que permite a obtenção de altos valores de enriquecimento. Em sistemas de duas fases, a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica pode ser descrita conforme a Equação 1:

$$A\ (\text{fase doadora}) \rightleftarrows A\ (\text{fase aceptora}) \qquad \text{Equação. 1}$$

onde A representa o analito. Nesse caso, o coeficiente de partição do analito entre a fase orgânica e doadora $K_{org/d}$ é dado pela Equação 2:

$$K_{\frac{org}{d}} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,d}} \qquad \text{Equação. 2}$$

com $C_{eq,org}$ é a concentração de A na fase aceptora no equilíbrio e $C_{eq,d}$ é a concentração de A na fase doadora no equilíbrio.

Moreira (2012), descreve em seu trabalho o fator de enriquecimento e a recuperação que são parâmetros utilizados para demonstrar a eficiência da extração e podem ser calculados por meio das equações 3 e 4:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \qquad \text{Equação. 3}$$

O fator de enriquecimento é definido como a razão entre concentração do analito na fase sedimentada (C_{sed}) e a concentração inicial (C_0) do analito na amostra. Já a recuperação (R) é definida como a quantidade do analito, em porcentagem, que é transferida para a fase aceptora ao final da extração e pode ser calculada pela equação 4, na qual V_{sed} e V_{aq} são os volumes da fase sedimentada e da amostra, respectivamente (MOREIRA *et al.*, 2014).

$$R = \frac{C_{sed}\ x\ V_{sed}}{C_0\ x\ V_{aq}}\ x\ 100 \qquad \text{Equação. 4}$$

2.5.1 Fatores que influenciam na recuperação do analito

Além das características inerentes do analito (coeficientes de ionização e partição) e da razão das fases aceptora e doadora alguns outros parâmetros devem ser considerados para realizar o isolamento de amostra usando DLLME, tais como:

pH da solução

O pH da amostra é crucial para a eficiente extração. O ajuste do pH resulta em uma maior razão de distribuição e garante elevados fatores de enriquecimentos e valores de recuperação do analito de interesse. Ajustes no pH podem aumentar a eficiência da extração, uma vez que tanto o equilíbrio de dissociação quanto a solubilidade de ácidos e bases são diretamente afetados pelo pH da amostra. Assim sendo, é necessário um estudo com uma faixa ampla, para que os valores

otimizados possam ser adequados aos reagentes utilizados no processo e ao tipo de extração aplicada (OLIVEIRA *et al*., 2008).

Agente complexante

A escolha do agente complexante que é fundamental para a eficiência da extração, pois há aumento da seletividade do método e formação de uma determinada coloração responsável pela absorbância do complexo. A escolha do agente complexante irá variar de acordo com o analito a ser extraído (LEITE, 2016; SKOOG *et al*., 2006).

Íons interferentes

Outro ponto importante a ser analisado são os íons interferentes no processo de extração, para avaliar a seletividade do método e evitar falsos resultados com relação ao analito. Esses íons muitas vezes fazem parte da própria matriz da amostra, dessa forma, adição de concentrações conhecidas de diferentes íons são implementados na solução a fim de serem analisados seus efeitos (OLIVEIRA *et al*., 2008).

Tempo de extração

A eficiência da extração na LPME depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica e desta para a fase aceptora (no caso de sistemas em três fases). É um processo de equilíbrio e, portanto, a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de platô. Neste ponto, o equilíbrio é atingido e a distribuição do analito entre as fases permanece constante. O tempo necessário para atingir o equilíbrio pode ser reduzido aumentando a área superficial de contato da fibra com a amostra. Muitas vezes, o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido é excessivamente longo; nesses casos, a extração é feita em condições de não equilíbrio, controlando-se precisamente o tempo de extração (LEITE, 2016).

Temperatura

Com o aumento da temperatura, os coeficientes de difusão aumentam em resposta à diminuição da viscosidade. Logo, o tempo requerido para alcançar o equilíbrio é diminuído. Por outro lado, os coeficientes de partição para a fase aceptora diminuem, reduzindo a quantidade de fármaco extraído no estado de equilíbrio. Portanto, a velocidade das extrações pode ser melhorada à custa da perda da detectabilidade do método (LEITE, 2016).

Agitação

Normalmente, a agitação da amostra é aplicada para acelerar a cinética de extração, facilitando a difusão dos analitos através da interface fase doadora – solvente orgânico. Logo, diminui-se o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio. Embora utilizada em diversos trabalhos, a agitação induzida por uma barra magnética pode provocar contaminação cruzada das amostras e a formação de bolhas de ar que tendem a aderir na superfície da fibra cilíndrica, acelerando a evaporação do solvente e introduzindo imprecisão nas medições (LEITE, 2016).

Solvente orgânico

Uma etapa fundamental na otimização da DLLME é a seleção do solvente orgânico. Martins (2012), aponta em seu trabalho que o principal parâmetro a ser definido para a otimização de um procedimento de extração por DLLME é o tipo de solvente extrator, que deve ser escolhido, parâmetros como: densidade maior que a água e permitir formação da fase sedimentada; capacidade de extração dos analitos e adequação à técnica analítica escolhida; ter baixa solubilidade em água, permitindo a separação adequada do extrato orgânico e ponto de fusão devem ser consideradas. Ainda, tanto o solvente extrator, quanto o solvente dispersor, devem ter pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, para evitar perdas significativas de solvente durante o processo de extração. O solvente de extração deve ser capaz de extrair analitos, ser solúvel no solvente dispersor, insolúvel em amostras aquosas e ter densidade superior à da água (MONTEVECCHI *et al.*, 2017).

Com a apresentação desses parâmetros para o solvente extrator, bem como a perda de solvente por evaporação, podem ser evitados significativamente usando líquidos iônicos que têm sido usados com sucesso, uma vez que à sua distinta pressão de vapor detectável, ampla faixa de líquidos, alta capacidade de solvatação, alta estabilidade química e térmica mesmo em temperaturas elevadas, boa capacidade de extração para vários compostos e seletividade para compostos orgânicos e inorgânicos e, além também, de ser um solvente da química verde (BERTON *et al.*, 2012; OJED e ROJAS, 2018).

2.6 Líquido iônico

O líquido iônico (LI), é um tipo de solvente que surgiu como uma alternativa mais ecológica aos solventes orgânicos convencionais devido à sua baixa volatilidade e inflamabilidade. À sua ampla condição de estar no estado líquido se deve a natureza deste solvente ser um “sal líquido”, ou seja, sais que derretem a temperaturas inferiores a 100°C. Apresentam características especiais por poder ser adaptados para extrair um determinado analito pela seleção adequada dos seus íons constituintes, introduzindo complexidade e diversidade à estrutura (Figura 15) (LLAVER *et al.,* 2021; SHAMSHINA *et al.,* 2018).

São compostos formados por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico aqueles contendo cátions baseados no anel imidazólio ou piridínico e que podem ser aplicados a diferentes processos químicos, normalmente empregados em extração, reações de síntese, em catálise e em processos eletroquímicos (BERTOTI e FERREIRA, 2009).

Cada vez mais os líquidos iônicos vêm sendo estudados a temperatura ambiente na tentativa de torna-los “solvente verde” pois reduz a quantidade de resíduos orgânicos e contribui na diminuição do impacto ambiental. Estes solventes podem ser “criados ou modulados” por diferentes combinações entre cátions e ânions para desempenhar o papel desejado no processo (OLIVEIRA, 2015). São classificados de acordo com o cátion que os compõem, sendo de 4 tipos principais: alquil-almônio, alquil-fosfônio, diaquil-imidazólio, N-alquil-piridíno, apresentados na Figura 16 respectivamente (SILVA, 2004).

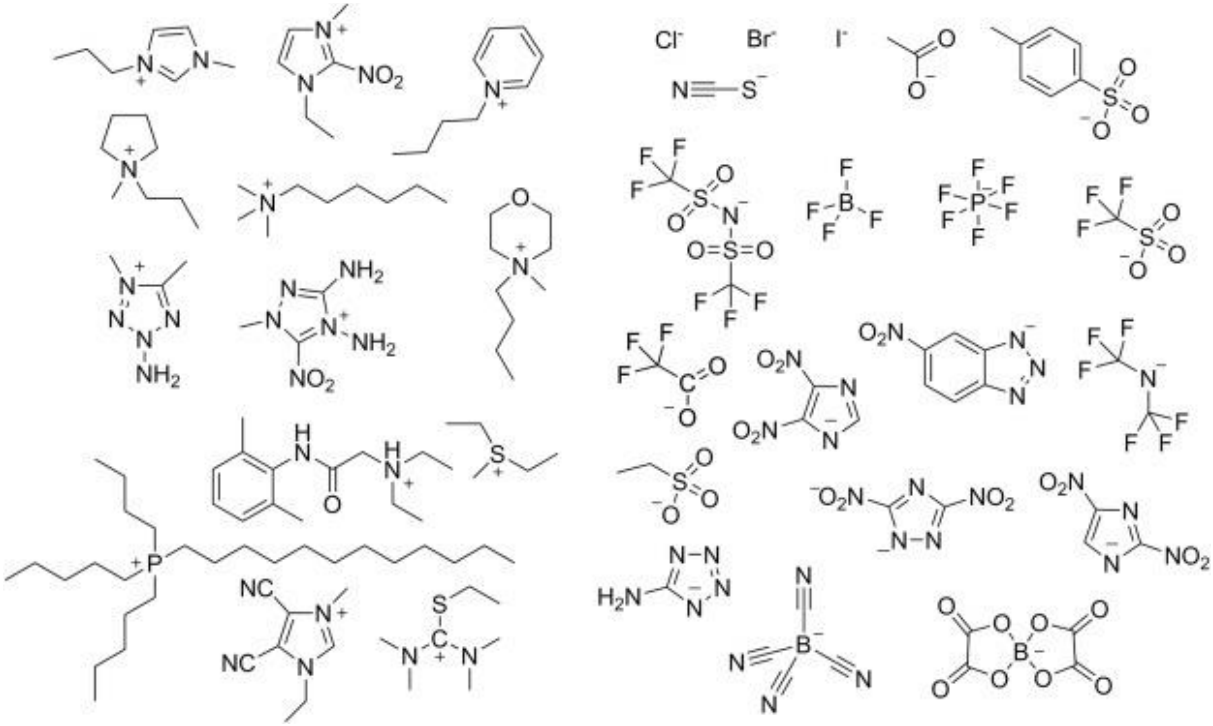

Figura 16: Íons constituintes de Líquidos iônicos cátions à esquerda e ânions à direita**.**

Fonte: SHAMSHINA *et al*., 2019.

Esses líquidos, capazes de dissolver uma grande quantidade de solutos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, são intensamente investigados como fluidos para aplicações de engenharia, devido às suas propriedades entre as quais: pressão de vapor desprezível, alta estabilidade térmica e severas condições de oxidação ou redução, isto, junto com processos de produção mais simples e rápidos, dando inovações de processo. Propriedades que dependem da natureza dos ânions e cátions que compõem o LI e, portanto, são possíveis de ajustar à vontade (CORTÉS *et al*., 2010; SHAMSHINA *et al*., 2019).

Atualmente, o alto preço comercial desses solventes afeta fortemente a análise de custo-benefício de uma modificação de processo baseada em LIs, porém, devido a sua grande estabilidade química e baixa volatilidade, eles dão a possibilidade de alta reciclabilidade (CORTÉS *et al*., 2010).

De acordo com Trujillo-Rodríguez *et al.*, 2013, na técnica microextração líquido-líquido dispersiva utilizando líquidos iônicos IL-DLLME, existem 4 tipos básicos (Figura 17):

- IL-DLLME convencional, descrita anteriormente;
- IL-DLLME controlada por temperatura no auxílio da dispersão;
- A IL-DLLME in situ, a qual usa um agente de permuta iônica para a separação das fases
- E IL-DLLME assistida por vórtex, ultrassom ou por micro-ondas, a qual se vale da agitação mecânica para promover a dispersão do líquido iônico.

Em geral, vários requisitos têm de ser cumpridos para realizar o isolamento de amostra usando DLLME. O solvente dispersante tem de ser totalmente solúvel, com a fase da água e a fase orgânica. O solvente de extração tem de ter o potencial para extrair analitos. Além disso, tem que ser solúvel no solvente de dispersão, enquanto a sua solubilidade na água tem de ser muito baixa. E por fim, a densidade do solvente de extração deve ser diferente grandemente da densidade da água, para permitir a separação de fases (MONTEVECCHI *et al.*, 2017).

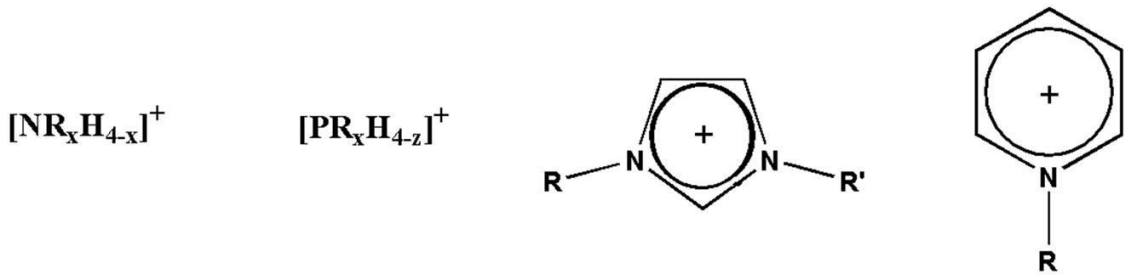

Figura 17: Principais cátions de líquidos iônicos.
Fonte: MINEA, 2020.

Apesar da grande variedade de solventes orgânicos puros disponíveis no mercado, a seleção de solventes de extração e dispersores ficam limitadas e altamente dependente dos analitos devido aos critérios para selecionar o solvente ideal (CHANG *et al.*, 2012). Além de que, o uso de um solvente dispersor como o terceiro componente geralmente diminui o coeficiente de partição dos analitos no solvente de extração. À vista disso, a extração na ausência de um solvente dispersor na microextração líquido-líquido tem ganhado destaque nas técnicas

analíticas. Um novo método como alternativa para substituição do solvente dispersante na técnica de microextração é o uso do vórtex e ultrassom (CINELLI *et al.*, 2013; FARAJZADEH, MOGADDAN, AGHDAN, 2013).

2.7 Microextração líquido-líquido assistida por ultrassom

Regueiro *et al.*, (2008), demonstrou o uso da radiação de ultrassom para auxiliar na dispersão do solvente de extração em amostras. Nessa técnica, chamada de microextração de emulsificação assistida por ultrassom (USAEME), a radiação ultrassônica contribui para a formação de bolhas microscópicas nos solventes utilizados. Ao entrarem em colapso, essas bolhas produzem pequenas ondas de choque e geram algumas cavidades bem adaptadas para promover a dissolução da fase extratora que fica com maior contato com a amostra. Essas gotículas acelera a transferência de massa entre duas fases imiscíveis, reduz o tempo de equilíbrio, aumentando então a extração dos analitos de interesse (YANG *et al.*, 2011).

Na microextração líquido-líquido dispersiva, o solvente dispersor necessário pode ser substituído pelo ultrassom, conhecida pela sigla a USADLLME. Esta técnica ocorre em um espaço curto de tempo, o solvente extrator pode não atingir uma dispersão favorável para a transferência do analito e, se muito longa, pode ocorrer a volatilização do solvente extrator e consequentemente a degradação do analito devido à altas temperaturas. Essas desvantagens são corrigidas com a substituição do solvente extrator orgânico por um liquido estável, conhecido como Líquido Iônico (LI), que apresenta propriedades promissoras e vantajosas para o método. Juntamente com a eficiência das ondas ultrassônica e a seletividade do LI, o método fica isento o uso de solvente, sendo a uma técnica mais ecologicamente correta. Esta configuração é conhecida pela sigla LI-USADLLME (DUARTE, 2016).

Recentemente, também, tem sido destacada a eficácia na associação da radiação ultrassônica com a força mecânica do vórtex, uma técnica relativamente nova, com os primeiros trabalhos publicados em 2013, chamada de microextração líquido-líquido com dispersão assistida por agitação em vórtex e ultrassom

(USVADLLME - *ultrasound vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction*) na determinação de diferentes analitos em matrizes aquosas. Nesta configuração o uso da agitação em vórtex e a radiação ultrassônica intensificam o processo de dispersão do solvente extrator e contribuem para aumentar a superfície de contato entre a fase orgânica (solvente extrator) e a fase aquosa, o que favorece a partição dos compostos de interesse entre as duas fases imiscíveis. O Ultrassom fornece uma fase dispersa para a extração quantitativa do analito e vórtice evita a formação de um sistema bifásico (CINELLE, 2013; DUARTE, 2016; OJEDAS e ROJAS, 2018).

Além da dispersão por ultrassom e por vórtex, outro tipo de agitação pode ser efetivamente utilizado que é agitação manual. Este método é um procedimento rápido e conveniente para análises qualitativas e quantitativas. Pode ser feita para dispersão e extração, ou como uma etapa de pré-mistura antes da extração. Gotículas orgânicas finas são subsequentemente formadas na solução da amostra agitando manualmente o tubo de ensaio que contém a mistura da solução da amostra e solvente de extração. A grande área de superfície das gotículas de solvente orgânico aumenta a taxa de transferência de massa da amostra de água para o extrator e permite uma extração eficiente em um curto período. Vários relatórios indicaram que o uso de agitação manual na USAEME melhora a eficiência da extração e diminui o tempo de extração ultrassônica, o que minimiza a decomposição dos analitos (HUANG, 2014; LEONG, FUH e SILVA, 2019).

3. JUSTIFICATIVA

As etapas de extração e pré-concentração dos analitos são ainda uma grande dificuldade nos procedimentos analíticos devido ao fato dessas etapas serem lentas, apresentarem a possibilidade de contaminação e a perda das espécies de interesse durante o manuseio da amostra (CARASEK e SCHARF, 2002). Nas etapas de extração pode-se utilizar a Extração Líquido-líquido. No entanto, a LLE caracteriza-se pela demora, requer grandes volumes de solventes

orgânicos, além de envolver várias etapas que estão associadas com as perdas de analito e ocorrência de contaminação (MARTINS *et al.*, 2012). A leitura das amostras também é um passo crucial para a especiação de analitos. As técnicas existentes apresentam um limite de detecção relativamente alto e consideravelmente caros.

O interesse em determinar mercúrio para estimar o seu real impacto no meio ambiente, principalmente para o sistema aquático, a vegetação e os seres humanos, levou a um grande progresso no desenvolvimento de técnicas de análise para este metal. Além disso, a alta toxicidade aliada ao baixo nível de mercúrio em algumas amostras, bem como a sua natureza volátil e associação com outros compostos, faz com que sejam necessárias técnicas bastante sensíveis e precisas para a sua determinação em diferentes matrizes (JIANG e OUYANG, 2015). Para a determinação de mercúrio, alguns critérios como a natureza da amostra e o nível de concentração de mercúrio esperado, devem ser consideradas para a escolha da metodologia analítica mais adequada a ser utilizada (STAUN, 2018).

A importância de técnicas ultra limpas de amostragem, de manipulação e de análise de padrões e de calibração tem sido proposta, para que se obtenham resultados confiáveis nas determinações de metais a nível de traço. Diante disso, este trabalho se preocupará em desenvolver um novo método de quantificação de mercúrio, que usará como princípio a técnica analítica já conhecida, microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), que por sua vez, será aplicado em amostra de vacinas de difteria, tétano, coqueluche e hepatites A e B que utilizam timerosal como conservantes.

Nesta técnica haverá substituição dos solventes extrator e dispersor, por liquido iônicos e força mecânica respectivamente, proporcionando ao método baixo impacto ambiental e ainda contribuir com uma nova forma de controle do teor de mercúrio presente nas vacinas. Visto que o mercúrio é alvo de muitos estudos por sua toxicidade.

Será proposta para leitura de especiação do mercúrio o aparelho comumente encontrado nos laboratórios de química analítica o espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, que apresenta rapidez, baixo custo e de fácil

manuseio em seu sistema, comparado a outros aparelhos usados na quantificação do mercúrio. Apesar de muitos procedimentos de microextração por solvente para determinação de mercúrio terem sido relatados, o número de procedimentos associados à detecção de UV-Vis também é limitado.

Desse modo, com o emprego desse método é possível reduzir erros resultantes dos procedimentos analíticos com muitos estágios, diminuir impactos sobre o meio ambiente e riscos ao operador. A ausência do uso de solventes orgânicos é expressiva. Assim, o desenvolvimento deste método que emprega a microextração está de acordo com os princípios da Química Verde referentes a geração de resíduos e uso de reagentes com menor toxidade.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

- Desenvolver um método analítico baseado na microextração líquido-líquido usando líquidos iônicos para a determinação de mercúrio em vacinas.

4.2 Específicos:

- Desenvolver metodologia para o pré-tratamento das amostras;
- Usar técnicas de planejamento de experimentos e metodologias de superfície de resposta para otimização do método de pré-concentração;
- Aplicar o método proposto na determinação de mercúrio.

5. MATÉRIAS E MÉTODOS

5.1 Instrumentação

Uma balança analítica de precisão da marca Shimadzu®, modelo AY220 foi usada para os procedimentos de pesagem. Para pipetagem das soluções foram utilizados micropipetadores e pipetadores automáticos com capacidade variável de 10 a 100 µL, 100 a 1000 µL e 1000 a 5000 µL (Rainin® Instrument, modelo CLASSIC™).

Para a digestão das amostras de vacinas foi utilizado bomba de digestão ácida (Frascos de Teflon®/PROVECTO ANALÍTICA) e um forno digestor (DGT 100 Plus) do laboratório da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia - UESB. As amostras digeridas foram mantidas em um tubo falcon com capacidade de 20 ml.

Para etapa de dispersão foi utilizado um aparelho ultrassônico da marca Elma®, modelo Elmasonic P. E na etapa de separação das fases, durante o procedimento de DLLME, usou uma centrífuga analítica (Hettich®, modelo Rotofix 32 A) com capacidade para 32 tubos de 10 ml e velocidade máxima de rotação de 4000 rpm.

Para medida do pH foi utilizado um pHmetro digital (DEL-LAB, modelo DLA-PH).

A quantificação do analito foi realizada empregando um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe (Shimadzu®, modelo UV-1800), equipado com duplo monocromador e duas microcubetas de quartzo gêmeas com 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 750 µL.

5.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: peróxido de hidrogênio (Emsure®), ácido nítrico, etanol, liquido iônico (Sigma-Aldrich®), ditizona (Cromoline), solução padrão de mercúrio SpecSol®; Dinâmica®), fosfato de potássio (ISOFAR; Vetec) e fosfato de sódio (FMaia).

5.3 Preparo de Soluções

Para o preparo de soluções foi utilizado água ultrapurificada obtida a partir de um sistema de purificação em aparelho Milli-Q®. As vidrarias usadas, e outros materiais, foram descontaminados por imersão em uma solução de HNO_3 10% (v/v) (Sigma-Aldrich®) durante 24h e, posteriormente, lavados com água ultrapura.

5.3.1 Soluções de referência

As soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de soluções padrão de 1000 $mg.L^{-1}$ de Hg, Fe, Pb e Cu (FLUKA-TraceCERT®) em água ultrapurificada.

5.3.2 Solução estoque de ditizona

A Ditizona (Cromoline), utilizada como agente quelante para complexação do Hg, foi preparado com etanol absoluto (Sigma-Aldrich®), na concentração molar de $1,3 \times 10^{-4}$ $mol.L^{-1}$.

5.3.3 Soluções-tampão

As soluções-tampão, acetato de sódio pH 3-5, fosfato pH 6-7,5, glicina pH 8, Tris (tris-(hidroximetil) amino metano) pH 9 e bicarbonato pH 10-11, foram preparadas medindo a massa do reagente na concentração de 0,1 mol L^{-1}. Após a dissolução em água ultrapura, o pH foi ajustado para o valor desejado com soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,1 $mol.L^{-1}$ e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 $mol.L^{-1}$. Os volumes então foram completados em balões volumétricos com água ultrapura.

5.4 Amostragem

As amostras de vacinas multidoses de Hepatite B, Caxumba + Difteria, Influenza, Febre Amarela foram cedidas pela secretária de saúde do município de Itambé/BA, após campanha vacinal de 2021 (Figura 18). As amostras cedidas corresponderam a frascos que ultrapassaram o prazo de validade após a sua abertura. Foram coletadas 42 amostras de vacinas, sendo 6 de hepatite, 16 de caxumba, 7 influenza, 7 difteria + coqueluche e 6 febre amarela. Os frascos foram esterilizados com álcool 70%, seco, separados, embalados e identificados, conforme nome de cada vacina em sacolas plásticas e mantidas sob refrigeração no congelador do Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal da Bahia – UFBA, em Vitória da Conquista, até a digestão.

Figura 18: Frascos de vacinas adquiridas da cidade de Itambé-Ba

5.5 Tratamento das Amostras

5.5.1 Digestão da amostra

2 ml de cada uma das amostras de Hepatite B, Caxumba + Difteria, Influenza, Febre Amarela foram digeridas em bomba de digestão ácida Parr®, com adição de 2ml de ácido nítrico 65% (HNO_3) e 2ml de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARCELOS, 2015). O frasco de digestão foi introduzido no micro-ondas de

digestão a 250% da potência, durante 10 minutos. Com a finalidade de liberar a composição mineral, uma vez que o mercúrio se apresenta ligado a um composto orgânico de cadeia etil. Após cada ciclo, os frascos de digestão foram deixados em repouso por aproximadamente 10 minutos para alcançar a temperatura ambiente. Após a mineralização, as amostras foram ajustadas para o pH 7,5 com a adição de uma solução de NaOH 25%, avolumadas para 5 ml e armazenadas até o momento da análise.

5.5.2 Procedimento de pré-concentração

A pré-concentração do mercúrio foi realizada em triplicatas, em tubo Falcon com capacidade de 10 ml, onde foi adicionado 2 ml de solução-tampão fosfato (0,1 $mol.L^{-1}$) pH 7,5, 1,5 ml de solução estoque de Hg, 1 $\mu g.L^{-1}$, 275 µl de ditizona usado como reagente complexante ($1,3.10^{-4}$ $mol.L^{-1}$), 110 µl de Líquido iônico (Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio ($[C_6MIM][PF_6]$)) e avolumado até 5 ml com água ultrapura. Com o tubo fechado, cada triplicata foi, simultaneamente, agitada manualmente durante 95 segundos, seguida de banho ultrassônico, com 1.024 kWh, frequência de 100 hz e temperatura de 70°C, no tempo de 5 min. A etapa seguinte foi o banho de gelo durante 8 min com temperatura igual a 0°C. Em seguida, houve a centrifugação, que teve duração de 10 minutos a 4000 rpm, para a separação das fases. A fase aquosa foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável e, por fim, à fase orgânica foi adicionado 250 µL de etanol. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, no comprimento de onda de 530 nm, com base no valor do pico da varredura do complexo Hg-Dtz.

5.6 Planejamento Experimental

Para o desenvolvimento e otimização do método analítico foram utilizadas duas metodologias: método univariado e método multivariado. A primeira, permite a análise de cada variável separadamente, ou seja, os experimentos são realizados

mantendo-se todos os fatores constantes, variando-se apenas um nível do fator até que o melhor resultado seja encontrado. Apesar de ter interpretação simples dos resultados obtidos, requer maiores ensaios analíticos e, consequentemente, um maior gasto de reagentes, além de não considerar as interações entre os pontos analisados. Na segunda, inclui os métodos de análise das relações de múltiplas variáveis dependentes e/ou múltiplas variáveis independentes. Neste método todas as variáveis são otimizadas simultaneamente. Nele, pode-se interpretar as dependências dos níveis e estabelecer ou não relações de causa/efeito entre estes dois grupos (BREITKREITZ, SOUZA E POPPI, 2014).

5.6.1 Planejamento univariado

No planejamento univariado foi avaliado o efeito do pH da solução-tampão no complexo Hg-Dtz, variando o pH na faixa de 3,0 a 11,0, o efeito da concentração e do volume do agente complexante de $1,3.10^{-4}$ mol.L^{-1} a $2,5.10^{-4}$ mol.L^{-1} e 300 a 700 µL, respectivamente e volume de líquido iônico de 50 µL a 150 µL sobre a sensibilidade do método. As condições da força mecânica na dispersão em uma variação de tempo de 3 min à 8 min e temperatura 50ºC a 80ºC, além da etapa de turvação no banho de gelo no tempo de 3 min a 10 min, também foi avaliado. A escolha do reagente foi baseada na combinação do solvente extrator (Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio [C_6MIM][PF_6]) com a fase de dispersão (ultrassom e agitação manual) que apresentaram melhor resposta para a determinação de 0,3 µg.L^{-1} de Hg. Considerou como parâmetros fixos, no procedimento de pré-concentração, pH 7,5, 275 µL de ditizona 0,001% (m/v), volume do solvente extrator de 110 µl, dispersão com T = 70°C, t = 5 min e turvação em 8 min, t = 0°C.

5.6.2 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial completo de dois níveis é uma das ferramentas quimiométricas mais empregadas para otimização de processos e/ou produtos. A

quantidade de experimentos necessários para o desenvolvimento é determinada pela expressão, n = 2k, onde n é o número de experimentos e k o número de fatores. Essa expressão viabiliza todas as possíveis combinações envolvendo todos os fatores em dois níveis, codificados como: inferior (- 1) e superior (+ 1). O erro experimental é determinado pela repetição dos experimentos no ponto central, ou seja, valor codificado (0). Para a avaliação dos resultados encontrados, é gerado o Gráfico de Pareto, que exibe ou não a significância dos fatores principais e de suas interações, mediante apresentação dos valores dos efeitos padronizados de todas as variáveis e suas interações possíveis (CAPP e NIENOV, 2020).

A matriz do planejamento foi montada para 3 (três) fatores: variação do pH, volume do complexante e volume do líquido iônico, totalizando 13 (treze) experimentos, e mais 3 (três) pontos centrais, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial de 2 níveis.

Experimentos	pH	Complexante	Líquido Iônico
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	+	+
13	0	0	0

Os valores utilizados para o nível inferior, superior e o ponto central de cada fator são representados na Tabela 3. Os níveis foram escolhidos após a análise do planejamento univariado.

Tabela 3. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial

	Níveis		
Fatores	-	0	+
pH	3	6	9
Volume do Complexante (µl)	100	200	300
Volume de L.I. (µl)	50	100	150

5.6.3 Matriz Box-Behnken

Após a análise do planejamento fatorial, realizou-se uma etapa de otimização do método, com a finalidade de identificar os pontos críticos dos fatores significativos. A matriz de Box-Behnken, uma metodologia de resposta (MSR) amplamente utilizada na otimização de processos envolvendo fatores experimentais na química analítica, foi aplicado neste estudo. Apresentado por Box e Behnken em 1960, tem por objetivo, estabelecer as melhores condições em uma análise. Neste desenho (Tabela 3), a combinação entre planejamentos fatoriais fracionários de três níveis (+1, 0, -1) e três variáveis, gera um total de 13 experimentos pela expressão: N = 2k (k -1) + PC, onde (N) é o número de experimentos e (k) é o número de fatores envolvidos e PC ponto central (GOMES, 2013). O tratamento dos dados referentes ao planejamento fatorial e otimização da DLLME foi feito com o auxílio do programa Statistica®, versão 10.0 (Statsoft), e Excel Office 2019, da Microsoft®.

5.7 FIGURAS DE MÉRITO

Na validação de um método analítico, alguns parâmetros são utilizados para avaliar a adequabilidade de todo o método desenhado. Estes parâmetros envolvem linearidade, fator de enriquecimento, limite de detecção, limite de quantificação,

precisão, exatidão, robustez e interferentes, como parte do desenvolvimento do método.

5.7.1 Linearidade e fator de enriquecimento

A linearidade é a capacidade de um método analítico obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, dentro de um intervalo especificado. Uma relação linear deve ser estabelecida para toda a faixa estabelecida para o método. Esse intervalo corresponde à faixa entre os limites de quantificação superior e inferior. É expressa pelo coeficiente de correlação (R^2), obtido por dados estatísticos, no qual o critério mínimo aceitável do R^2 deve ser igual a 0,99; e a equação da reta y = ax + b, onde (y) é a resposta medida em absorbância; (x) a concentração; (a) inclinação da curva de calibração; e (b) a interseção com o eixo y. Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes em triplicata (PEREZ, 2010).

A curva de calibração para o método proposto foi realizada nas concentrações de 0 a 0,25 $\mu g.L^{-1}$ de Hg com intervalo de 0,05 $\mu g.L^{-1}$. Com base na curva de linearidade, também foi realizado o cálculo do fator de enriquecimento (FE), Equação 5. Pela razão entre a inclinação da curva do sistema pré-concentrado (αC), na faixa de concentração de 0 a 0,25 $\mu g.L^{-1}$ de Hg, e a inclinação da curva do sistema sem pré-concentrar (αSC), leitura direta do tampão, padrão Hg na faixa de concentração de 0 a 25 $\mu g.L^{-1}$ e complexante.

$$FE = \frac{\alpha C}{\alpha SC}$$

Equação. 5

5.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança, porém, não necessariamente quantificado, sob as

condições experimentais estabelecidas. Toda técnica analítica tem um limite de detecção. A sensibilidade é, portanto, a inclinação da curva de calibração. Se a curva de calibração for linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração. Se a curva de calibração não for linear, a sensibilidade variará com a concentração e não tem um valor único. A equação 6 expressa a estimativa do limite de detecção em determinações por métodos instrumentais. Na relação de três vezes o ruído da linha de base (SKOOG *et al.*, 2006, p. 200).

$$\mathrm{LD} = \frac{3\mathrm{x}\ (\text{Desvio padrão})}{\text{Inclinação da reta}} \qquad \text{Equação. 6}$$

O limite de quantificação (LQ) se refere à menor quantidade da substância de interesse que pode ser quantificada pelo método, apresentando precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os mesmos critérios de LD podem ser aplicados para o LQ, entretanto, na determinação do ruído da linha de base, considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1. O LQ pode ser expresso pela equação 7 (PEREZ, 2010). O desvio-padrão na determinação do LD e LQ foi calculado com 10 amostras do branco.

$$\mathrm{LQ} = \frac{10\mathrm{x}\ (\text{Desvio padrão})}{\text{Inclinação da reta}} \qquad \text{Equação. 7}$$

5.7.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras múltiplas de uma mesma amostra, preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A dispersão dos resultados é demonstrada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) (Equação 8) da série de medições, conforme a equação 8, ou coeficiente de variação (CV%), conforme a Equação 9. Onde o valor máximo aceitável não ultrapassa 5% (ARAÚJO, 2019).

Foram realizadas 15 medidas dos pontos de 0,1 µg.L^{-1} a 0,25 µg.L^{-1} de Hg num intervalo de 0,05 µg.L^{-1}.

$$\mathrm{DPR} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{Média}} \mathrm{x}100 \qquad \text{Equação 8}$$

5.7.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (PEREZ, 2010)

Neste estudo, o teste foi aplicado em amostras de vacinas (n = 42) obtidas no município de Itambé-Ba, onde foram adicionados 0,3 µg.L^{-1} de Hg. A recuperação foi calculada através da Equação 09. Onde (C_1) é a concentração determinada na amostra adicionada; (C_2) a concentração determinada na amostra não adicionada; e (C_3) a concentração adicionada.

$$\mathrm{R\%} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \qquad \text{Equação. 9}$$

5.7.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em permanecer inalterado na presença de variações pequenas propositais, dos parâmetros analíticos descritos (PEREZ, 2010). A matriz de planejamento fatorial de dois níveis para o teste de robustez pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4: Matriz de planejamento fatorial de dois níveis para teste de Robustez.

Experimentos	pH	Complexante	Líquido Iônico
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Os valores utilizados para os níveis superiores, inferiores e o ponto central de cada fator, para uma variação de 10 %, estão representados na Tabela 3.

5.7.6 Interferentes

Foi avaliado o comportamento da possível interferência de 3 (três) metais, Pb, Cu e Fe na determinação do Hg de 0,3 $\mu g.L^{-1}$, pelo método de DLLME, após adição 0,3, 0,5 e 0,7 $\mu g.L^{-1}$ de cada metal. A interferência (In) foi determinada pela razão entre a leitura do padrão de Hg com a adição do interferente (PA) contra a leitura do padrão (P) sem adição do interferente, expressa em porcentagem, conforme Equação 10.

$$In = \frac{\mathrm{PA}}{\mathrm{P}} \mathrm{x}\, 100 \qquad \text{Equação. 10}$$

5.8 APLICAÇÃO

Após a etapa de digestão, o método desenvolvido foi aplicado nas amostras de vacinas de Hepatite B, Influenza, Caxumba e Coqueluche. Para o procedimento foram adicionados 1,5 ml da amostra digerida, 2,0 ml de solução-tampão pH 7,5, 275 µL de ditizona 0,001 (m/v)%, 110 µL de LI e avolumado até 5 ml com água Mili-Q. Após fechar, o tubo foi agitado manualmente durante 90s. Em seguida, foi adicionado ao banho ultrassônico, durante 5 min, T = 70°C. A etapa seguinte foi o banho de gelo durante 8 min, T = 0°C. E por fim, a centrifugação, que teve duração de 10 minutos a 4000 rpm, para a separação das fases. A fase aquosa foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur descartável. E, por fim, a fase orgânica foi adicionado 250 µL de etanol (Figura 19). Também foi realizado pré-concentração para o branco da amostra, após a etapa de mineralização.

Figura 19: Pré-concentrado antes da leitura. À esquerda o branco, à direita amostra

As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, no comprimento de onda de 530 nm, com base no valor do pico da varredura do complexo Hg-Dtz. As digestões e leituras das amostras foram

realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados em forma de média e desvio-padrão.

6. REFERÊNCIAS

1. ABDULRAHMAN, Ahmed; GHANEM, Ashraf. **Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review.** Analytica Chimica Acta. v. 1025, p. 41-57, 2018.
2. AJSUVAKOVA, Olga P. et al. **Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity.** Coordination Chemistry Reviews, v. 417, p. 213343, 2020.
3. ALTO, Amidou et al. **Photoluminescent nanoprobes based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines**. Talanta, v. 221, 2021.
4. ALTUNAY, Nail. **Utility of ultrasound assisted-cloud point extraction and spectophotometry as a preconcentration and determination tool for the sensitive quantification of mercury species in fish samples**. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 189, p. 167-175, 2018.
5. ASCOM/ANVISA. **Uso de mercúrio está proibido em produtos para a saúde.** 2019. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/> Acesso em julho de 2021.
6. AUGELLI, Marcio Antonio et al. **Chronopotentiometric stripping analysis using gold electrodes, an efficient technique for mercury quantification in natural waters.** Electroanalysis, v. 17, n. 9, p. 755-761, 2005.
7. BAÊTA, Aída Pereira. **Mercúrio total e metilmercúrio em tecidos de diferentes espécies de peixes da baía de Guanabara**. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2004.
8. BARBOSA, Adriana Bernardes et al. **Pré-concentração e determinação de Hg (II) com ditizona empregando sistema ternário homogêneo de solventes.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, 2001.
9. BARCELOS, Júlia de Souza et al. **Determinação de mercúrio em amostra de tecido de peixe por espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG AAS) e espectrometria de fluorescência atômica (AFS).** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, 2015.
10. BAXTER, David. **Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing**. Occupational Medicine, v. 57, p. 552–556, 2007**.**
11. BERNHOFT, Robin A. **Mercury toxicity and treatment: a review of the literature.** Journal of environmental and public health, v. 2012, n. 1, p. 460-508, 2012.
12. BERTON, Paula et al. **Selective determination of inorganic cobalt in nutritional supplements by ultrasound-assisted temperature-controlled**

ionic liquid dispersive liquid phase microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta, v. 713, p. 56-62, 2012.

13. BERTOTI, Ada Ruth; NETTO-FERREIRA, José Carlos. **Ionic liquid [bmim. PF6]: a convenient solvent for laser flash photolysis studies**. Química Nova, v. 32, p. 1934-1938, 2009.
14. BISINOTI, Márcia Cristina et al. **Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica do vapor frio.** Química Nova, v. 29, n. 6, p. 1169-1174, 2006.
15. BOISCHIO, Ana. **Developmental neurotoxicity: methylmercury and prenatal exposure protection in the context of the Minamata Convention**. Revista Panamericana de Salud Pública, v. 38, p. 243-247, 2015.
16. BRADLEY, Mark A.; BARST, Benjamin D.; BASU, Niladri. **A review of mercury bioavailability in humans and fish**. International journal of environmental research and public health, v. 14, n. 2, p. 169, 2017.
17. BREITKREITZ, Márcia Cristina et al. **Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III.** Química Nova, v. 37, p. 564-573, 2014.
18. BRUNSON, Emily K. **VACCINE**. Britannic Academic, 2020.
19. CAMPOS, Mariah Silva Leandro. **O papel dos municípios no cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 no âmbito da ONU**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2022.
20. CAÑARI-CHUMPITAZ, Cristhian. **Descubriendo ambas caras de un mismo elemento inusual: el mercurio**. Revista de Química, v. 33, n. 1-2, p. 25-26, 2019.
21. CAPP, Edison; NIENOV, Otto Henrique. **Bioestatística quantitativa aplicada.** Bioestatística quantitativa aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.
22. CARASEK, Eduardo; TONJES, Jussara Wick; SCHARF, Mauro. **Pré-concentração de chumbo e cádmio em um sistema de micro extração líquido-líquido e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama.** Química Nova, v. 25, n. 5, p. 748-752, 2002.
23. CARMONA, Manuel et al. **Mercury emissions in equilibrium: a novel approach for the quantification of mercury emissions from contaminated soils.** Analytical Methods, v. 5, n. 11, p. 2793-2801, 2013.
24. CARNEIRO, Maria Fernanda Hornos. **Avaliação da distribuição, metabolismo e nefrotoxicidade do timerosal-um conservante a base de mercúrio usado em vacinas-utilizando modelos in vivo e in vitro**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2014.
25. CHANG, Wei-Yao et al. **Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled with derivatization for the fluorometric determination of aliphatic amines.** Journal of Chromatography A, v. 1248, p. 41-47, 2012.
26. CHEN, Xinlv et al. **Sample preparation and instrumental methods for illicit drugs in environmental and biological samples: A review**. Journal of Chromatography A, v. 1640, p. 461961, 2021.
27. CINELLI, Giuseppe et al. **Rapid analysis of six phthalate esters in wine by ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid–liquid micro-extraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector or gas**

chromatography–ion trap mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, v. 769, p. 72-78, 2013.

28. COLASSO, Camila. **Toxicologia do mercúrio: entenda como funciona.** Blog Chemical Risk, 2020. Disponível em: <https://www.chemicalrisk.com.br/toxicologia-do-mercurio/> Acesso em novembro de 2022.
29. CORTÉS, Enrique et al. **Síntesis del Líquido Iónico bmin+ HSO4-mediante una sola Etapa, para Aplicaciones en Hidrometalurgia**. Información tecnológica, v. 21, n. 3, p. 67-76, 2010.
30. COSTA, Luciano T.; DAMAS, Giane B.; BERTOLDO, Bruno. **Mercúrio: da antiguidade aos dias atuais**. Revista Virtual de Química, v. 6, n. 4, p. 1010-1020, 2014.
31. DA CUNHA, Gabriela Kurz et al. **Thimerosal-containing vaccines and deficit in child development: Population-based study in southern Brazil**. Vaccine, v. 38, n. 9, p. 2216-2220, 2020.
32. DA SILVA PIRES, Vinicius. **Timerosal contido em vacinas e transtornos do espectro autista: revisão de literatura**. SANARE, Revista de Políticas Públicas, v. 17, n. 1, 2018.
33. DADFARNIA, Shayessteh; SHABANI, Ali Mohammad Haji. **Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals - A review**. Analytica Chimica Acta, v. 658, n. 2, p. 107-119, 2010.
34. DE OLIVEIRA, Luiz Henrique et al. **Determinação voltamétrica do antioxidante galato de propila em biodiesel empregando eletrodos de pasta de carbono modificados com líquido iônico.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 6, n. 4, p. 255-266, 2015.
35. DE PINTO, Iohana Pinto; PEDROSO, M. P. **Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações.** Scientia Chromatographica, v. 7, n. 3, p. 183-198, 2015.
36. DEUS, Carlos Roberto Ferreira de et al. **O uso de Timerosal em vacinas, as implicações para o Programa Nacional de Imunizações Brasileiro e a nova Convenção de Minamata sobre o mercúrio**. Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.
37. DÓREA, José G.; FARINA, Marcelo; ROCHA, João BT. **Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury.** Journal of Applied toxicology, v. 33, n. 8, p. 700-711, 2013.
38. DUARTE, Jaqueline da Silva; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; VILLA, Ricardo D. **Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vortex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água**. Química Nova, v. 39, n. 8, p. 925-931, 2016.
39. FARAJZADEH, Mir Ali; MOHAMMAND, Reza Afshar Mogaddam, Abdollahi Aghdam. **Comparision of air agitated liquid liquid microextraction technique and conventional dispensive liquid liquid microextraction for determination os triazole pesticides in aqueous sample by gas chromatography with flame ionization detection**. Journal of Chromatography A, p. 70-78, 2013.
40. FELIX, Ítalo Silva. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de mercúrio em peixe baseado na extração empregando**

banho ultrassônico, geração de vapor frio e análise espectrofotométrica do complexo Hg. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia, 2022.

41. FERREIRA, Fabiana de Fátima et al. **Toxicidade do metilmercúrio (MeHg) sobre a organização das camadas da medula espinhal de embriões de Gallus domesticus.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
42. FRANCISCO, Ana Rita Correia. **Química e toxicidade do mercúrio**. Trabalho Final de Mestrado Integrado, Universidade de Lisboa, 2021.
43. FRANCO, Claudiomar R., et al. **Determination of thiomersal and mercurial residues by photo-degradation and flow injection analysis with luminescence probing using carbon quantum dots prepared from thiourea**. Talanta Open, Elsevier, v. 7, 2023.
44. GOMES, Silvana Vieira Floresta. **Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero Passiflora**. Tese de doutorado, Universidade Federal da Bahia, 2014.
45. HOMMA, Akira et al. **Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, p. 445-458, 2011.
46. HU, Shiwen et al. **Transformation and migration of Hg in a polluted alkaline paddy soil during flooding and drainage processes**. Environmental Pollution, 2024.
47. HU, Shiwen et al. **Transformation and migration of Hg in a polluted alkaline paddy soil during flooding and drainage processes**. Environmental Pollution, 2024.
48. 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.
49. JAZ, Muhammad Umar, et al. **Um estudo sobre os potenciais efeitos reprotóxicos do timerosal em ratos albinos machos**. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 27, n. 10, pág. 2798-2802, 2020.
50. JIANG, Ruifen; OUYANG, Gangfeng. **Fast analytical techniques based on microextraction.** Comprehensive analytical chemistry. Elsevier, p. 85-134, 2015.
51. LAUDATI, Giusy, et al. **Resveratrol treatment reduces the vulnerability of SH-SY5Y cells and cortical neurons overexpressing SOD1-G93A to Thimerosal toxicity through SIRT1/DREAM/PDYN pathway**. NeuroToxicology. v. 71, p. 6-15, 2019.
52. LEITE, Cinthia Carmo. **Estratégias analíticas de pré-concentração e determinação de urânio em amostras ambientais: uma breve revisão**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Recôncavo Da Bahia, 2016.
53. LENARDÃO, Eder João, et al. **"Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa**. Química Nova, v. 26, p. 123-129, 2003.
54. LEONG, Mei-I.; FUH, Ming-Ren; HUANG, Shang-Da. **Beyond dispersive liquid–liquid microextraction.** Journal of Chromatography, v. 1335, p. 2-14, 2014.

55. LIMA, Ana Maria Garcia; DOMINGOS, Lillian Maria Borges. **Validação de método de análise para determinação de mercúrio total em amostras ambientais e biológicas**. PIBIC/CETEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.
56. LIMA, Patrícia Condé de. **Estudo da avaliação do teor de timerosal em vacinas de Influenza tipo A (H1N1) no ano de 2010**. INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2012.
57. LIN, Haiying et al. **Development and validation of the DGT technique using the novel cryogel for measuring dissolved Hg (II) in the estuary**. Marine Environmental Research, v. 182, p. 105773, 2022.
58. LIN, Huaqing et al. **Development of solvent micro-extraction combined with derivatization**. Journal of Chromatography, v. 1296, p. 235-242, 2013.
59. LINO, Thais. **Aplicação de microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade (LDS-DLLME) na identificação de novas substâncias psicoativas em plasma por LC-MS/MS**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2019.
60. LLAVER, Mauricio et al. **Ionic liquids**. Analytical sample preparation with nano- and other high-performance materiais, Elsevier, p. 427-451, 2021.
61. LU, Yang; ZHU, Yan. **Determination of chlorobenzenes in textiles by pressurized hot water extraction followed by vortex-assisted liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1319, p. 27-34, 2013.
62. MALTEZ, Heloisa França et al. **Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em sistemas de pré-concentração empregando extração em fase sólida e microextração com gota única para determinação de metais-traço em amostras aquosas ambientais**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
63. MARIANO, Edson Soares Stellet. **Efeitos da Aplicação da Levedura Yarrowia Lipolytica na Planta Aquática Salvinia Auriculata Aublet sob Estresse por Mercúrio**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Do Norte Fluminense, 2022.
64. MARTINIANO, Lorena Carvalho et al. **New spectrophotometric method for the determination of Hg (II) in fish samples.** Food Science and Technology, v. 28, p. 373-379, 2008.
65. MARTINS, Manoel Leonardo et al. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações**. Instituto Internacional de Cromatografia, v. 4, p. 35-51, 2012.
66. MENG, Y.; ANDERSON, J. L. **Use of Unconventional Solvents for Sample Preparation in Environmental Analysis**. University of Toledo, Toledo, OH, USA, Elsevier, 2012.
67. MICARONI, Regina Clélia da Costa Mesquita; BUENO, Maria Izabel Maretti Silveira; JARDIM, Wilson de Figueiredo. **Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte**. Química Nova, v. 23, p. 487-495, 2000.
68. MINEA, Alina Adriana. **Overview of ionic liquids as candidates for new heat transfer fluids.** International Journal of Thermophysics, v. 41, n. 11, p. 151, 2020.
69. MONTEVECCHI, Giuseppe et al. **Determination of phthalate esters in distillates by ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid micro-**

extraction (USVADLLME) coupled with gas chromatography/mass spectrometry. Food chemistry, v. 221, p. 1354-1360, 2017.
70. MOREIRA, Bruna Juliana; YOKOYA, Jennifer Michiko Chauca; GAITANI, Cristiane Masetto de. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas**. Scientia Chromatographica, v. 3, n. 3, p. 186-204, 2014.
71. OJEDA, C. Bosch; ROJAS, F. Sánchez. **Vortex-assisted liquid–liquid microextraction (VALLME): The latest applications**. Chromatographia, v. 81, n. 1, p. 89-103, 2018.
72. OLIVEIRA, Anderson Rodrigo Moraes de et al. **Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos.** Química Nova, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.
73. OLIVEIRA, Bernadete Ferreira et al. **Química Analítica Verde: Contribuições para a Agenda Ambiental Puc-Rio**. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica Do Rio De Janeiro, 2012
74. PAPADOPOULOU, Aikaterini et al. **Fast screening of perfluorooctane sulfonate in water using vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry.** Analytica chimica acta, v. 691, n. 1-2, p. 56-61, 2011.
75. PEREZ, Mary Ângela Fávaro. **Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante**. Boletim de Tecnologia e desenvolvimento de embalagens, v. 22, n. 3, p. 1-9, 2010.
76. PICÓ, Y. **Recent advances in sample preparation for pesticide analysis**. Elsevier, University of Valencia, Burjassot, Valencia, p. 569-590, 2012.
77. QUEIROZ, Sonia CN; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel CSF. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** Química Nova, v. 24, p. 68-76, 2001.
78. RALPH, Jolyon e YEE, Lan. Hudson Institute of Mineralogy dba Mindat.org Disponivel em: <https://www.mindat.org/a/hudsoninstituteofmineralogy> Acesso dezembro 2023.
79. REGUEIRO, Jorge et al. **Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters**. Journal of Chromatography A, v. 1190, n. 1-2, p. 27-38, 2008.
80. REZAE, Mohammad et al. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction**. Journal Chromatography A, v. 1116, p. 1-9, 2006.
81. RODRÍGUEZ, José M. Bayas; GARCÍA-BASTEIRO, Alberto L.; PINILLA, Guillermo Mena. **Problemática de la vacunación contra la gripe A en España**. Archivos de Bronconeumología, v. 46, p. 32-38, 2010.
82. SALES, Jeneson Medeiros de Aquino. **Modelagem e dimensionamento de um sistema de extração por solvente de cromo trivalente.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2019.
83. SANTOS, Cláudia Maria Prado dos et al. **Meio Ambiente: Impactos Ambientais.** Scientia Agraria Paranaensis, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2016.
84. SANTOS, Mayara Costa Dos. **Microextração líquido-líquido dispersiva aplicada à extração e pré-concentração de cobre em amostras ambientais**

da região de Mata Atlântica do Sul da Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, 2016.

85. SCHLATHAUER, Maria et al. **Sustainable and reagent-free mercury trace determination in natural waters using nanogold dipsticks.** Microchemical Journal, v. 147, p. 253-262, 2019.
86. SECA, José. **Mercúrio no Oceano Austral.** Site: Aspecs Portugal, 2016. Disponível em: <https://apecsportugal.wixsite.com/apecsportugal/post/merc%C3%BArio-no-oceano-austral> Acesso em 20 de março de 2023
87. SHAMSHINA, Julia L et al. **Ionic liquids in Pharmaceutical industry. Green Techniques for organic Synthesis and Medicinal Chemistry**. Wiley Online Library, p. 539-577, 2018.
88. SILVA, Annita Ingrid Alves; DE SIQUEIRA, Julio Gomes; DE SIQUEIRA, Celia Gomes. **Vaccines: history, denialism, fake news, and Covid-19 in Brazil today**. Brazilian Journal of Development, v. 8, n. 5, p. 35200-35217, 2022.
89. SILVA, Thiago Barcellos da. **Líquidos iônicos – alguns aspectos sobre as propriedades, preparação e aplicação**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Pelotas, 2004
90. SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry**. Fort Worth: Saunders College Pub., 2006.
91. SOARES, Liliane Catone et al. **Mercury quantification in soils using thermal desorption and atomic absorption spectrometry: proposal for an alternative method of analysis**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 39, n. 4, p. 1100-1111, 2015.
92. SOUSA, Rafael Arromba, et al. **Preparação de amostras para análise elementar**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.
93. STAUN, C. et al. **Geochemical speciation of mercury in bauxite**. Applied Geochemistry, v. 93, p. 30-35, 2018.
94. STELLA, Rita. **Conservante utilizado em vacinas tem potencial tóxico aos rins, mostram análises**. Jornal USP, 2016. Disponível em: <https://jornal.usp.br> Acesso 27 Jun. 2020.
95. SU, Yi-Song; JEN, Jen-Fon. **Determination of organophosphorous pesticides in water using in-syringe ultrasound-assisted emulsification and gas chromatography with electron-capture detection**. Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 31, p. 5043-5049, 2010.
96. SULIMAN, Mohammed Altahir et al. **Microextraction and its application for petroleum and crude oil samples**. Journal of Chromatography A, p. 461795, 2020.
97. TALL, Amidou et al. **Photoluminescent nanoprobes based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines**. Talanta. v. 221, 2021.
98. TRACEY, Matthew P.; KOIDE, Kazunori. **Development of a Sustainable Enrichment Strategy for Quantification of Mercury Ions in Complex Samples at the Sub-Parts per Billion Level**. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 53, n. 38, p. 14565-14570, 2014.
99. TRUJILLO-RODRÍGUEZ, María J. et al. **Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 51, p. 87-106, 2013.
100. UJAZ, M. U. et al. **Efeitos toxicológicos do timerosal no rim de rato: um**

estudo histológico e bioquímico. Brazilian Journal of Biology, v. 83, p. 1-9, 2023.

101. VAN ROOYEN, D. et al. **Bioacumulação e transferência trófica de mercúrio total através das cadeias alimentares aquáticas de um sistema de zonas húmidas subtropicais africanas**. Ciência do Meio Ambiente Total, v. 889, p. 164210, 2023.
102. WANG, Jiaxin et al**. A review on mercury in natural gas and its condensate: Accurate characterization and efficient control technologies for total and speciated mercury.** Fuel, v. 355, p. 129526, 2024.
103. XIAO-HUAN, Zang et al. **Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique**. Chinese Journal of Analytical Chemistry, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.
104. YANG, Zhong-Hua et al. **Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction**. Journal of Chromatography A, v. 1218, n. 40, p. 7071-7077, 2011.
105. ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, Agnieszka. **Development of a dispersive liquid–liquid microextraction procedure for biodegradation studies on nonylphenol propoxylates under aerobic conditions**. Journal of Surfactants and Detergents, v. 17, p. 111-120, 2014.
106. ZIMMERMANN, Luciana T. et al. **Comparative study on methyl-and ethylmercury-induced toxicity in C_6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake**. Neurotoxicology, v. 38, p. 1-8, 2013.

7. ARTIGO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO NA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM VACINAS

Caiene de Jesus Oliveira Rodrigues[a], Anderson Santos Souza[*a]
[a]Universidade Federal da Bahia, *campus Anísio Texeira, 45.029-094, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil*

RESUMO

Os métodos de miniaturização têm alcançado destaque nas configurações dos métodos analíticos, com o objetivo principal diminuir o uso de reagentes nocivos lançados ao meio ambiente, além também do menor tempo de extração. Neste trabalho foi desenvolvido um método baseado na microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (USDMLLE) para a determinação de mercúrio por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis. O procedimento baseia-se na utilização da mistura do Líquido Iônico, hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio [C_6MIM][PF_6], como solvente extrator, a ditizona como agente complexante e radiação ultrassônica como dispersor em uma solução aquosa contendo mercúrio. Após a turvação, a mistura é centrifugada para a separação das fases. Posteriormente, a fase enriquecida é recolhida e o teor de mercúrio é dosado por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis. O pH da solução-tampão, a concentração do complexante, o volume do líquido iônico foram as variáveis otimizadas utilizando estratégia multivariada. Os limites de detecção e quantificação, calculados sob condições otimizadas foram, respectivamente 0,031 $\mu.L^{-1}$ e 0,103 $\mu.L^{-1}$. O fator de enriquecimento obtido foi de 403 vezes. O procedimento foi aplicado à determinação de mercúrio em amostras de vacinas de difteria, tétano, coqueluche – DTP e hepatites A e B que utilizam timerosal como conservantes. O método proposto é simples, rápido, eficiente e não utiliza solventes orgânicos no processo de extração líquido-líquido.

Palavra Chave: Mercúrio, USDMLLE, Líquido iônico.

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD BASED ON LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOR DETERMINATION OF MERCURY IN VACCINES

Caiene de Jesus Oliveira Rodrigues[a], Anderson Santos Souza[*a]
[a]Universidade Federal da Bahia, *campus Anísio Texeira, 45.029-094, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil*

ABSTRACT

Miniaturization methods have achieved prominence in the configurations of analytical methods, with the main objective of reducing the use of harmful reagents released into the environment, in addition to reducing extraction time. In this work, a method based on ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USDMLLE) was developed for the determination of mercury by UV-Vis molecular absorption spectrophotometry. The procedure is based on the use of a mixture of the Ionic Liquid, 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C_6MIM][PF_6], as an extracting solvent, dithizone as a complexing agent and ultrasonic radiation as a disperser in an aqueous solution containing mercury. After turbidity, the mixture is centrifuged to separate the phases. Subsequently, the enriched phase is collected and the mercury content is measured by UV-Vis molecular absorption spectrophotometry. The pH of the buffer solution, the concentration of the complexing agent, and the volume of the ionic liquid were the variables optimized using a multivariate strategy. The detection and quantification limits, calculated under optimized conditions, were 0,031 $\mu.L^{-1}$ and 0,103 $\mu.L^{-1}$, respectively. The enrichment factor obtained was 403 times. The procedure was applied to the determination of mercury in samples of diphtheria, tetanus, whooping cough – DTP and hepatitis A and B vaccines that use thimerosal as preservatives. The proposed method is simple, fast, efficient and does not use organic solvents in the liquid-liquid extraction process.

Keyword: Mercury, USDMLLE, Ionic Liquid.

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no desenvolvimento da instrumentação em química analítica, a maioria das instrumentações ainda apresentam um custo elevado e limite de detecção e quantificação relativamente altos que, por sua vez, limita a determinação de analitos a nível de traço. Além de que, a maioria das técnicas instrumentais existentes não permitem análises de amostras em sua forma original, fazendo necessário o preparo de amostras (MENG e ANDERSON, 2012). Por sua vez, os procedimentos de preparo da amostra não são simples e podem incluir várias etapas: solubilização, extração, isolamento e/ou pré-concentração por meio de extração de compostos de interesse da matriz (PICÓ, 2012). técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a determinação dos componentes de interesse seja possível usando uma técnica analítica para qual o analito, anteriormente, estivesse numa concentração abaixo do limite de detecção da técnica. Uma das técnicas mais utilizadas para extração e pré-concentração do analito é a Extração Líquido-Líquido – ELL, uma operação unitária que consiste na distribuição ou partição de um ou mais solutos entre duas fases líquidas nas quais é diferentemente solúvel. Apesar de sua eficiência na remoção de interferentes e na pré-concentração de analitos, o processo de extração líquido-líquido é responsável pela geração de grandes volumes de resíduos de solventes orgânicos, o que causa grandes impactos ambientais e também envolve repetições do processor que estão associadas com as perdas de analito e ocorrência de contaminação (LEITE, 2016). Para minimizar os efeitos de contaminação, perda do analito e até diminuir os impactos ambientais, o desenvolvimento de procedimentos miniaturizados tem sido proposto. Diante disso, este trabalho se preocupou em desenvolver um novo método de quantificação de mercúrio, que usou como princípio a técnica analítica, microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), que por sua vez, será aplicado em amostra de vacinas de difteria, tétano, coqueluche e hepatites A e B que utilizam timerosal como conservantes. Neste método houve substituição dos solventes orgânicos, extrator e dispersor, pelo líquido iônico e pela força mecânica associada a energia ultrassônica, respectivamente, proporcionando ao método baixo impacto ambiental e ainda contribuir com uma nova forma de

controle do teor de mercúrio presente nas vacinas. Visto que o mercúrio é alvo de muitos estudos por sua toxicidade (BISINOT *et al.*, 2006). Para a análise do mercúrio foi usado o aparelho comumente encontrado nos laboratórios de química analítica o espectrofotômetro de absorção molecular, que apresenta rapidez, baixo custo e de fácil manuseio em seu sistema, comparado a outros aparelhos usados na quantificação do mercúrio. Apesar de muitos procedimentos de microextração por solvente para determinação de mercúrio terem sido relatados, o número de procedimentos associados à detecção de UV-Vis também é bastante limitado. Desse modo, com o emprego desse método é possível reduzir erros resultantes dos procedimentos analíticos com muitas etapas, diminuir impactos ao meio ambiente e riscos ao operador.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentação

Uma balança analítica de precisão da marca Shimadzu®, modelo AY220 foi usada em todos os procedimentos de pesagem. Para pipetagem das soluções foram utilizados micropipetadores e pipetadores automáticos com capacidade variável de 10 a 100 µL, 100 a 1000 µL e 1000 a 5000 µL (Rainin® Instrument, modelo CLASSIC™). Para a digestão das amostras de vacinas, foi utilizado bomba de digestão ácida (Frascos de Teflon®/PROVECTO ANALÍTICA) e um forno digestor (DGT 100 Plus) e mantidas em um tubo falcon com capacidade de 20 ml. Para etapa de dispersão foi utilizado um aparelho ultrassônico da marca Elma®, modelo Elmasonic P. Na etapa de separação das fases, durante o procedimento de DLLME, usou uma centrífuga analítica (Hettich®, modelo Rotofix 32 A) com capacidade para 32 tubos de 10 ml e velocidade máxima de rotação de 4000 rpm. Para medida do pH foi utilizado um pHmetro digital (DEL-LAB, modelo DLA-PH). As medidas foram feitas empregando um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe (Shimadzu®, modelo UV-1800), equipado com duplo monocromador e duas microcubetas de quartzo gêmeas com 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 750 µL.

2.2 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: peróxido de hidrogênio (Emsure®), ácido nítrico, etanol, Liquido iônico (Sigma-Aldrich®), ditizona (Cromoline), solução padrão de mercúrio (SpecSol®; Dinâmica®), fosfato de potássio (ISOFAR; Vetec) e fosfato de sódio (FMaia). Para o preparo de soluções foi utilizado água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação em aparelho Milli-Q®. As vidrarias usadas, e outros materiais, foram descontaminados por imersão em uma solução de HNO_3 10% (v/v) (Sigma-Aldrich®) durante 24h e, posteriormente, enxaguados com água ultrapura.

As soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de soluções certificadas de 1000 $mg.L^{-1}$ de Hg, Fe, Pb e Cu (FLUKA-TraceCERT®) em água ultrapura. A Ditizona (Cromoline), utilizada como agente quelante para complexação do Hg, foi preparado com etanol absoluto (Sigma-Aldrich®), na concentração molar de $1,3 \times 10^{-4}$ $mol.L^{-1}$. As soluções-tampão, acetato de sódio pH 3-5, fosfato pH 6 - 7,5, glicina pH 8, Tris (tris-(hidroximetil) amino metano) pH 9 e bicarbonato pH 10 - 11, foram preparadas medindo a massa do reagente na concentração de 0,1 mol L^{-1}. Após a dissolução em água ultrapurificada, o pH foi ajustado ao valor desejado com soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L^{-1} e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 $mol.L^{-1}$. Os volumes então foram completados em balões volumétricos com água ultrapura.

2.3 Amostra

As amostras de vacinas multidoses de Hepatite B, Caxumba + Difteria, Influenza, Febre Amarela foram cedidas pela secretária de saúde do município de Itambé/BA, após campanha vacinal de 2021. As amostras cedidas corresponderam a frascos que ultrapassaram o prazo de validade após a sua abertura. Foram coletadas 42 amostras de vacinas, sendo 6 de hepatite, 16 de caxumba, 7 influenza, 7 difteria + coqueluche e 6 febre amarela. Os frascos foram esterilizados com álcool 70%, seco, separados, embalados e identificados, conforme nome de cada vacina em sacolas plásticas e mantidas sob refrigeração no congelador do

Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal da Bahia – UFBA em Vitória da Conquista até a digestão.

2.4 Tratamento da amostra

Dois mililitros de cada uma das amostras de vacinas de Hepatite B, Caxumba + Difteria, Influenza, Febre Amarela foram digeridas em bomba de digestão ácida Parr®, com adição de 2ml de ácido nítrico 65% (HNO_3) e 2ml de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARCELOS, 2015). O frasco de digestão foi introduzido no micro-ondas de digestão a 250% da potência, durante 10 minutos com a finalidade de libertar o analito da matriz da amostra, uma vez que o mercúrio se apresenta ligado a um composto orgânico, de cadeia etil. A cada ciclo, o frasco foi deixado em repouso por aproximadamente 10 minutos para alcançar a temperatura ambiente. Após a mineralização, as amostras foram ajustadas para o pH 7,5 com a adição NaOH 25%, avolumadas para 5 ml e armazenadas até o momento da análise.

2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento e otimização do método analítico foram utilizadas duas metodologias: método univariado e o método multivariado. Na primeira, uma variável é otimizada por vez enquanto que as demais são mantidas constantes. Possui a vantagem de se ter uma interpretação mais simples dos resultados, no entanto requer um maior gasto de reagentes, maiores ensaios analíticos, demanda de tempo, e não considera as interações entre os pontos analisados. Na segunda, todas as variáveis são otimizadas simultaneamente. Os métodos multivariados de otimização são mais rápidos, econômicos e efetivos apesar de possuírem uma interpretação mais complexa (JESUS, 2009; SANTOS *et al.*, 2003).

2.5.1 Planejamento univariado

O planejamento univariado foi utilizado para realizar a escolha do solvente extrator (líquido iônico ou álcool graxo), do mecanismo de dispersão do solvente extrator, do reagente complexante e do tempo de banho de gelo. A escolha do solvente extrator foi realizada avaliando a eficiência de dois líquidos iônicos e de dois alcoóis graxos observando qual apresentava melhor resposta analítica e facilidade operacional para o sistema. Os líquidos iônicos utilizados no estudo foram os hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio - $[C_4MIM][PF_6]$ e o hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio - $[C_6MIM][PF_6]$ e os alcoóis graxos foram undecanol e octanol. Como elemento dispersor, foram avaliados a força mecânica do ultrassom, a força mecânica do vórtex e a agitação manual. A substituição do uso de um solvente extrator pela força mecânica teve o objetivo de diminuir o uso de solventes tóxicos no método

Considerou como parâmetros fixos, no procedimento de pré-concentração, pH 7,5, 275 µL de ditizona 0,001% (m/v), volume do solvente extrator de 110 µL, dispersão em banho ultrassônico com T = 70°C durante 5 min e turvação em banho de gelo durante 8 min, T = 0°C.

2.6 Planejamento Multivariado

2.6.1 Planejamento fatorial de dois níveis

Foi realizado planejamento fatorial completo de dois níveis para três fatores. As variáveis escolhidas foram pH, volume do agente complexante, volume do líquido iônico. Triplicata do ponto central foi obtido para cálculo do erro experimental. O tratamento dos dados foi realizado através do programa *Statistica*®, versão 10.0 (*Statsoft*), e *Excel Office* 2013, da *Microsoft*®.

2.6.2 Otimização

Após a etapa do planejamento fatorial foi realizado a otimização, usando a matriz Box-Behnken para três variáveis para determinar os valores críticos das

variáveis. O tratamento dos dados foi realizado através do programa *Statistica*®, versão 10.0 (*Statsoft*), e *Excel Office* 2013, da *Microsoft*®.

2.7 Procedimento de pré-concentração

A pré-concentração foi realizada em triplicatas, em tubo Falcon com capacidade de 10 ml, onde foi adicionado 2 ml de solução-tampão fosfato (0,1 $mol.L^{-1}$) pH 7,5; 1,5 ml de solução estoque de Hg (1 $\mu g.L^{-1}$); 275 ml de ditizona usado como reagente complexante ($1,3.10^{-4}$ $mol.L^{-1}$); 110 ele de Líquido iônico (Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio $[C_6MIM][PF_6]$) e avolumado até 5 ml com água ultrapura. Com o tubo fechado, cada triplicata foi, simultaneamente, agitada manualmente durante 95 segundos, seguida de banho ultrassônico, com potência de 85%, 1.024 kWh e temperatura de 70°C, no tempo de 5 min. A etapa seguinte foi o banho de gelo durante 8 min com temperatura igual a 0°C. Para a separação das fases, houve a centrifugação, que teve duração de 10 minutos a 4000 rpm. Em seguida, a fase aquosa foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável e, por fim, à fase orgânica foi adicionado 250 µL de etanol. O pH da solução-tampão, a concentração do complexante, o volume do líquido iônico, variou de acordo com o nível utilizado no planejamento experimental, otimização e teste de robustez. A combinação do tempo e temperatura para os banhos de gelo e ultrassônico, da agitação manual, tempo e rpm da centrifuga, que apresentaram melhor resposta a DLLME, foram escolhidos para o método.

As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, no comprimento de onda de 530 nm, com base no valor do pico da varredura do complexo Dtz-Hg. Os dados foram analisados em triplicatas e apresentados em forma de média e desvio-padrão.

2.8 Validação do método

Para a validação do método desenvolvido, parâmetros que envolvem linearidade, fator de enriquecimento, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, robustez e interferentes, foram utilizados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção do solvente extrator

Fatores que interferem na recuperação do analito foram avaliados como parâmetros na eficiência da extração. Neste novo método, foi proposta a substituição de solventes orgânicos, extrator e dispersor, por liquido iônico e força mecânica, respectivamente. O solvente extrator, por exemplo, quando associado com a dispersão forma gotas finas, com a transferência de massa do analito da fase aquosa para as gotas, momento em que ocorre a extração (FERREIRA, 2016).

Desta forma, foi realizada a escolha do líquido iônico, um reagente baseado nos princípios da química verde, ambientalmente mais limpo e seletivo (BERTOTI e FERREIRA, 2009). O conceito de química verde, é conhecido como química sustentável, que busca desenvolver tecnologias limpas e processos que gerem menor poluição. Pesando nisso, escolher o líquido iônico para este método, se deve às suas diversas propriedades atrativas, como: baixa pressão de vapor, estabilidade térmica e química, baixa inflamabilidade, alta condutividade iônica, capacidade de atuarem como catalisadores, densidade maior que a água e solventes orgânicos, baixa solubilidade em água e de poderem serem reciclados e reutilizados (VASCONCELOS e PIZZUTI, 2012).

Destas propriedades citadas acima a que são mais importantes para os processos de extração líquido-líquido são a volatilidade, densidade, solubilidade. Dentre os LI mais usados em DLLME destacam-se os que possuem o cátion dialquilimidazólio. Por essa razão, para este trabalho foram escolhidos os líquidos iônicos Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio $[C_4MIM][PF_6]$ e

Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio [C_6MIM][PF_6]. Estes líquidos iônicos, são imiscíveis em amostras aquosas, apresentam em sua estrutura um ânion inorgânico (PF_6) e um cátion orgânico (íons dialquilimidazólio) que, de acordo com o trabalho realizado por Flinger *et al.,* (2014), este cátion, que é derivado do anel piridino e imidazólio, apresenta uma grande influência sobre a extração de mercúrio, resultando na alta capacidade de seletividade deste metal (ALMEIDA, 2019; VASCONCELOS e PIZZUTI, 2012).

Durante os experimentos observou-se que o líquido [C_4MIM][PF_6], que é o menos viscoso e mais solúvel dos líquidos estudados, em água por causa da menor cadeia carbônica, não formou a gota enriquecida com o metal após a centrifugação. Aparentemente, o LI diluiu na fase aquosa, desta forma não realizada a leitura, já que, a gota é a fase de interesse para a leitura no espectrofotômetro. O [C_6MIM][PF_6] foi o reagente que apresentou melhor eficiência de extração. A principal razão é a maior solubilidade do [C_4MIM][PF_6] em água do que a do [C_6MIM][PF_6] (1,88 e 0,75 g/100 ml, respectivamente) e também sua menor densidade (450 e 586 cP a 25 °C, respectivamente) (HUDDLESTON *et al*, 2001; LIU *et al*., 2003).

A fim de avaliar a eficiência de extração do LI, foi feito testes comparativos usando álcoois graxos como o octanol e o undecanol, comumente usados em técnicas de microextração. Ao analisar os dados da figura 1, podemos observar que o undecanol teve melhor pico de absorção, contudo, não foi usado este álcool graxo, visto que, a metodologia proposta tem como objetivo a substituição de solventes orgânicos, por solventes de menor toxicidade, buscando seguir um dos princípio da Química Verde.

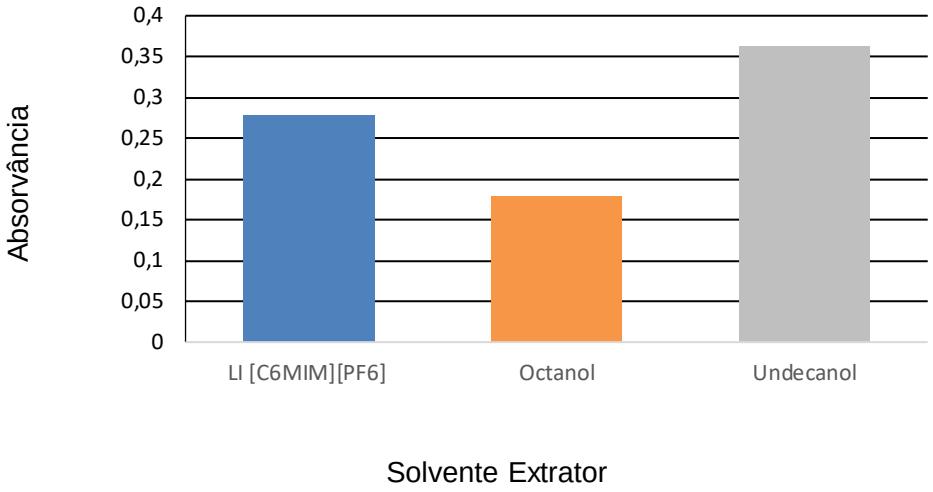

Figura 1: Resultado da análise eficiência de extração do liquido iônico com álcoois graxos.

3.2 Avaliação do sistema de dispersor

Nesta técnica o solvente dispersor foi substituído por força mecânica. Para isso, foi avaliado o comportamento do banho Maria, agitação manual, vórtex, ultrassom, agitação manual associada ao vórtex e agitação manual associada ao ultrassom (Figura 2). De acordo com Duarte *et al.*, (2016), o uso de força mecânica como a agitação em vórtex e a radiação ultrassônica contribuem para o aumento da superfície de contato entre o solvente extrator e a fase aquosa, porque o processo de dispersão é intensificado. O resultado disso é a partição dos compostos de interesse entre as duas fases imiscíveis. Ocorre o aumento da eficiência da extração, que está diretamente relacionada com o tamanho das gotículas de solvente dispersas, pois, quanto menor for o tamanho das gotículas, maior a área interfacial entre a água e o solvente extrator e maior a eficiência de extração.

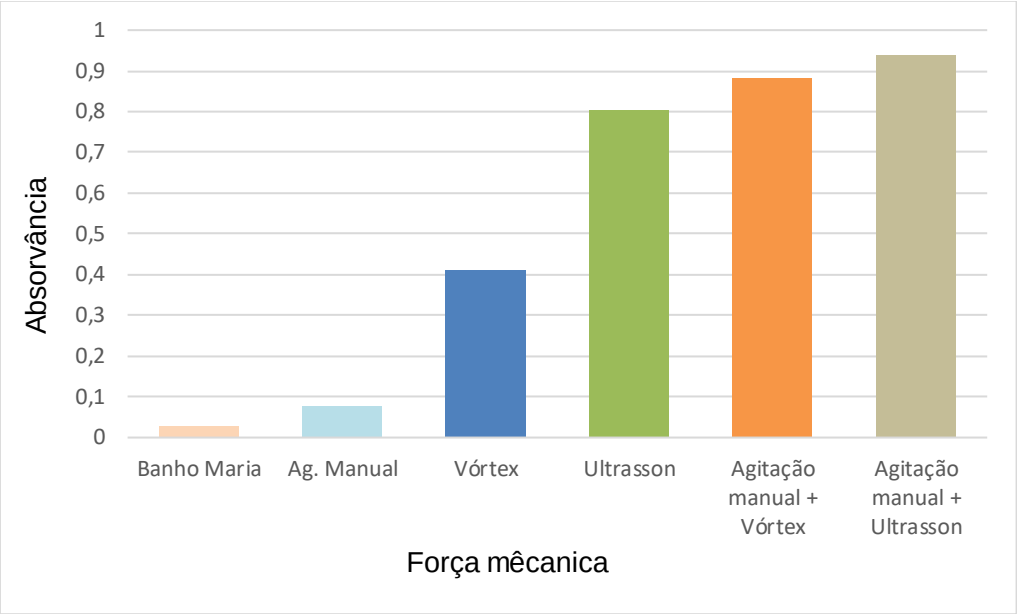

Figura 2: Comparação de força mecânica para dispersão.

A avaliação do banho Maria e agitação manual isolada foram os tipos de dispersão que teve a menor resposta analítica, contudo, apresentou precisão em torno dos dados obtidos, com desvio padrão de 0,0098 e 0,01, respectivamente.

A dispersão por vórtex ocorre através da agitação e homogeneização de substância, quando um movimento circular cria um vórtice no líquido contido em tubos pequenos. A depender da velocidade de rotação, o redemoinho de fluidos imiscíveis, eventualmente, leva à quebra de uma das duas fases em minúsculas gotículas (SOUSA *et al.*, 2013). Apesar da eficiencia na agitação por vótex relatada, por exemplo na avaliação no trabalho de Fernades *et al.*, (2015), o uso do vórtex, como força de dispersão, apresentou resposta analítica baixa neste trabalho, quando comparadas com as demais. Ao final da dispersão com o vórtex, gotas do LI estavam dispersas na parede do tubo, fato que pode ser justificado para a menor resposta analítica, visto que a eficiência da extração é diretamente proporcional a superfície de contato entre os dois líquidos. Contudo, ao associar a dispersão com à agitação manual houve um aumento significativo do sinal analítico, como pode ser observado na figura 4.

No trabalho de Duarte *et al.*, (2016), o vórtex potencializou a dispersão quando usado como pré-agitação para a etapa seguinte, o ultrassom. No entanto, em nosso método, a agitação manual como pré-agitação, seguido do ultrassom

apresentou melhor sinal analítico. Após a agitação manual foi possível observar a formação de pequenas gotas pequenas dispersas pela solução. Essas gotas, quando foram submetidas as ondas ultrassônicas, eclodiam pela solução aquosa e se dividiam em outras super finas também dispersas na solução (Figura 3). Visto que, o principal efeito do ultrassom é a fragmentação do solvente, o que, consequentemente, aumenta a superfície de contato entre os dois líquidos. Desta forma, ao combinar os benefícios da microextração com a agitação manual associada ao uso ondas ultrassônicas foi possível desenvolver uma técnica eficiente de pré-concentração para o mercúrio, este sendo o fator utilizado (FERREIRA, 2016).

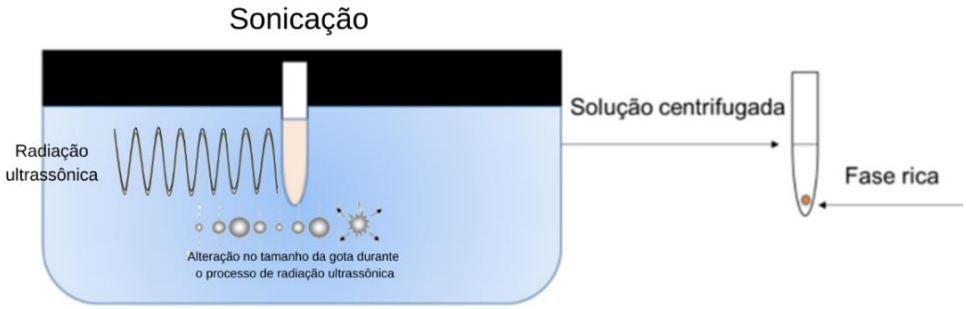

Figura 3: Ilustração da dispersão da gota assistida por ultrassom

Fonte: Ferreira, 2016 (Adaptado)

Foi avaliada também a influência da temperatura da água no banho ultrassônico, na extração do mercúrio. Analisando o gráfico da figura 4, é possível observar que a absorbância aumenta à medida que a temperatura sobe de 55°C a 70°C, atingindo um pico em 70°C. após esse ponto, há uma queda na absorbância, com valores mais baixos para as temperaturas de 75°C e 80°C. Esses resultados sugerem que a eficiência da extração e pré-concentração do complexo de mercúrio é maior em 70°C. Acima dessa temperatura a eficiência diminui, possivelmente devido a degradação do complexo de mercúrio. Desta forma, a temperatura de 70°C foi a escolhida para o desenvolvimento do método.

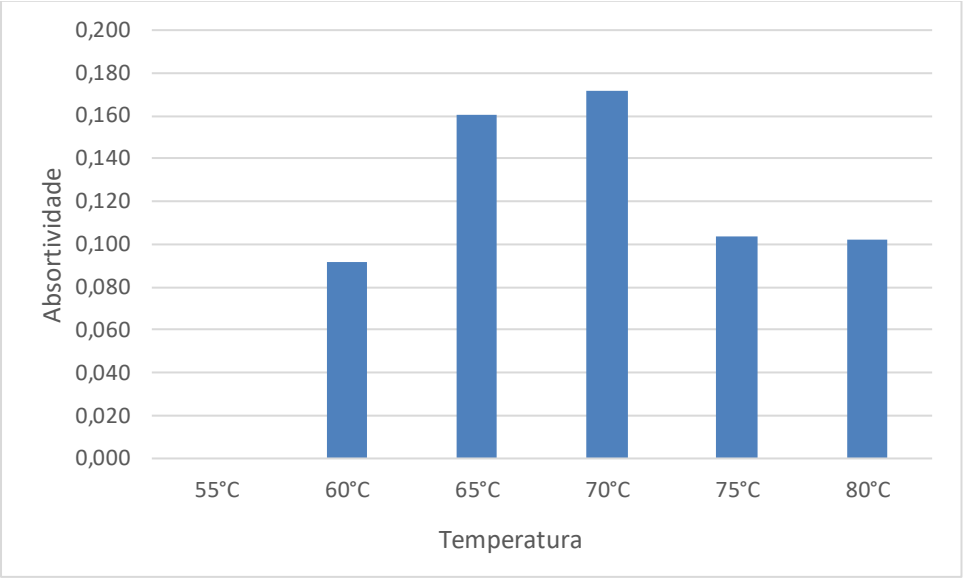

Figura 4: Analise da temperatura na absorvância.

3.3 Avaliação do reagente complexante

A escolha do agente complexante é fundamental para a eficiência da extração, visto que, os agentes complexantes que são transportadores de íons metálicos, dependem da variação da concentração hidrogeniônica do meio reacional. Assim, o controle de pH é um fator importante durante o trabalho analítico (ANDRADE, 2017). Desta forma, foi avaliado o comportamento dos reagentes complexantes 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR), 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) e 4-(2- tiazolilazo)-resorcinol (TAR), comumente usados em extração de íons metálicos, em meio tamponante nas faixas de pH entre 6 a 9, por ser provável para complexação do Hg^{2+} (Figura 6) (GONDIM, 2015).

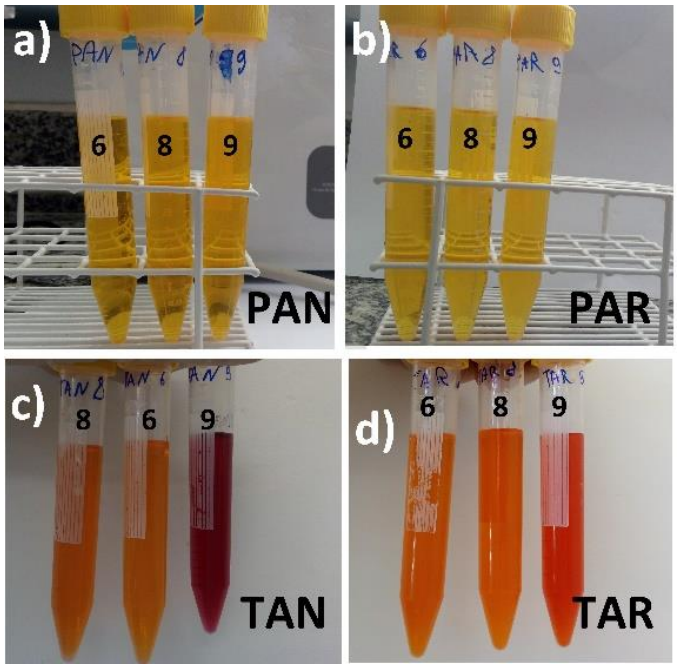

Figura 6: Influencia do pH no meio reacional.
a) complexante PAN. b) complexante PAR. c) complexante TAN. d) complexante TAR

Como mencionado, o pH da fase aquosa é um fator que influenciam diretamente na sensibilidade e formação do complexo. O complexo formado pode ser observado, também, por meio de uma mudança de coloração responsável na absorbância. A cor do complexo depende basicamente da natureza do íon metálico, do número de elétrons nos orbitais d, da disposição espacial dos ligantes em torno do íon metálico (por exemplo, os isômeros geométricos podem apresentar colorações diferentes) e da natureza dos ligantes (GODIN, 2016; SKOOG *et al.*, 2006). Em nosso estudo os complexos TAN E TAR variou a coloração nas diferentes faixas de pH, apresentados na figura 6, o que indica a complexação de metais.

Os valores dos pHs obtidos na análise de capacidade tamponante estão apresentados na tabela 1. A solução tampão Tris, pH = 8, foi a faixa escolhida para o seguimento do estudo, este sendo o tampão que aparentou menor variação.

Tabela 1: Valores de pH obtidos para a análise da capacidade tamponante de diferentes tampões

	Fosfato monopotássio (6,0)	Tris (8,0)	Tetraborato de sódio (9,0)
PAN	7,15	8,03	10,32
PAR	7,26	8,07	10,43
TAN	7,16	8,01	10,37
TAR	7,20	8,10	10,30

Foi avaliado também o comportamento da solubilidade em água dos complexantes. A figura 7 mostra que os complexantes que apresentaram melhor solubilidade, nos tampões usados, foram o PAR e o TAR. Um fator que pode ter levado em consideração para a precipitação dos complexantes PAN e TAN, é que são complexantes que apresentam baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos (RUY, 2007).

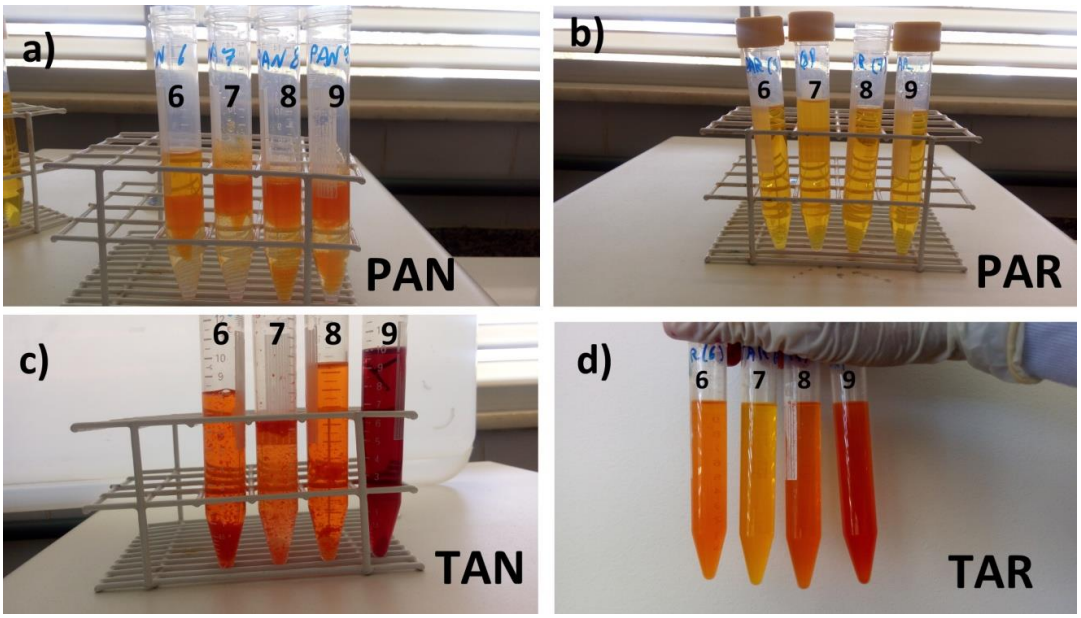

Figura 7: Analise de solubilidade em água das soluções tampão

Deste modo, a fim de minimizar o uso de solventes orgânicos, foi estudada as proporções de 20/80, 40/60, 60/40, 80/20 álcool/água. A figura 8, apresenta a

solubilidade nas proporções estudas, nela é possível observar que a melhor proporção foi 80/20 álcool/água, que já era esperado, por ser tratar do álcool ser um solvente orgânico em maior quantidade adicionada.

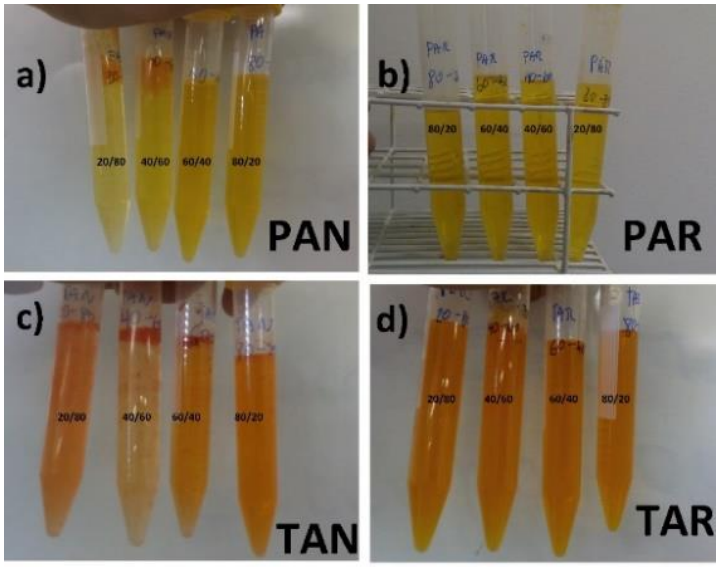

Figura 8: Solubilidade de complexantes em diferentes proporções de álcool/água. a) complexante PAN. b) complexante PAR. c) complexante TAN. d) complexante TAR.

Assim, a partir dos resultados, o PAN foi o complexante escolhido para a continuidade do estudo. De acordo com Andrade, (2017), o PAN forma complexos estáveis com íons metálicos e apresenta um valor de coeficiente de absortividade relativamente alto aumentando a sensibilidade analítica, mesmo na complexação a nível de traços. Apesar das excelentes referências do PAN, os sinais analíticos apresentados na etapa de otimização foram insuficientes, com muitos ruídos e instáveis.

Para melhorar a resposta analítica, foi analisado outro complexante, a difeniltiocarbazona, conhecida como ditizona, um sólido escuro e agente de ligação a qual, tem sido amplamente utilizado para determinação espectrofotométrica de Hg^{2+} em amostras biológicas e industriais (SILVA, 2022).

O seu preparo foi baseado no procedimento descrito no manual de método de Análise de Solo da Embrapa, (2017). Quando a ditizona é dissolvida em tetracloreto de carbono ou clorofórmio, por exemplo, apresenta coloração verde escuro. Enquanto, a dissolução ocorre em solventes polares são amarelados, o que

é comprovado por nosso estudo, que predominou a cor amarelada, na solubilização com álcool (Figura 9). O álcool foi escolhido, por gerar menos resíduos que causa impactos ambientais. Visto que, a proposta deste trabalho é ser livre do uso de solventes orgânicos.

Figura 9: Ditizona diluída em álcool.

De acordo com Barbosa (2001), a ditizona demostrou ser sensível na extração por solvente de íons metálicos, principalmente os metais de transição, na concentração a nível de traços, fato apresentado no trabalho de Curry e Menon que conseguiram determinar traços de mercúrio, na ordem de 0,2 microgramas (MAZZILLI *et al.*, 2011). Apesar disso, não é um reagente específico e nem seletivo, mas com o controle do pH é possível conseguir uma sensibilidade considerável. Assim, foi realizado o teste de pH nas faixas entre 4 a 11. No gráfico da figura 10 é possível observar que o melhor pico de absorção foi para o sistema com pH = 7. Desta forma, este foi a condição usada.

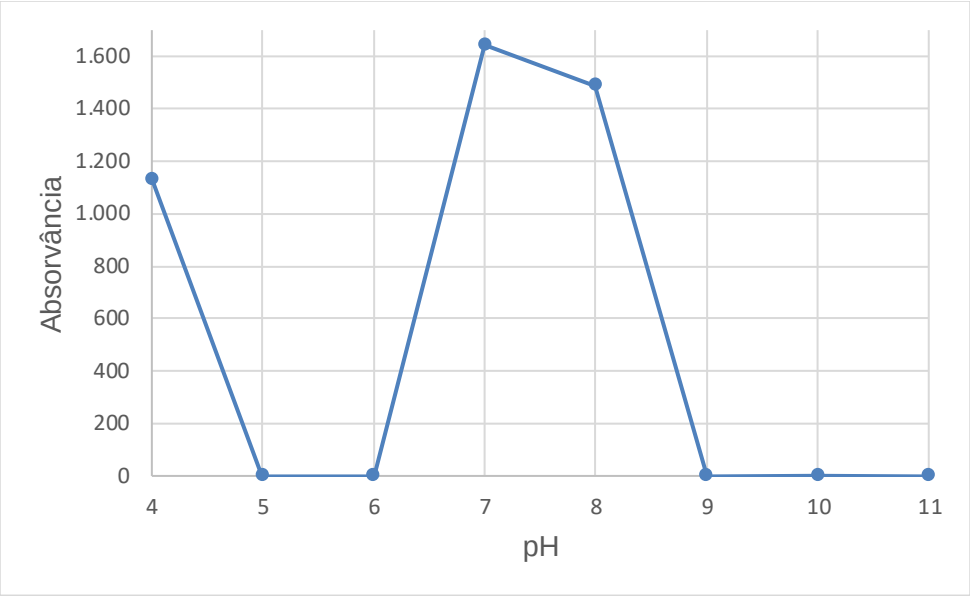

Figura 10: Analise do pH para a ditizona.

Foi feita uma curva analítica para comparação do complexante PAR e ditizona. É possível observar a linearidade quando usado a ditizona, como pode ser observado nos gráficos de comparação da figura 11. Este por sua vez, foi o complexante utilizado no desenvolvimento desta técnica.

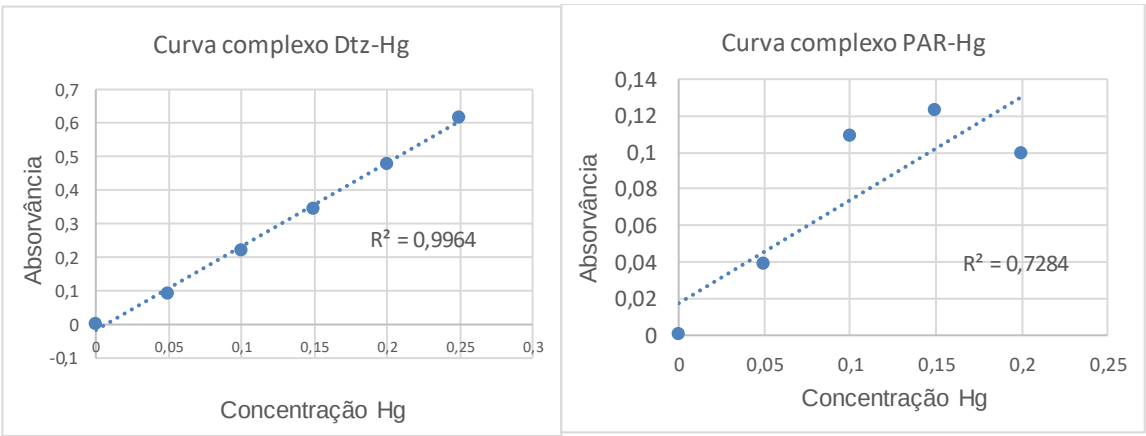

Figura 11: À esquerda curva do complexo Dtz-Hg. À direita curva do complexo PAR-Hg.

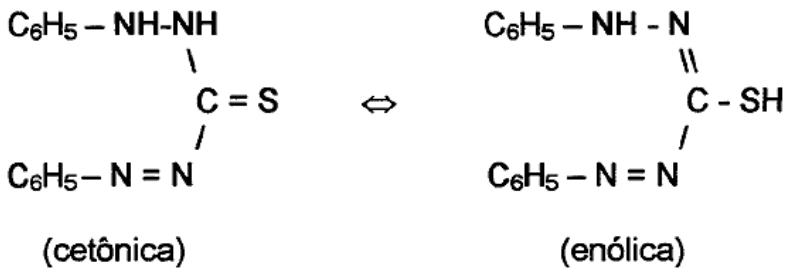

Figura 12: Forma tautomérica ceto-enólica da ditizona

Fonte: BARBOSA, 2001.

O pico de absorção do complexo ditizona mercúrio (Dtz-Hg), do branco e apenas da ditizona foram determinados (Figura 13). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis e obteve valor de 530 nm, do pico máximo na varredura do complexo Hg-Dtz. O branco por sua vez, não apresentou pico de absorção e o complexante, obteve dois picos de absorção, um em 600 nm e outro ~ 440 nm, o que confirma a literatura, que as duas absorções máximas e mínimas da ditizona, é 605 nm e 440 nm respectivamente. Isso ocorre devido as formas da ditizona no equilíbrio tautomérico (Figura 12), o comprimento máximo referente à cetônica e o mínimo a enólica (BARBOSA, 2001). Desta forma, o comprimento de absorção para o complexo ditizona-mercúrio 530 nm foi usado para as demais etapas.

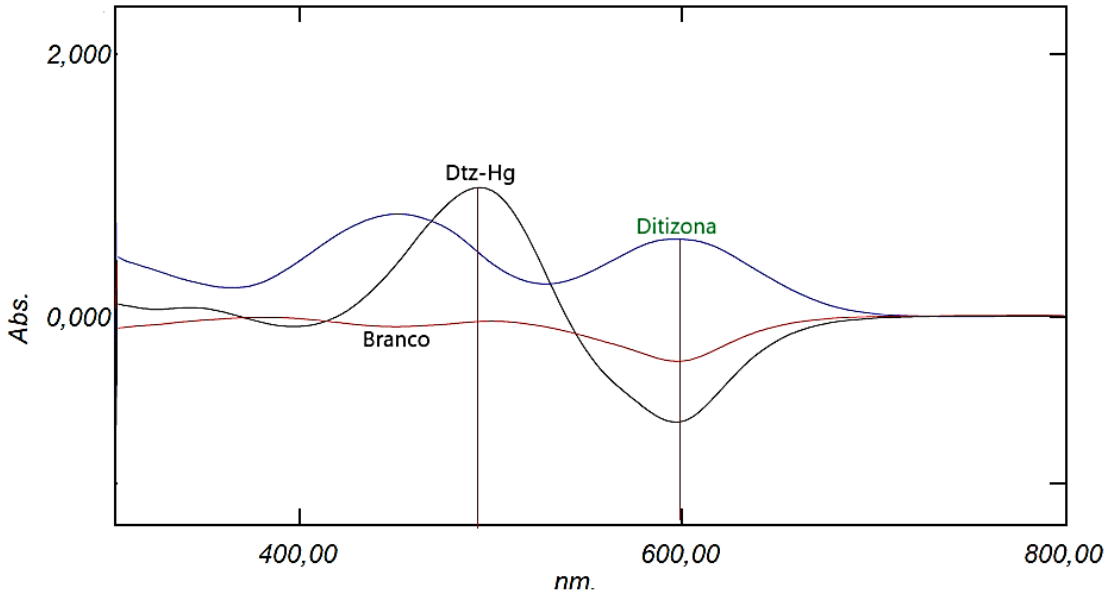

Figura 13: Varredura para identificação do pico de absorção do complexo ditizona (Dtz-Hg), do branco e da ditizona.

De acordo com Barbosa (2001), soluções de ditizona decompõe-se rapidamente quando exposta a luz intensa e estão sujeitas a oxidação do ar, pelos produtos da fotodecomposição de solventes orgânicos. Assim foi realizado o ensaio com 3 concentrações do mercúrio, no tempo de 0 à 60 min, na análise do tempo de duração do complexo Dtz-Hg, expresso no gráfico da figura 14.

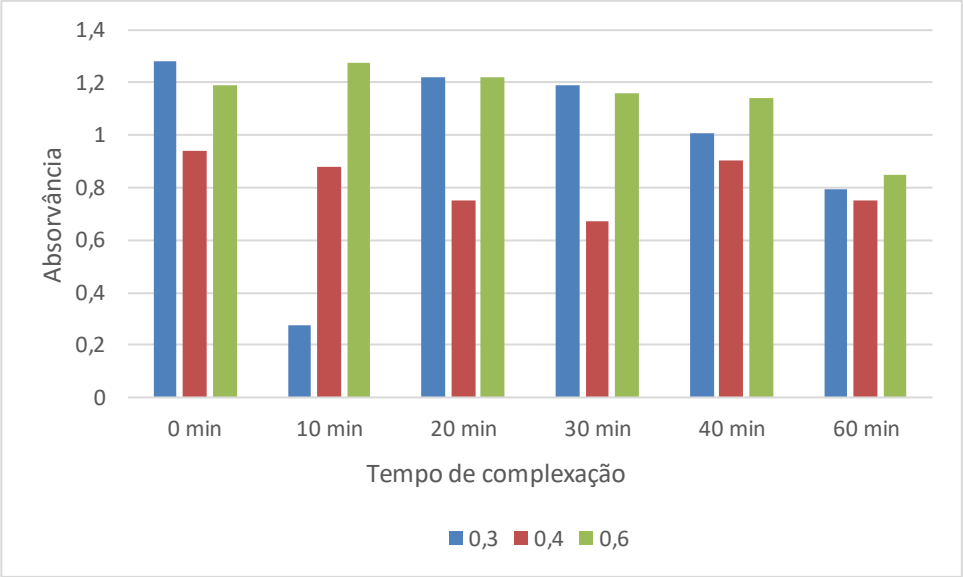

Figura 14: Estudo do tempo de complexação da ditizona.

Observa-se no gráfico da figura 14 que no tempo zero (0 min) todas as concentrações começam com uma absorbância relativamente baixa, com a concentração de 0,6 apresentando a maior absorbância inicial. À medida que o tempo aumenta, a absorbância em cada concentração também aumenta, atingindo um pico por volta de 20 minutos, independentemente da concentração. A absorbância tende a estabilizar ou diminuir ligeiramente após 30 minutos, o que pode indicar que a complexação alcança um estado de equilíbrio ou que há uma degradação do complexo formado ao longo do tempo. Esses resultados sugerem que a complexação da ditizona é influenciada tanto pela concentração do analito, quanto pelo tempo, com uma eficiência maior em concentrações mais baixas e com um equilíbrio sendo atingido em cerca de 20 a 30 minutos.

Foi avaliada à eficiência de extração do complexo em concentração alta e baixa, os resultados estão apresentados no gráfico da figura 15.

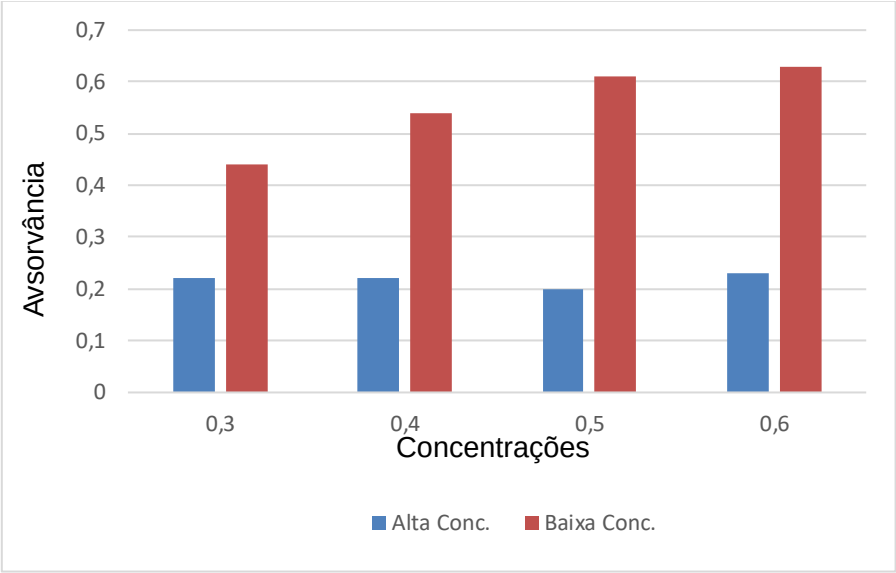

Figura 15: Analise da concentração de ditizona.

Em todas as proporções analisadas, a concentração baixa (barra vermelha) resulta em uma absorbância significativamente maior que a alta concentração (barra azul). Isso pode indicar que a ditizona é mais eficaz na complexação quando em concentrações mais baixas, talvez devido à maior disponibilidade de sítios de complexação ou à natureza do equilíbrio químico. Conforme a proporção do metal aumenta de 0,3 para 0,6, tanto para a concentração alta quanto baixa, há um aumento na absorbância, sendo mais pronunciado nas concentrações baixas.

3.2 Planejamento multivariado

O procedimento de otimização foi realizado em duas etapas. Primeiro, foi utilizado um planejamento fatorial de dois níveis envolvendo três variáveis: pH, concentração do complexante, volume do solvente extrator (líquido iônico), com o objetivo de conhecer quais destas variáveis mais influenciam o método de separação. Depois, foi aplicado uma matriz Box-Behnken com o objetivo de conhecer os pontos críticos das variáveis selecionadas no planejamento fatorial. A tabela 2 apresenta a matriz de planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais e a resposta analítica. A significância dos efeitos foi avaliada por meio da Análise de

Variância (ANOVA) e representada graficamente no gráfico de Pareto, com uma confiabilidade de 95%.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial de dois níveis com valores reais e codificados.

Experimentos	pH	Complexante (m/v%)	Líquido iônico (µL)	Resposta (Absorvância)
1	- (3)	- (0,5 x 10^{-5})	0 (100)	0,631
2	+ (9)	- (0,5 x 10^{-5})	0 (100)	0,765
3	- (3)	+ (1,5 x 10^{-5})	0 (100)	1,638
4	+ (9)	+ (1,5 x 10^{-5})	0 (100)	1,786
5	- (3)	0 (1,0 x 10^{-5})	- (50)	1,352
6	+ (9)	0 (1,0 x 10^{-5})	- (50)	0,908
7	- (3)	0 (1,0 x 10^{-5})	+ (150)	1,213
8	+ (9)	0 (1,0 x 10^{-5})	+ (150)	1,722
9	0 (6)	- (0,5 x 10^{-5})	- (50)	0,469
10	0 (6)	+ (1,5 x 10^{-5})	- (50)	1,370
11	0 (6)	- (0,5 x 10^{-5})	+ (150)	0,570
12	0 (6)	+ (1,5 x 10^{-5})	+ (150)	1,325
13	0 (6)	0 (1,0 x 10^{-5})	0 (100)	1,345
14	0 (6)	0 (1,0 x 10^{-5})	0 (100)	1,349
15	0 (6)	0 (1,0 x 10^{-5})	0 (100)	1,302

Os resultados do planejamento fatorial são apresentados no gráfico de Pareto, na figura 16, indicam que pH, concentração do complexante, volume do solvente extrator (LI) são variáveis significativas, exigindo investigações mais aprofundadas sobre suas influências individuais, bem como sobre as interações entre o complexante e o LI. No gráfico de Pareto o comprimento da barra será proporcional a influência da variável no sinal analítico, já o sinal positivo ou negativo indica se aquela variável tende para o nível inferior ou superior do planejamento. É possível observar ainda que há uma linha de referência no gráfico, onde se observa que quando a barra excede esta linha a variável em questão é significativa ($p > 0,05$) (JESUS, 2009; SANTOS *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2017).

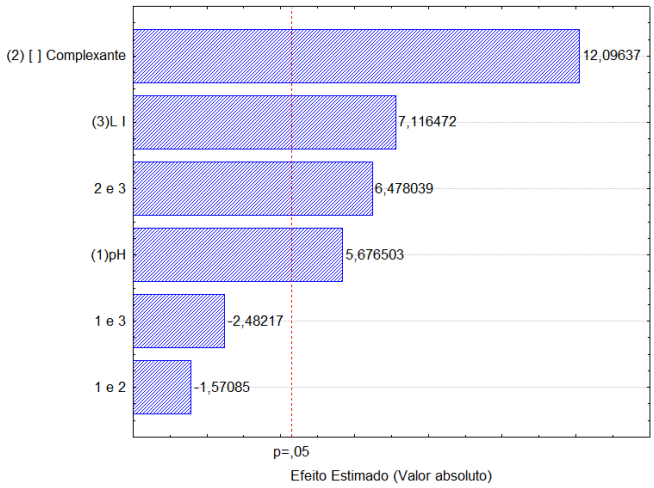

Figura 16: Gráfico de Pareto.

Neste gráfico é possível observar que o fator de maior influência no sistema é a concentração do complexante, seguido pelo líquido iônico, que foi o extrator do método. A interação entre o complexante e o líquido iônico foi a terceira variável que teve influência no método, seguido do fator pH. A interação entre o pH e o líquido iônico, pH e concentração do complexante, não tiveram influência no sistema.

Após a realização do planejamento fatorial de dois níveis, foi realizado um planejamento Box-Behnken para identificar os pontos críticos das variáveis estudadas. Os valores codificados e reais estabelecidos no projeto Box-Behnken são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Matriz do planejamento Box-Behnken com valores codificados.

Experimentos	**pH**	**[ ] Comp.**	**L.I.**	**Resposta**
1	-	-	0	0.689
2	+	-	0	0.65
3	-	+	0	1.518
4	+	+	0	1.493
5	-	0	-	1.316
6	+	0	-	1.01
7	-	0	+	1.216
8	+	0	+	1.26

9	0	-	-	0.36
10	0	+	-	1.368
11	0	-	+	0.485
12	0	+	+	1.321
13	0	0	0	1.352
14	0	0	0	1.374
15	0	0	0	1.316

Os experimentos foram conduzidos em triplicata para avaliar as condições ótimas para o método e também para validar a adequação da predição final. A avaliação do modelo ajustado é muito importante para garantir uma previsão adequada dos resultados em comparação com os experimentos (ZHANG, 2017). Assim, o modelo de predição de otimização obtido pelo projeto Box-Behnken será representado pelo modelo quadrático mostrado na Eq.(1):

Equação 1: $R= -1{,}056 - 0{,}011\ pH + 0{,}013\ [L.I.] + 0{,}017\ [Comp] + 0{,}003\ [pH]^2 - 0{,}00007[L.I.]^2 - 0{,}000\ [Comp]^2 + 0{,}001\ [pH]\ [L.I.] + 0{,}000\ [pH]\ [Comp] - 0{,}000\ [L.I.]\ [Comp]$

Na equação acima R representa a resposta, pH corresponde a concentração hidrogeniônica, [L.I.] volume de liquido iônico, [Comp] volume de complexante. Os valores dos pontos críticos foram calculados através da primeira derivada da função matemática, expressa na equação 1, igualada a zero (BEZERRA *et al.*, 2008). Os valores calculados para o ponto crítico são os seguintes: pH = 7,5; volume do L.I. = 276 µl e volume do complexante = 106 µl.

A qualidade do ajuste do modelo pode ser verificada pelo coeficiente de determinação (R^2). O valor do coeficiente de determinação (R^2 = 0,99458) R_{adj} = 0,98483 indica boa relação entre os valores experimentais e previstos da resposta. Isso também pode ser confirmado avaliando o gráfico de paridade representado na Figura 17. Ele mostra uma correlação satisfatória entre o valor previsto e os valores observados, confirmando que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais obtidos no desenho Box-Behnken.

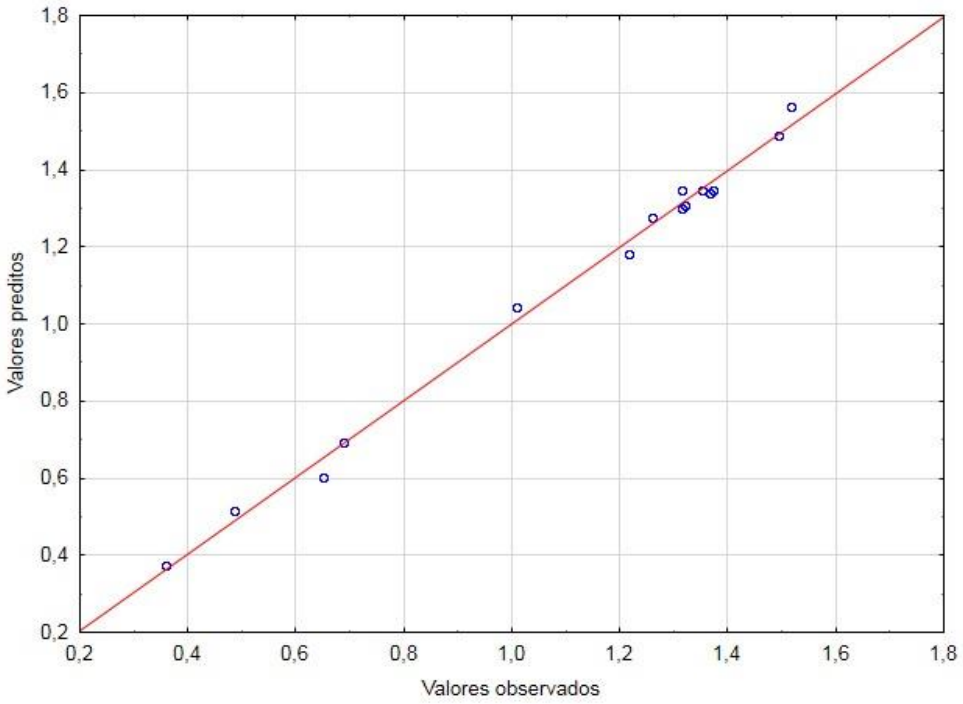

Figura 17: Gráfico de Paridade.

Tabela 4: Análise de variância do planejamento fatorial de dois níveis.

	SQ	gl	MQ	F	P
(1)pH	0,016301	2	0,008151	9,507	0,095176
(2)[ ] complexante	1,852424	2	0,926212	1080,340	0,000925
(3)LI	0,120114	2	0,060057	70,051	0,014074
1 e 2	0,000049	1	0,000049	0,057	0,833318
1 e 3	0,030625	1	0,030625	35,721	0,026871
2 e 3	0,007396	1	0,007396	8,627	0,099003
Falta de ajuste	0,009246	3	0,003082	3,595	0,225216
Erro Puro	0,001715	2	0,000857		
Total SS	2,022666	14			

$F_{tabelado}$= 19,33. SQ soma quadrática; gl graus de liberdade; MQ Média quadrática.

A tabela de Anova (Tabela 4) apresenta o valor para a falta de ajuste do modelo quadrático que foi igual a 0,2252. Observa-se que o valor não significativo

de falta de ajuste (>0,05) revelou que o modelo quadrático é estatisticamente significativo para a resposta.

3.3 FIGURA DE MÉRITO

3.3.1 Linearidade e Fator de Enriquecimento (FE)

A linearidade é a capacidade de um método analítico obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, dentro de um intervalo especificado. Uma relação linear deve ser estabelecida para toda a faixa estabelecida para o método. Esse intervalo corresponde à faixa entre os limites de quantificação superior e inferior. É expressa pelo coeficiente de correlação (R^2), obtido por dados estatísticos, no qual o critério mínimo aceitável do R^2 deve ser igual a 0,99; e a equação da reta y = ax + b, onde (y) é a resposta medida em absorbância; (x) a concentração; (a) inclinação da curva de calibração; e (b) a interseção com o eixo y. Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes em triplicata (ARAÚJO, 2019). A curva de calibração para o método proposto foi realizada nas concentrações de 0 a 0,25 $\mu g.L^{-1}$ de Hg, com intervalo de 0,05 $\mu g.L^{-1}$, como resultado a faixa linear foi y = 2,4989x - 0,0182, R^2 = 0,9968, como demonstrado na figura 17:

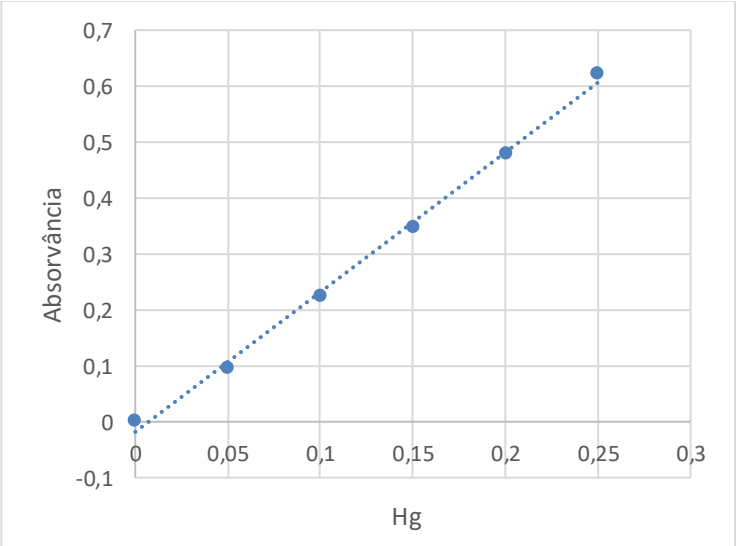

Figura 17: Curva de calibração pré-concentrada.

Além da linearidade avaliada, o fator de enriquecimento (FE), é um critério utilizado para avaliar a sensibilidade do método nos sistemas de pré-concentração. Esta avaliação ocorre pela razão da inclinação da curva analítica de um sistema pré-concentrado com a inclinação da curva do sistema sem pré-concentrar. Em outras palavras, avalia em quantas vezes a sensibilidade do método aumenta, ou não, quando o sistema está pré-concentrado (FARAJZADEH, 2014; VINHAS, 2016).

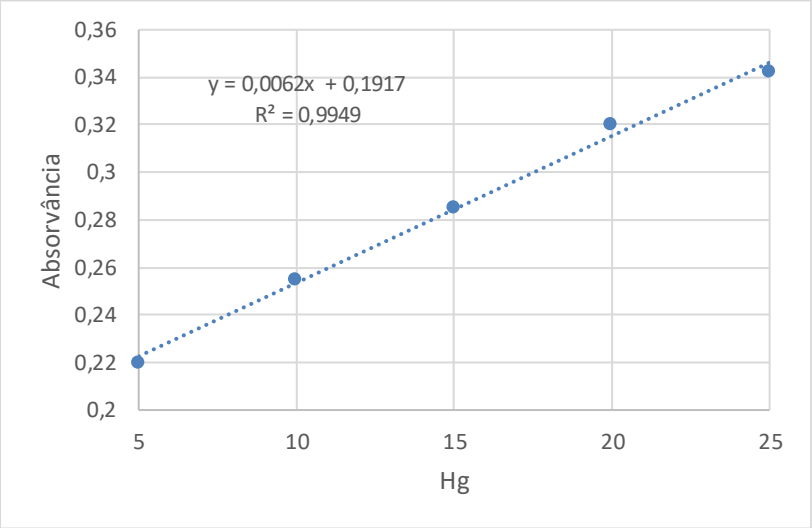

Figura 18: Curva analítica sistema sem pré-concentrar.

Em nosso sistema, este fator foi avaliado com base na curva de calibração, pela razão entre a inclinação da curva do sistema pré-concentrado (y = 2,4989x - 0,0182) (Figura 17) e a inclinação da curva do sistema sem pré-concentrar (y = 0,0062x + 0,1907) (Figura 18). O fator de enriquecimento encontrado foi de 403 vezes, ou seja, com a metodologia desenvolvida para este sistema de pré-concentração a sensibilidade aumenta aproximadamente 403 vezes.

3.3.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Toda técnica analítica tem um limite de detecção e um limite de quantificação, estes são fundamentais para garantir a confiabilidade dos resultados e a identificação e quantificação de vestígios de analitos. A sensibilidade é,

portanto, a inclinação da curva de calibração. Se a curva de calibração for linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração. Se a curva de calibração não for linear, a sensibilidade variará com a concentração e não tem um valor único (SKOOG *et al.*, 2006, p. 200).

O limite de detecção (LD) analisa a mais baixa concentração do analito que o método consegue determinar, mas não necessariamente ser quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) determina a concentração mais baixa que o método consegue identificar e quantificar com um certo limite de confiabilidade, geralmente entre 95% e 99%. Os dois fatores correspondem a testes que especificam se as amostras que serão analisadas estão ou não, acima ou abaixo de determinado valor (IMOTO e FRETIAS, 2008).

Para a validação dos níveis dos LD e LQ no desenvolvimento deste método, foi utilizado o desvio-padrão da resposta e o coeficiente angular da curva de calibração, para LD em 3x e LQ 10x. Obteve-se como resultado limite de detecção de 0,031 $\mu g.L^{-1}$, indica que o método pode detectar a substância em concentrações iguais ou superiores a 0,031 $\mu g.L^{-1}$, mas em concentrações abaixo disso, o método pode não conseguir diferenciá-la do ruído de fundo. E limite de quantificação igual a 0,103 $\mu g.L^{-1}$. Esse é o menor valor de concentração que pode ser quantificado com precisão e exatidão dentro de limites aceitáveis de erro. O seu valor de 0,103 $\mu g.L^{-1}$ indica que, abaixo dessa concentração, o método pode não fornecer resultados confiáveis em termos de quantificação. Desta forma, o método é capaz de detectar a substância a partir de 0,031, mas só consegue quantificá-la com precisão a partir de 0,103.

3.3.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras múltiplas de uma mesma amostra, preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A dispersão dos resultados é demonstrada calculando-se o Desvio Padrão Relativo (DPR) da série de medições, conforme a equação 8 (ARAÚJO, 2019). Assim, foram realizadas medidas de

repetitividade na construção da curva analítica e como desvio-padrão relativo (DPR) dos pontos de 0,1 µg.L^{-1} e 0,25 µg.L^{-1} de Hg num intervalo de 0,05 µg.L^{-1}.

A precisão (n = 7) calculada foi de 11% ± 0,003 para o padrão com concentração de 0,1 µg.L^{-1} e 9% ± 0,010 para o padrão de 0,25 0,1 µg.L^{-1}. O método apresenta variação na precisão para as duas concentrações de mercúrio. Contudo, a precisão melhora no aumento da concentração, com os dados relativamente mais próximos da média. Para medir concentrações menores de mercúrio o método tem uma variabilidade maior em comparação a concentrações mais altas. Esses valores indicam que, embora haja uma diferença na precisão entre as duas concentrações com uma margem de erro considerável, especialmente, para concentrações menores, os dados podem ser considerados precisos, pois fatores como, concentração do analito na amostra, se a nível traço e natureza do analito, podem levar a erros aleatórios que, por sua vez, causam dispersões em torno da média.

3.3.4 Robustez

Um planejamento fatorial de dois níveis foi usado para avaliar a robustez do método. Os valores utilizados para os níveis superiores, inferiores e o ponto central de cada fator, para uma variação de 10 %, são representados na Tabela 5.

As variações nas condições experimentais (pH, complexante, líquido iônico) afetam a resposta analítica (absorção). No caso de robustez, um método é considerado robusto se mudanças pequenas nas condições experimentais não resultarem em variações significativas no resultado final (ARAÚJO, 2019).

Tabela 5. Planejamento fatorial para avaliação da robustez

Experimento	pH	Complexante	Líquido iônico	Absorção
1	6,7	247,5	94,5	0,289
2	8,1	247,5	94,5	0,190
3	6,7	302,5	94,5	0,395
4	8,1	302,5	94,5	0,256
5	6,7	247,5	115,5	0,195

6	8,1	247,5	115,5	0,182
7	6,7	302,5	115,5	0,296
8	8,1	302,5	115,5	0,190
9	7,4	275	105,0	0,203
10	7,4	275	105,0	0,213
11	7,4	275	105,0	0,216

A partir dos dados da tabela, a absorção (resposta) parece variar em um intervalo relativamente estreito, independentemente das variações no pH, mesmo o fator pH ter influência no sistema, no volume do complexante e no líquido iônico. - Essa consistência sugere que o método é estável e pouco sensível a pequenas flutuações nos parâmetros experimentais, indicando robustez. Assim o gráfico de Pareto foi gerado afim de avaliar a consistência da robustez (Figura 19). Este gráfico ajuda a identificar quais fatores têm maior influência sobre a variação da resposta (no caso, a absorção).

No gráfico o eixo horizontal (Efeito Estimado) representa a magnitude do impacto de cada fator (pH, Complexante (C.), Líquido Iônico (L. I.)) na resposta. O eixo vertical mostra os fatores em ordem decrescente de impacto.

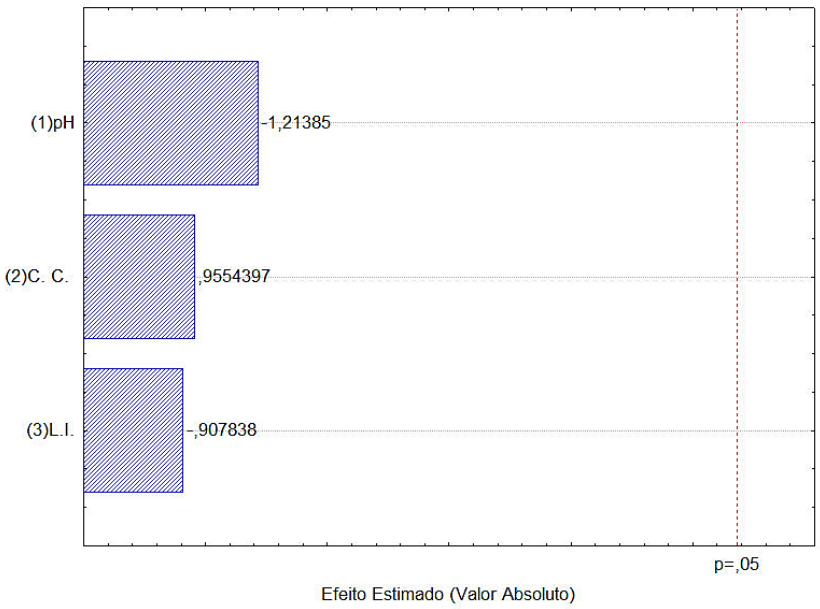

Figura 19: Gráfico de Pareto para avaliação da robustez

Com base no gráfico, o pH tem o maior impacto, indicando que alterações no pH afetam significativamente a resposta, contudo, em nosso teste as pequenas mudanças no pH não resultaram em variações significativas no resultado final. Visto que, a linha de significância (p = 0,05) presente, indica quais desses fatores têm influência estatisticamente significativa. Se algum dos fatores testados ultrapassasse essa linha, ele seria o principal responsável pelas variações, o que não aconteceu para nenhuma variação. O complexante tem o segundo maior efeito, também relevante, porém menor que o pH. E o Líquido Iônico tem o menor impacto entre os três fatores. Assim, o gráfico de Pareto sugere que o método pode ser sensível a variações no pH, seguido pelo volume do complexante e, por último, pelo volume de líquido iônico.

Portanto, o método pode ser considerado robusto para uma variação de pH 7,5 ± 0,70, volume complexante de 275,00 ± 27,50 (µl) e volume de Líquido Iônico 57,00 ± 10,50 (µl). Para garantir robustez, o controle preciso do pH pode ser necessário.

3.3.5 Interferentes

As possíveis interferências de outros íons sobre a determinação de Hg do método foram avaliadas. Os metais chumbo (Pb), cobre (Cu) e ferro (Fe), foram estudados, por serem apontados na literatura como interferentes na detecção de mercúrio (Hg) em análises, como espectrometria ou outros métodos analíticos, principalmente em metodologias que usem a ditizona como complexante. O Fe apresenta reação de oxidação com a ditizona e o Pb e Cu agem nas mesmas condições que o Hg, além de formar ditizionatos com estes metais, devido à sua forma tautomérica (COUTO, 1996).

A interferência foi determinada fixando três pontos máximo, médios e mínimos, dentro da faixa linear da curva analítica de calibração, por meio da razão entre as leituras com adição de uma solução multielementar contendo os metais e sem adição da solução. A solução multielementar usada, refere-se a uma mistura que contêm os três metais estudados (Pb, Cu e Fe). Os resultados da análise de

interferentes na determinação de mercúrio (Hg) em uma concentração de 0,3 µg.L^{-1}, estão expressos em porcentagem e apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise de interferentes na determinação de Mercúrio.

	Concentração do Hg 0,3 µg.L^{-1}		
Metal	Adição (µg.L^{-1})	µg.L^{-1}	Interferência (%)
Pb, Fe e Cu	0,3	0,24 (± 0,025)	8,0
	0,5	0,39 (± 0,032)	30,6
	0,7	0,35 (± 0,034)	15,33
	60	0,39 (± 0,060)	20,0
	80	0,66 (± 0,074)	21,0
	100	1,08 (± 0,027)	61,33

Observa-se que para os três níveis os metais (Pb, Cu e Fe), interferem significativamente na sensibilidade do método. É possível observar que nas adições de 0,3 a 0,7 µg.L^{-1}, a interferência aumenta com a concentração do interferente. A 0,3 µg.L^{-1}, a interferência é relativamente baixa, de 8,0%. No entanto, em 0,5 µg.L^{-1}, ela salta para 30,6%, indicando que mesmo uma pequena adição pode ter um impacto significativo. A 0,7 µg.L^{-1}, a interferência diminui um pouco para 15,33%, sugerindo que a interferência pode não aumentar linearmente com a concentração dos interferentes.

Ao contrário das condições na adição de concentrações mais altas, 60 a 100 µg.L^{-1}, a interferência tende a aumentar com o aumento da concentração. Na concentração de 60 µg.L^{-1}a interferência se estabiliza em torno de 20%. No entanto, à medida que a concentração dos interferentes continua a aumentar, a interferência também aumenta. Em 80 µg.L^{-1}, a interferência sobe ligeiramente para 21%, e a 100 µg.L^{-1}, há um aumento acentuado para 61,33%. Esses dados sugerem que os interferentes Pb, Fe e Cu afetam significativamente na determinação de mercúrio, especialmente em concentrações mais altas. Isso pode ser importante na análise

de amostras ambientais ou laboratoriais, onde a presença desses metais pode comprometer a precisão das medições de Hg.

Uma variação de até 5% em torno do fator de interferência é apontado como uma interferência desprezível (BARBOSA, 2001). Observa-se que para os três níveis de mercúrio os metais Pb, Cu e Fe, interferem significativamente, e que esse impacto depende da concentração dos metais adicionados, e em concentrações maiores desses metais levam a uma interferência maior.

Contudo, essa interferência não foi comprovada, na varredura do pré-concentrado contendo 0,7 µg.L^{-1} da solução multielementar, como pode ser observada na figura 20. O pico de absorção do complexo ditizona com o mesmo comportamento do pico de absorção apresentada na Figura 13.

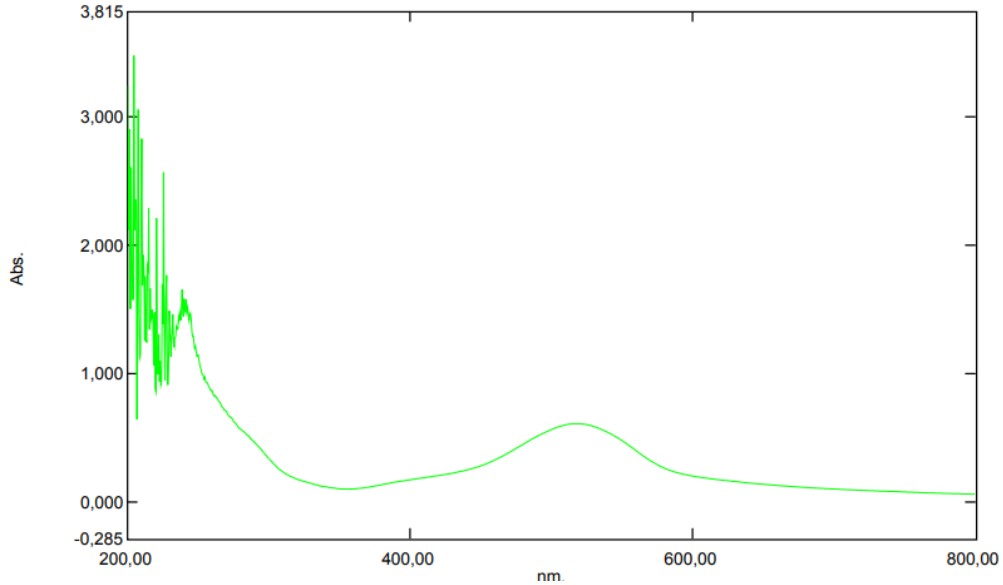

Figura 20: Varredura da amostra contendo 0,7 µg.L^{-1} da solução multielementar.

3.4 Exatidão e Aplicação

A exatidão avalia o quão próximos os resultados obtidos estão do valor verdadeiro. É um parâmetro de validação analítica que expressa a porcentagem de

recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença entre as médias e o valor verdadeiro (PEREZ, 2010).

Nesta etapa, a exatidão do método foi avaliada pelos ensaios de adição e recuperação que consiste na determinação do analito em amostras com e sem adição de quantidades conhecidas do analito. O método foi aplicado em amostras de vacinas de Caxumba, Influenza, Hepatite B, Difteria + Coqueluche e Febre Amarela, a concentração de Hg foi superior ao LQ do método.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a concentração de timerosal em vacinas humanas varia de acordo com o fabricante. A Farmacopeia Brasileira define o limite de timerosal de ≤ 200 $\mu g.L^{-1}$ nas vacinas (ANVISA, 2016). Existem duas referências oficiais que determinam os limites permitidos para o teor de timerosal: a Farmacopeia Americana define os mesmos limites de timerosal do Food and Drug Administration (FDA), onde a concentração é de 0,01% p/v, ou seja, aproximadamente, 50 microgramas de timerosal por dose de 0,5 ml; e a Farmacopeia Europeia que define que o teor de timerosal deve ser ≤ a 115% do valor declarado pelo fabricante (LIMA, 2012).

A recuperação do Hg através do método aplicado a cada indivíduo de vacinas, onde foram adicionados o dobro da concentração ($\mu g.L^{-1}$) de Hg em amostras de vacinas, é demonstrado na Tabela 6. Como resultado, a recuperação do Hg nas amostras variou de 50% a 355%.

Tabela 7. Valores de recuperação e desvios-padrão na análise de Hg em amostras de Vacinas multidose

Amostra	Hg adicionado ($\mu g.L^{-1}$)	Hg encontrado ($\mu g.L^{-1}$)	Recuperação (%)
Caxumba	0,0	0,783 (± 0,05)	----
	0,200	0,883 (± 0,074)	50%
	0,400	2,026 (± 0,24)	310%
Influenza	0,0	1,009 (± 0,18)	----
	0,200	1,035 (± 0,17)	13%
	0,400	1,049 (± 0,20)	10%
Hepatite B	0,0	0,741 (± 0,25)	----
	0,200	0,843 (± 0,059)	51%

	0,400	1,025 (± 0,01)	71%
Difteria + Coqueluche	0,0	0,681 (± 0,12)	----
	0,200	1,322 (± 0,030)	320%
	0,400	1,420 (± 0,09)	185%
Febre Amarela	0,0	0,482 (± 0,06)	----
	0,200	1,519 (± 0,1)	518%
	0,400	1,902 (± 0,03)	355%

A Tabela 7 que mostra os resultados da exatidão do método de análise de mercúrio em diferentes amostras de vacinas, refere-se à capacidade do método em recuperar a quantidade de mercúrio adicionada em cada amostra que, por sua vez, reflete a eficiência do método em recuperar o mercúrio adicionado.

Valores próximos de 100%, como na recuperação em 50, 51 e 71% indicam boa exatidão, ou seja, o método conseguiu recuperar parte do mercúrio adicionado. Em contrapartida, valores superiores a 100% sugerem que o método está detectando mais mercúrio do que o que foi adicionado, o que pode ser um sinal de interferências ou erros no processo, resultados expressos em 355, 518, 185, 320 e 310%. Já a exatidão com valores muito baixos (como 10% e 13%) indicam que o método não está recuperando a quantidade adequada de mercúrio, possivelmente por limitações na sensibilidade ou precisão.

Para a amostra de Caxumba com 0,200 $\mu g.L^{-1}$ de mercúrio adicionado, a recuperação foi de 50%, indicando que metade do mercúrio adicionado foi recuperado. Na amostra de Difteria + Coqueluche, a recuperação para 0,200 $\mu g.L^{-1}$ foi de 320%, mostrando que o método detectou mais mercúrio do que o adicionado, sugerindo uma superestimação. Bem como a amostra de Febre Amarela com 0,200 $\mu g.L^{-1}$ que teve uma recuperação de 518%, o que indica uma detecção, muito além da quantidade adicionada, possivelmente devido a presença de outros componentes da matriz que interferiram na separação, detecção ou na quantificação.

Em resumo, os resultados obtidos na exatidão mostram que o método está apresentando variações, com alguns resultados acima e abaixo do ideal (100%).

Isso pode indicar a necessidade de ajustes no método para melhorar a precisão e reduzir as interferências, pois, as limitações do procedimento de recuperação é que o analito, não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. O que, consequentemente, interfere, na separação, detecção ou quantificação do analito.

4. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para a microextração na determinação de mercúrio mostrou-se robusto, com uma boa linearidade, garantindo a confiabilidade dos resultados ao longo de uma ampla faixa de concentrações. A precisão variou entre 11% e 9%, demonstrando consistência, embora haja margem para melhorias. A exatidão foi variável, indicando que ajustes futuros podem ser necessários para otimizar a acurácia dos resultados. A recuperação, entretanto, foi oscilatória, sugerindo desafios na extração ou quantificação completa do mercúrio nas amostras. Apesar disso, o método apresentou uma boa seletividade, distinguindo eficazmente o mercúrio de outros componentes presentes nas amostras, com interferências mínimas de elementos como chumbo (Pb), ferro (Fe) e cobre (Cu). O baixo limite de detecção, de 0,031 $\mu g.L^{-1}$, e o limite de quantificação, de 0,1 $\mu g.L^{-1}$, destacam a sensibilidade do método, tornando-o adequado para a detecção de baixas concentrações de mercúrio. No entanto, melhorias na recuperação e precisão podem fortalecer ainda mais o desempenho e aplicabilidade do método em diferentes matrizes. O método apresentado neste estudo demonstrou ser uma abordagem robusta, com alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de níveis traços de mercúrio, seja na forma de conservantes como o timerosal, ou como contaminantes indesejados. Estudos futuros poderão focar em ajustes na validação do método em diferentes plataformas laboratoriais, além de ampliar sua aplicabilidade para outros tipos de amostras e condições de armazenamento, assegurando ainda mais a precisão dos resultados obtidos.

5. REFERÊNCIAS

1. BERTOTI, Ada Ruth; FERREIRA, José Carlos. **Ionic liquid [bmim. PF6]: a convenient solvent for laser flash photolysis studies**. Química Nova, v. 32, p. 1934-1938, 2009.
2. FERNANDES, L. B. et al. **Microextração líquido-líquido assistida por Vórtex na determinação de pesticida em amostras de água.** Embrapa semiárido, Petrolina, v. 10, 2015.
3. ALMEIDA, Pedro Henrique De Oliveira. **Síntese De Líquidos Iônicos Para Extração De Mercúrio.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Francisco Beltrão, 2019.
4. ANDRADE, Renato Allan Navarro. **Um analisador quimiluminescente em fluxo-batelada baseado em films digitais com extração em fase sólida magnética aplicado a determinação de cobre em cachaças.** Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraiba, João Pessoa, 2017.
5. Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Primeiro Suplemento, Brasília, ed. 5, 2016.
6. BARBOSA, Adriana Bernardes et al. **Pré-concentração e determinação de Hg (II) com ditizona empregando sistema ternário homogêneo de solventes.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, 2001.
7. BARCELOS, Júlia de Souza et al. **Determinação de mercúrio em amostra de tecido de peixe por espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG AAS) e espectrometria de fluorescência atômica (AFS).** Trabalho de Conclusão de Curso, Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
8. BEZERRA, Marcos Almeida et al. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry**. Talanta, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
9. BISINOTI, Márcia Cristina et al. **Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica do vapor frio.** Química Nova, v. 29, n. 6, p. 1169-1174, 2006.
10. COUTO, Clara Macêdo. **Desenvolvimento de uma metodologia espectrofotométrica para determinação de chumbo em sangue.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, 1996.
11. DUARTE, Jaqueline da Silva; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; VILLA, Ricardo D. **Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vortex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água**. Química Nova, v. 39, n. 8, p. 925-931, 2016.
12. FARAJZADEH, Mir Ali; MOHAMMAND, Reza Afshar Mogaddam, Abdollahi Aghdam. **Comparision of Air Agitated Liquid Liquid Microextraction Technique and Conventional Dispensive Liquid Liquid Microextraction for Determination os Triazole Pesticides in Aqueous Sample By Gas Chromatography with Flame Ionization Detection**. Journal of Chromatography A, p. 70-78, 2013.

13. FERREIRA, Vanessa de Jesus. **Microextração líquido-líquido com emulsificação assistida por ultrassom para pré-concentração de cádmio e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2016.
14. GONDIM, Tamyris de Aquino. **Desenvolvimento de Procedimento Analítico para Extração e Pré-Concentração de Ferro em Amostras de Água de Produção Usando Extração em Ponto Nuvem e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
15. HUDDLESTON, Jonathan G. et al. **Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation**. Green chemistry, v. 3, n. 4, p. 156-164,2001
16. IMOTO, Marvina Natsue; FREITAS, R. J. **Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) em análise de resíduos de pesticidas organohalogenados por cromatografia em fase gasosa**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 18, p. 35-44, 2008.
17. JESUS, R.M. **Desenvolvimento de método analítico para a determinação de cádmio em vinho e estudo preliminar de especiação de cádmio, ferro, manganês, zinco e cobre em vinho.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, 2009.
18. LEITE, Cinthia Carmo. **Estratégias analíticas de pré-concentração e determinação de urânio em amostras ambientais: uma breve revisão**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo Da Bahia, Cruz das Almas, 2016.
19. LIMA, Patrícia Condé de. **Estudo da avaliação do teor de timerosal em vacinas de Influenza tipo A (H1N1) no ano de 2010**. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.
20. LIU, Jing-fu et al. **Use of ionic liquids for liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons**. Analytical Chemistry, v. 75, n. 21, p. 5870-5876, 2003.
21. MAZZILLI, Barbara Paci; MÁDUAR, Marcelo Francis; CAMPOS, M. P. **Radioatividade no meio ambiente e avaliação de impacto radiológico ambiental.** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2011.
22. MENG, Y.; ANDERSON, J. L. **Use of Unconventional Solvents for Sample Preparation in Environmental Analysis**. Elsevier, University of Toledo, USA, 2012.
23. PICÓ, Y. **Recent advances in sample preparation for pesticide analysis**. Elsevier, University of Valencia, p. 569-590, 2012.
24. RUY, Rafael Baioco. **Extração dos íons Cu(II), Cd(II), Fe(III) e Zn(II) utilizando um sistema aquoso bifásico constituído pelo copolímero L35 e o sal Li_2SO_4.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2007.
25. SANTOS, W.N.L.; SANTOS, C.M.C.; FERREIRA, S.L.C. **Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry**. Microchemical Journal, v. 75, p. 211–221, 2003.

26. SILVA, João Paulo Reis da et al. **Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para pré concentração de cd sobre resina de xad-4 modificada com fenilfluorona e determinação por espectrometria de absorção atômica**. Química Nova, v. 39, n. 5, p. 561-566, 2016.
27. SOUSA, Tiago FA et al. **Vortex-assisted liquid–liquid micro-extraction and high-performance liquid chromatography for a higher sensitivity methyl methacrylate determination in biological matrices.** Biomedical Chromatography, v. 28, n. 5, p. 680-685, 2014.
28. TEIXEIRA, Paulo César. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Embrapa, ed. 3, Brasília, DF, 2017.
29. VASCONCELOS, Stanley NS; PIZZUTI, Lucas. **Síntese do Líquido Iônico Hexafluorofosfato de 1-Butil-3-Metilimidazólio [BMIM][PF_6].** Revista Ceciliana, Universidade Santa Cecília v. 4, p. 90-93, 2012.
30. VINHAS, Ana Cláudia Andrade. **Desenvolvimento De Método Analítico Usando Dllme Para Determinação De Cádmio Em Folhas De Alfavaca (Ocimum gratissimum).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, 2016.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido para a microextração na determinação de mercúrio mostrou-se robusto, com uma boa linearidade, garantindo a confiabilidade dos resultados ao longo de uma ampla faixa de concentrações. O baixo limite de detecção, de 0,031 $\mu g.L^{-1}$, e o limite de quantificação, de 0,1 $\mu g.L^{-1}$, destacam a sensibilidade do método, tornando-o adequado para a detecção de baixas concentrações de mercúrio. Além de garantir baixo impactos ambientais, respeitando os critérios da Química Verde, pelo menor ou quase nenhum uso de solventes orgânicos. Um método simples, com rápida extração, seletivo, distinguindo eficazmente o mercúrio de outros componentes presentes nas amostras, com interferências mínimas de elementos como chumbo (Pb), ferro (Fe) e cobre (Cu). podendo ser aplicado em testes de rotina laboratorial. Em relação à recuperação, ajustes podem ser necessários para otimizar a acurácia dos resultados, com estudos futuros que foquem na validação do método.