

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2012/2013

**DETEÇÃO DE FRAGRÂNCIAS SINTÉTICAS (MUSKS) EM PRODUTOS
DE HIGIENE E DE CUIDADO PESSOAL POR GC-MS**

EDUARDO SIMÃO MOREIRA DA SILVA

Dissertação submetida para obtenção do grau de
MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Presidente do Júri: Fernando Gomes Martins
(Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia do Ambiente da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto)

Orientador académico: Lúcia Maria da Silveira Santos
(Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto)

julho de 2013

Agradecimentos

É com grande satisfação que agradeço a todos aqueles que tornaram esta tese uma realidade.

Ao LEPAE (Laboratório de Processos, Engenharia do Ambiente e Energia) do Departamento de Engenharia Química por fornecer todo o equipamento, reagentes e instalações necessárias.

Um agradecimento especial para a minha orientadora Dr. Lúcia Santos pelo apoio e força dada desde o primeiro dia para a realização deste projeto.

À minha co-orientadora Dr. Vera Homem, uma profunda gratidão pela constante presença, acompanhamento, preocupação e ajuda em todos os pontos desta tese.

Ao José Avelino Silva por presenciar de perto todo este trabalho e garantir o correto funcionamento do GC-MS.

A toda a equipa do laboratório do MIA201, que garantiram sempre uma animação e dedicação constante. O excelente ambiente de trabalho deve-se a todos eles.

Agradeço à Sephora de Aveiro, nomeadamente à responsável pela loja do Centro Comercial Glicínias, Sra. Isabel Ferreira, por fornecer a título gratuito e com a maior amabilidade todas as amostras de perfumes analisadas.

À Sonae e Jerónimo Martins uma palavra de apreço pela pronta resposta com a lista de produtos mais vendidos, nas categorias de produtos em estudo, no grande Porto.

Por fim, uma palavra de profunda gratidão aos meus pais, Manuel Silva e Maria Silva, ao meu irmão, Miguel Silva, à minha namorada e futura esposa, Laura Nóbrega. Aos amigos André Sousa e Samuel Queirós pelo companheirismo e força constante que deram ao longo de todo o curso.

A todas estas pessoas um “Muito Obrigado”!

Resumo

Os *musks* são compostos orgânicos que se inserem na classe dos poluentes emergentes. Estes compostos são incorporados numa grande variedade de produtos de higiene e cuidado pessoal como substâncias fixadoras de fragâncias. Normalmente os *musks* são divididos em quatro diferentes classes: nitro *musks*, *musks* policíclicos, *musks* macrocíclicos e *musks* alicíclicos. Apesar da sua ampla utilização, muitos poucos estudos foram realizados tendo como fontes de aplicação os produtos de higiene e cuidado pessoal.

Neste trabalho foram analisadas as concentrações, distribuições, frequências e quantidades totais de 12 *musks* (*musk xylene*, *musk ketone*, *musk moskene*, *musk ambrette*, *musk tibetene*, *galaxolide*, *tonalide*, *cashmeran*, *celestolide*, *phantolide*, *exaltolide* e *ethylene brassylate*) em produtos de higiene e cuidado pessoal. Estes foram divididos em 5 categorias: perfumes, produtos de corpo e cabelo, desodorizantes, pasta de dentes e hidratantes. Para efetuar a extração dos compostos, utilizou-se a metodologia de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*) que já tinha sido desenvolvida no grupo de investigação. As condições de extração foram as seguintes: 500 mg de amostra, 3 mL de acetonitrilo, QuEChERS 1: 2400 mg MgSO₄ + 750 mg de NaCH₃COOH e QuEChERS 2: 180 mg MgSO₄ + 60 mg PSA + 30 mg C₁₈. Depois da extração, as amostras foram analisadas por GC-MS.

O método analítico foi validado e a gama de linearidade foi determinada (25-4000 µg.L⁻¹ para *exaltolide* e *musk ambrette*, 10-4000 µg.L⁻¹ para *musk xylene* e *ethylene brassylate* e 5-4000 µg.L⁻¹ para os restantes *musks*). Todos eles apresentaram um comportamento linear com coeficientes de correlação que variaram entre 0,9797 e 0,9974. Os limites de deteção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) foram calculados com base na razão sinal-ruído. Os valores variaram entre 0,01 ng.g⁻¹ para o *galaxolide* e 5,77 ng.g⁻¹ para o *ethylene brassylate*. As recuperações variaram entre 97% para hidratantes de pele e desodorizantes, 85% sabonetes líquidos e as mais baixas foram obtidas para pasta de dentes com cerca de 75%.

Foram detetados *musks* em todas as amostras. Registaram-se 6 produtos que continham nitro *musks* restringidos (*musk ketone* e *musk xylene*). Os mais detetados foram o *galaxolide* (n=109), *exaltolide* (n=85) e *cashmeran* (n=78). As pastas de dentes e os champôs para crianças foram os que registaram uma menor concentração de *musks* (0,04-16,60 mg.kg⁻¹). Já os perfumes, champôs e loções para o corpo apresentaram as maiores concentrações (489-26658 mg.kg⁻¹). De todos os *musks* utilizados, os perfumes são a classe de produtos de higiene e cuidado pessoal (PCPs) que detêm a maior fatia com 87,2%, em contraste com as pastas de dentes com 0,0006%. O *exaltolide* e *galaxolide* representam mais de 50% da composição de *musks* em cada categoria de PCPs.

A exposição dérmica diária a *musks* por parte de um adulto é de $383,76 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, enquanto que a de uma criança é cerca de 28 vezes menor com $14,21 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$. Estes valores de exposição dérmica dependem dos hábitos de cada população. Assim, torna-se importante efetuar estes estudos numa escala regional, de modo a minimizar os erros associados à diferença que estas variáveis têm de região para região.

Abstract

Musks are considered emerging pollutants. These compounds are incorporated into a wide variety of personal care products as fixative substances. Typically, musks are divided into four different classes: nitro musks, polycyclic musks, macrocyclic musks and alicyclic musks. Despite its widespread use, few studies in hygiene and personal care products have been performed.

In this study the concentrations, distributions, frequencies and total quantities of 12 musks (musk xylene, musk ketone, musk moskene, musk ambrette, musk tibetene, galaxolide, tonalide, cashmeran, celestolide, phantolide, exaltolide and ethylene brassylate) in hygiene and personal care products were analyzed. These were divided into five categories: perfumes, body and hair care products, deodorants, toothpastes and skin moisturizers. To perform the extraction of the compounds, a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) methodology, which has been previously developed in the research group, was used. The extraction conditions were as follows: 500 mg of sample, 3 mL of acetonitrile, QuEChERS 1: 2400 mg MgSO₄ + 750 mg NaCH₃COOH and QuEChERS 2: 180 mg MgSO₄ + 60 mg PSA + 30 mg C₁₈. After extraction, the samples were analyzed by GC-MS.

The analytical method was validated and the range of linearity was determined (25-4000 µg.L⁻¹ for exaltolide and musk ambrette, 10-4000 µg.L⁻¹ to musk xylene and ethylene brassylate and 5-4000 µg.L⁻¹ to the remaining musks). They all showed a linear correlation coefficients ranging between 0.9797 and 0.9974. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were calculated based on the signal-to-noise ratio. Values ranged from 0.01 to ng.g⁻¹ to galaxolide and 5.77 ng.g⁻¹ to ethylene brassylate. Recoveries ranged from 97% for deodorants and skin moisturizers, 85% for liquid soaps and about 75% for toothpastes.

Musks were detected in all samples. Restricted nitro musks (musk ketone and musk xylene) were detected in 6 samples. The most detected compounds were galaxolide (n=109), exaltolide (n=85) and cashmeran (n=78). Lower concentrations of musks (0.04 to 16.60 mg.kg⁻¹) were found in toothpastes and shampoos for children. Perfumes, shampoos and body lotions had the highest concentrations (489-26658 mg.kg⁻¹). Perfumes are the class of personal care products (PCPs) studied that contains the largest amount of musks in their composition (87.2%), while toothpastes contained about 0.0006%. The exaltolide and galaxolide represent more than 50% of the composition of musks in each category of PCPs.

Dermal daily exposure to musks by an adult is 383.76 µg.kg⁻¹.day⁻¹, while for a child is about 28 times lower with 14.21 µg.kg⁻¹.day⁻¹. These values depend on dermal exposure habits of each population. Therefore, it becomes important to perform these studies on a regional

scale in order to minimize the error associated with the difference that these variables have from region to region.

Índice

1	Enquadramento	1
2	Introdução	2
2.1	Produtos de higiene e cuidado pessoal.....	2
2.2	<i>Musks</i> naturais	2
2.3	<i>Musks</i> sintéticos	3
2.3.1	Nitro <i>musks</i>	3
2.3.2	<i>Musks</i> policíclicos	4
2.3.3	<i>Musks</i> macrocíclicos.....	5
2.3.4	<i>Musks</i> alicíclicos	6
2.4	Produção e consumo de <i>musks</i>	7
2.5	Exposição humana e ambiental a <i>musks</i>	12
2.6	Métodos analíticos para a determinação de <i>musks em produtos de higiene</i>	14
2.6.1	Técnicas de extração	14
2.6.2	Métodos instrumentais de análise.....	17
3	Estado da Arte	23
4	Descrição Técnica	31
4.1	Reagentes.....	31
4.2	Preparação de padrões	31
4.3	Amostras	32
4.4	Método de extração e <i>cleanup</i>	32
4.5	Instrumentação	33
4.6	Controlo de qualidade.....	34
4.7	Acondicionamento, destino e tratamento de resíduos	34
5	Resultados e Discussão	35
5.1	Validação do Método Analítico	35
5.2	<i>Musks</i> nos produtos de higiene e cuidado pessoal.....	38
5.3	Avaliação da exposição humana a <i>musks</i>	44

6	Conclusões.....	47
7	Avaliação do trabalho realizado.....	48
7.1	Objetivos realizados.....	48
7.2	Limitações e trabalho futuro.....	48
8	Bibliografia.....	51
	Anexo 1 – Concentrações de <i>musks</i> nos produtos de higiene.....	57
	Anexo 2 – Poster apresentado em conferência internacional.....	62

Índice de Figuras

Figura 1 - Evolução na produção de <i>musks</i> na EU.....	8
Figura 2 - Consumo médio de <i>musks</i> na Dinamarca	9
Figura 3 - Quantidade consumida de HHCB na Dinamarca.....	10
Figura 4 - Esquema dos componentes de um sistema de GC-MS.....	18
Figura 5 - Esquema de funcionamento da fonte de iões	21
Figura 6 - Fluxograma da metodologia QuEChERS.....	33
Figura 7 - Cromatograma de um hidratante	37
Figura 8 - Cromatograma de um hidratante com adição de padrão 800 $\mu\text{g.g}^{-1}$	37
Figura 9 – Número de amostras contendo cada um dos <i>musks</i> analisados ($n=119$).....	38
Figura 10 - Concentração total média de musks (mg.kg^{-1}) nos diferentes tipos de amostras....	42
Figura 11 - Distribuição relativa dos <i>musks</i> nos produtos de higiene em estudo.	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estruturas químicas e características dos nitro <i>musks</i>	4
Tabela 2 - Estruturas químicas e características dos <i>musks</i> policíclicos.....	5
Tabela 3 - Estruturas químicas e características dos <i>musks</i> macrocíclicos.....	6
Tabela 4 - Estruturas químicas e características dos <i>musks</i> alicíclicos	7
Tabela 5 - Legislação europeia e limitações ao uso dos <i>musks</i> em produtos de higiene	11
Tabela 6 - Características dos <i>musks</i> de maior consumo nos critérios de P, B e T	13
Tabela 7 - Resumo dos métodos analíticos utilizados para determinação dos <i>musks</i> em produtos de higiene	27
Tabela 8 - Resumo dos produtos de cuidados pessoais investigados.....	32
Tabela 9 - Iões de identificação e de quantificação e tempo de retenção de cada <i>musk</i>	34
Tabela 10 - Parâmetros de validação do método analítico.....	36
Tabela 11 - Concentrações (mg.kg^{-1} ; média e gama) e frequência de deteção (%) dos musks nos produtos de higiene na área metropolitana do Porto	40
Tabela 12 - Perfis de exposição dérmica diária a <i>musks</i>	45

Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ADBI	<i>Musk celestolide</i>
AED	Detetor de emissão atómica (<i>atomic-emission detector</i>)
AHMI	<i>Musk phantolide</i>
AHTN	<i>Musk tonalide</i>
ATII	<i>Musk traseolide</i>
B	Bioacumulativo
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CD	Directiva dos Cosméticos (<i>Cosmetics Directive</i>)
CG-ECD	Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de captura de eletrões
DCM	Diclorometano
DPMI	<i>Musk cashmeran</i>
EA	Acetato de etilo
ECD	Detetor de captura de iões
EcoFEUP	Sistema de Gestão Ambiental da FEUP
ESD	Detetor de espetrometria de massa
ETAR	Estação de Tratamento de Água Residual
ETH	<i>Ethylene brassylate</i>
EXA	<i>Exaltolide</i>
FEUP	Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
FID	Detetor de ionização de chama (<i>flame ionization detector</i>)
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa
HHCB	<i>Musk galaxolide</i>
IFRA	<i>International Fragrance Association</i>
Kow	Coefficiente de partição octanol-água
LLE	Extração líquido-líquido (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
MA	<i>Musk ambrette</i>
MASE	Membrane assist solvent extraction
mB	Muito bioacumulativo
MK	<i>Musk ketone</i>
MM	<i>Musk moskene</i>
mP	Muito persistente
MS	Espetrometria de massa
MSPD	Extração por dispersão da matriz em fase sólida
MT	<i>Musk tibetene</i>
MX	<i>Musk xylene</i>
nB	Não bioacumulativo
nP	Não persistente
nT	Não tóxico
P	Persistente
PCPs	Produtos de higiene pessoal (<i>personal care products</i>)
PID	Detetor de fotoionização
PSA	Amina primária/secundária
QuEChERS	<i>Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)</i>
rpm	Rotações por minuto

RSD	Desvio padrão relativo
SCOT	Coluna tubular aberta revestida com suporte (<i>Support coated open tubular</i>)
SIS	Armazenamento de iões selecionados (<i>Selected ion storage</i>)
SLE	Extração sólido-líquido (<i>solid-liquid extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid-phase microextraction</i>)
T	Toxicidade
TCD	Detetor condutividade térmica
UE	União Europeia
USE	Extração por ultrassons (<i>Ultrasonic solvent extraction</i>)
UV	Ultravioleta
vPvB	Muito persistente e muito bioacumulativo (<i>very Persistent and very Bioaccumulative</i>)
WCOT	Wall coated open tubular

1 Enquadramento

Nas últimas décadas, o impacto da poluição foi maioritariamente direcionado para os poluentes considerados persistentes, nomeadamente os pesticidas tóxicos/carcinogénicos e os subprodutos industriais que apresentavam persistência no meio ambiente (Daughton e Ternes 1999). Estes poluentes são, de um modo geral, resistentes à degradação bacteriana e são bioacumuláveis (Patterson *et al.*, 2000). Com o aumento dos estudos científicos na área ambiental, descobriram-se novas substâncias que até então não eram monitorizadas, mas que apresentavam potenciais riscos para os ecossistemas. Assim, surgiu uma nova classe de poluentes – os poluentes emergentes. Estes são compostos químicos presentes numa grande variedade de produtos utilizados no dia-a-dia como medicamentos, produtos de higiene e cuidado pessoal, agrotóxicos, etc. A deteção destes poluentes está diretamente relacionada com as capacidades analíticas de monitorização nas diferentes áreas ambientais. Com o desenvolvimento de procedimentos analíticos mais sofisticados e sensíveis, ou seja, técnicas de extração mais eficientes e detetores com melhor capacidade de deteção, um maior número de poluentes emergentes poderão ser detetados a níveis residuais no meio ambiente. Consequentemente, um número acrescido de novos contaminantes que anteriormente eram ignorados e/ou não reconhecidos começaram a ser tidos em linha de conta (Pietrogrande, 2007). Dentro da classe dos poluentes emergentes encontram-se os almíscares, também designados por *musks*. Estes compostos são incorporados nos produtos de higiene e cuidado pessoal como substâncias fixadoras de fragâncias (Hutter *et al.*, 2010). O seu uso intensivo e generalizado, bem como a sua natureza lipofílica, tornaram estes compostos alvos interessantes para futuras pesquisas, nomeadamente na área da toxicologia (Roosens *et al.*, 2007).

Assim, neste contexto, os principais objetivos deste trabalho foram estimar o padrão de utilização dos produtos de higiene pessoal na população da área metropolitana do Porto e posteriormente, a exposição humana e dos ecossistemas a *musks* através da monitorização dos seus níveis, nos produtos mais utilizados por esta população alvo.

2 Introdução

2.1 Produtos de higiene e cuidado pessoal

Os produtos de higiene e de cuidado pessoal (PCPs) são químicos orgânicos sintéticos usados numa grande variedade de produtos de banho, pastas de dentes, cosméticos, protetores solares, etc. Compostos como os *musks*, filtros UV, antissépticos, parabenos são exemplos de PCPs. O impacto ambiental destes compostos químicos existentes nos produtos de higiene que são utilizados diariamente pela população constitui uma área emergente de pesquisa, uma vez que os efeitos a longo prazo destes compostos são ainda desconhecidos (Patterson *et al.*, 2000).

Estes poluentes são introduzidos maioritariamente no ambiente através das águas residuais provenientes das habitações. Posteriormente, estas águas contaminadas são conduzidas até às estações de tratamento de águas residuais (ETARs). Apesar de todos os tratamentos efetuados (químicos e/ou físicos), as ETARs ainda não estão preparadas para remover/degradar estes contaminantes. Por esta razão grandes quantidades destes compostos são descarregados continuamente no meio ambiente (Laessig *et al.*, 2012). Assim, os PCPs podem ser encontrados em qualquer indivíduo que tenha contato com estes (absorção cutânea, inalação ou até ingestão de água e alimentos contaminados) ou em qualquer massa de água (rios, aquíferos, águas subterrâneas, ambientes marinhos e várias fontes de água potável) que esteja a jusante de um esgoto bruto ou tratado (U. S. Environmental Protection Agency, 2010) e (Yin *et al.*, 2012). Tal como foi referido anteriormente, o impacto ambiental e até na saúde humana dos diversos compostos que pertencem à classe dos PCPs é ainda escassa. De entre estes compostos, as fragrâncias sintéticas (*musks*) são talvez uma das classes que tem suscitado maior preocupação por parte da comunidade científica.

Os *musks* são uma classe de compostos orgânicos que desempenham um papel fundamental na indústria de perfumes e cosméticos, uma vez que são utilizados como fixadores de fragrâncias (constituem as notas de base dos perfumes). Possuem diferentes estruturas químicas e podem ser de origem natural ou sintética (Sommer, 2004).

2.2 *Musks* naturais

Desde a antiguidade que os *musks* naturais foram utilizados em cerimónias religiosas (constituintes do incenso), em medicamentos e também como fixadores de fragrâncias na área

da perfumaria. Até ao final do século XIX, estes compostos foram obtidos através de fontes animais ou vegetais. Os *musks* de origem animal eram obtidos principalmente da glândula exócrina do cervo-almiscarado (*Moschus moschiferus*), mas também de outros animais almiscarados como o boi (*Ovibos moschatus*), gato (*Civettictis civetta*), rato (*Ondatra zibethicus*), pato (*Biziura lobata*), escaravelho (*Calichroma moschata*), etc. Os de origem vegetal eram obtidos através das raízes, sementes e até flores de algumas plantas (*Mimulus inoschalus*, *Hibiscus abelmoschus*, *Angelica archangelica*).

A utilização dos *musks* de origem animal, nomeadamente do cervo-almiscarado manteve-se durante milhares de anos. No entanto, devido à proximidade de extinção desta espécie, a produção e uso destes *musks* naturais foram proibidos em 1979 (Fragrantica, 2013). Para além desta importante questão ética, o elevado preço e a incerteza de obtenção foram as principais razões que levaram a indústria a tentar sintetizar novos compostos fixadores de fragâncias, os *musks* sintéticos (Ravi *et al.*, 2001; Fragrantica, 2013 e Giddings *et al.*, 2000).

2.3 *Musks* sintéticos

Tal como mencionado anteriormente, os *musks* de origem natural foram sendo gradualmente substituídos por *musks* sintéticos com propriedades semelhantes. O crescimento da procura proporcionou a abertura de um novo mercado para a produção destes fixadores. Atualmente, quase todos os *musks* utilizados em cosméticos e produtos de perfumaria são de origem sintética (G. G. Rimkus, 1999).

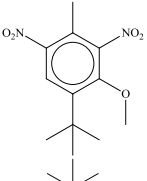
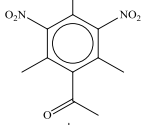
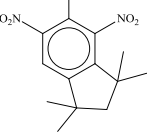
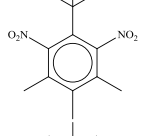
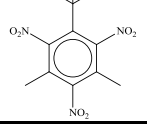
Hoje em dia, os *musks* sintéticos estão divididos em 4 principais grupos químicos: nitro, policíclicos, macrocíclicos e alicíclicos.

2.3.1 Nitro *musks*

O uso de fragrâncias sintéticas teve o seu início no séc. XX com a produção dos nitro *musks*. Este grupo foi descoberto em 1888 por Albert Baur por condensação do tolueno com brometo de isobutilo, na presença de cloreto de alumínio. Esta reação deu então origem ao primeiro *musk* deste grupo, o *musk moskene* (MM) (Pickthall, 1960). Quimicamente, esta classe de compostos sintéticos deriva do benzeno, dinitro e trinitro substituídos (Wombacher e Hornbuckle, 2009; Herren e Berset, 2000).

Dentro deste grupo destacam-se 5 compostos sintéticos (Tabela 1): *musk moskene* (MM), *musk tibetene* (MT), *musk xylene* (MX), *musk ketone* (MK) e *musk ambrette* (MA).

Tabela 1 - Estruturas químicas e características dos nitro *musks* (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013)

	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto ebulição (a 760 mmHg) (°C)	Log K _{OW}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Musk ambrette (MA)	83-66-9	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₅		268,3	369	5,7	1,67
Musk ketone (MK)	81-14-1	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅		294,3	395	4,3	1,90
Musk moskene (MM)	116-66-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄		278,3	351	5,8	0,17
Musk tibetene (MT)	145-39-1	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄		266,3	391	5,9	0,29
Musk xylene (MX)	81-15-2	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₆		297,2	392	4,9	0,49

Conforme se pode verificar na Tabela 1, o *musk moskene* (MM) e o *musk tibetene* (MT) parecem ser os compostos com um maior carácter lipofílico, apresentando os valores mais elevados de log K_{OW} e a menor solubilidade em água.

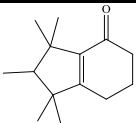
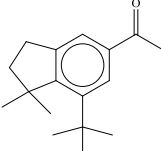
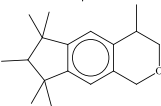
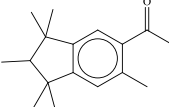
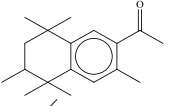
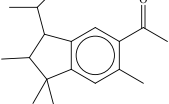
Esta classe de compostos dominou o mercado dos fixadores de fragrâncias durante muitos anos mas, com o passar do tempo, um novo grupo de *musks* emergiu devido à sua maior estabilidade e baixo custo – os *musks* policíclicos (European Commission, 1997).

2.3.2 *Musks* policíclicos

Os *musks* policíclicos suplantaram os nitro *musks* no início da década de 50 devido ao menor custo associado à sua síntese, ao aumento da sua resistência à degradação por efeito da luz, baixa toxicidade e maior estabilidade molecular graças à sua estrutura química (apresentam mais do que um anel na sua estrutura, aumentando assim a sua estabilidade) (Herren e Berset, 2000; Roosens *et al.*, 2007). Quimicamente estes compostos são derivados de tetralina e indano, substituídos maioritariamente por grupos metilo (G. G. Rimkus, 1999).

Os principais *musks* policíclicos (Tabela 2) são: *galaxolide* (HHCB), *tonalide* (AHTN), *cashmeran* (DPMI), *celestolide* (ADBI), *phantolide* (AHMI) e *traseolide* (ATII).

Tabela 2 - Estruturas químicas e características dos *musks* policíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013)

	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto ebulição (a 760 mmHg) (°C)	Log K _{ow}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Musk cashmeran (DPMI)	33704-61-9	C ₁₄ H ₂₂ O		206,3	286	4,9	0,17
Musk celestolide (ADBI)	13171-00-1	C ₁₇ H ₂₄ O		244,4	308-309	6,6	0,02
Musk galaxolide (HHCB)	1222-05-5	C ₁₈ H ₂₆ O		258,4	326	5,9	1,75
Musk phantolide (AHMI)	15323-35-0	C ₁₇ H ₂₄ O		244,4	337	6,7	0,03
Musk tonalide (AHTN)	1506-02-1	C ₁₈ H ₂₆ O		258,4	357	5,7	1,25
Musk traseolide (ATII)	68140-48-7	C ₁₈ H ₂₆ O		258,4	350	8,1	0,09

Entre os *musks* policíclicos o *musk traseolide* (ATII) é o que apresenta um caráter mais lipofílico, apresentando um Log K_{ow} de 8,1 e baixa solubilidade em água, de acordo com a Tabela 2.

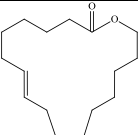
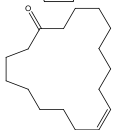
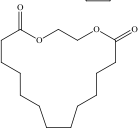
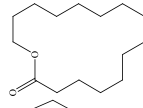
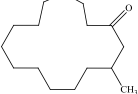
Apesar do baixo custo de produção e da sua utilização em grande escala, este grupo de *musks* teve um abrandamento de produção nos últimos anos, continuando, no entanto, a ser a classe mais utilizada. Desenvolveu-se então um terceiro grupo – os *musks* macrocíclicos.

2.3.3 *Musks* macrocíclicos

Os *musks* macrocíclicos são quimicamente semelhantes aos que ocorrem naturalmente em animais e plantas (cetonas ou lactonas cíclicas com cerca de 10-15 carbonos) e por isso, apresentam uma maior estabilidade química (Roosens *et al.*, 2007). Devido ao seu elevado custo de produção, estes compostos apenas representam uma pequena parte dos *musks* sintéticos existentes no mercado (3-4%) e são maioritariamente utilizados em perfumes (Abramsson-Zetterberg e Slanina, 2002). No entanto, as suas excelentes propriedades fixadoras continuam a desempenhar um papel fundamental neste tipo de indústria (Abramsson-Zetterberg e Slanina, 2002).

Alguns exemplos de *musks* pertencentes a este grupo são o *musk ambrettolide*, *civetone*, *ethylene brassylate*, *exaltolide (thibetolide)* e *muscone* (Tabela 3).

Tabela 3 - Estruturas químicas e características dos *musks* macrocíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013)

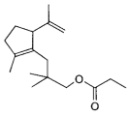
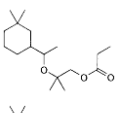
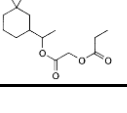
	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto ebulição (a 760 mmHg) (°C)	Log K _{ow}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
<i>Musk ambrettolide</i>	123-69-3	C ₁₆ H ₂₈ O ₂		252,4	286	5,4	0,59
<i>Musk civetone</i>	542-46-1	C ₁₇ H ₃₀ O		250,4	308-309	6,3	0,10
<i>Musk ethylene brassylate</i>	105-95-3	C ₁₄ H ₂₄ O ₄		256,3	465	4,7	1,72
<i>Musk exaltolide (thibetolide)</i>	106-02-5	C ₁₆ H ₂₈ O ₂		252,4	379	6,0	0,15
<i>Musk muscone</i>	541-91-3	C ₁₆ H ₃₀ O		238,4	330	6,0	0,22

Estes compostos caracterizam-se pela sua elevada natureza lipofílica (Log K_{ow} >5), como se constata na Tabela 3. Dentro deste grupo o *musk ethylene brassylate* apresenta uma das maiores solubilidades em água e maior ponto de ebulição.

2.3.4 *Musks* alicíclicos

Os *musks* alicíclicos, também denominados por *musks* lineares, constituem uma nova classe de fixadores de fragrâncias (Tabela 4). O primeiro composto deste grupo a ser sintetizado foi o *cyclomusk* em 1975. Apesar de terem sido descobertos na década de 70, só foram introduzidos no mercado em 1990 através do composto *helvetolide*. Estruturalmente estes compostos são muito diferentes dos até então conhecidos. (Kraft, 2004; Eh, 2004)

Tabela 4 - Estruturas químicas e características dos *musks* alicíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013)

	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto ebulição (a 760 mmHg) (°C)	Log K _{ow}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
<i>Musk cyclomusk</i>	84012-64-6	C ₁₇ H ₂₈ O ₂		264,4	337	6,7	0,03
<i>Musk helvetolide</i>	141773-73-1	C ₁₇ H ₃₂ O ₃		284,4	346	5,5	0,30
<i>Musk romandolide</i>	236391-76-7	C ₁₅ H ₂₆ O ₄		270,4	308	6,7	0,01

Este grupo de *musks*, referenciado na Tabela 4, difere dos grupos anteriores na sua estrutura molecular – são os únicos que apresentam uma estrutura linear. De uma forma geral estes compostos apresentam uma maior insolubilidade em água.

Após a apresentação dos diversos grupos de *musks*, o ponto seguinte aborda a produção, comercialização e consumo destes compostos. Avaliar-se-á qual o perfil de utilização de *musks*, assim como as quantidades consumidas na UE.

2.4 Produção e consumo de *musks*

A produção dos *musks* tem sofrido algumas variações ao longo do tempo. Diversos fatores contribuíram para essas variações, nomeadamente a descoberta de novos *musks* e a proibição de outros, com base em estudos toxicológicos.

No início da década de 50, os *musks* policíclicos surgiram e começaram a substituir os nitro *musks* (Herren e Berset, 2000). No entanto, a produção em massa dos nitro *musks* apenas sofreu uma diminuição significativa na UE a partir da década de 90. Este fato estará relacionado com o surgimento nessa década de diversos estudos que apontam para uma elevada toxicidade destes compostos, para o seu potencial carcinogénico e para os seus efeitos nocivos sobre o sistema hormonal. Por exemplo, estudos efetuados no Japão demonstraram que a utilização do *musk xylene* e *musk ketone* tendiam a aumentar o risco de aborto nas mulheres. Por essa razão, a produção destes dois compostos foi proibida naquele país (Wombacher e Hornbuckle, 2009). Além disso, os compostos pertencentes a esta classe revelaram possuir propriedades bioacumulativas e foto alérgicas (como é o caso do *musk ambrette*) (Roosens *et al.*, 2007). Como será explicado posteriormente com maior detalhe, a

utilização da maioria dos nitro *musks* está restrita ou mesmo proibida na UE. Assim, os musks policíclicos constituem, até hoje, o grupo com maior expressão a nível industrial. Quanto aos restantes grupos, os *musks* macrocíclicos representam uma pequena quota de mercado (3-4%) e são maioritariamente utilizados em perfumes (Abramsson-Zetterberg e Slanina, 2002), enquanto os alicíclicos não têm grande expressão de mercado (Kraft, 2004).

Em 1996, a produção mundial de *musks* sintéticos foi cerca de 8000 ton.ano⁻¹, em que 90% desta produção era partilhada pelas espécies policíclicas *galaxolide* (HHCB) e *tonalide* (AHTN) e os restantes 10% maioritariamente por *musk xylne* (MX) e *musk ketone* (MK) (Kiymet, 2009). Hoje em dia, o *tonalide* e o *galaxolide* representam cerca de 95% do mercado europeu (Clara *et al.*, 2011). Na figura 1 está representada a evolução na produção dos principais *musks* sintéticos na UE durante a década de 90, uma vez que não foram encontrados dados mais atuais (Kiymet, 2009).

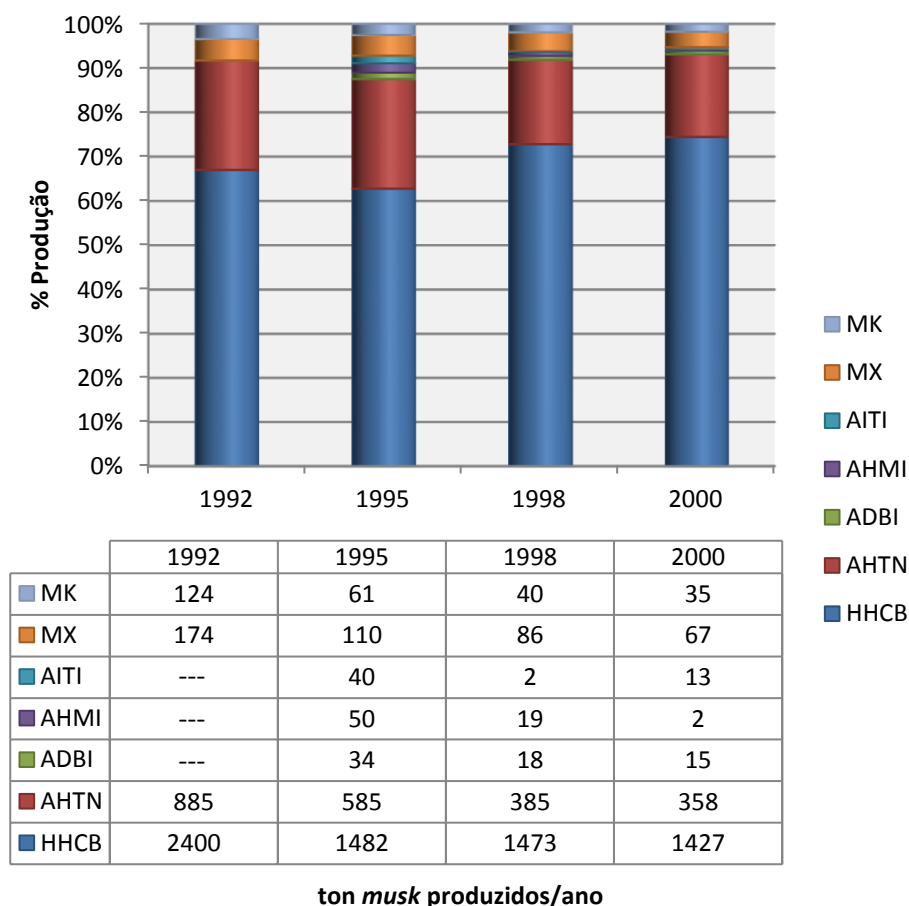


Figura 1 - Evolução na produção de *musks* na EU. Adaptado de (OSPAR Comissão, 2004)

Entre 1992 e 2000 registou-se uma tendência geral no que toca à produção destes almíscares na UE. Verificou-se assim um decréscimo geral na quantidade total produzida. A

produção a nível mundial em 1988 foi de 7000 ton (WWF, 2000) e, desde então, a produção tem vindo a aumentar, acompanhando a tendência de procura. No entanto, constata-se que ao longo da década de 90 a Europa tem vindo a perder importância na produção de *musks*, sendo que a produção na Ásia tem seguido uma tendência contrária (Nakata *et al.*, 2012).

Relativamente ao consumo de *musks* apresenta-se como exemplo os dados relativos à Dinamarca. Este país com cerca de 5.500.000 habitantes teve um consumo de 535 kg no ano de 2000. Como se pode verificar na figura 2, os *musks* mais consumidos são o *galaxolide* (333 kg.ano⁻¹), seguido do *musk xylene* (134 kg.ano⁻¹) (Törneman, 2008).

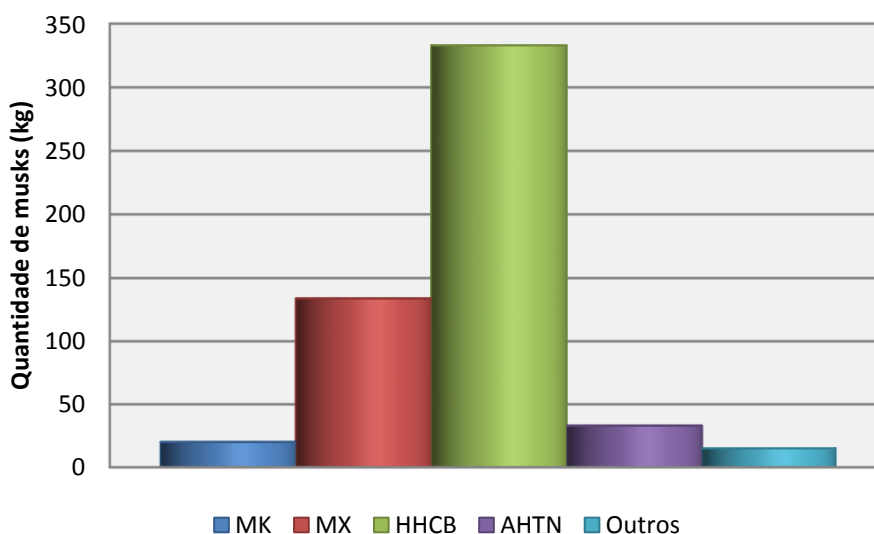


Figura 2 - Consumo médio de *musks* na Dinamarca. Adaptado de (Törneman, 2008)

Em 2000 a taxa de consumo dos *musks* na EU situou-se nos 2400 ton.ano⁻¹ (Schwartz *et al.*, 2000). Esta taxa de consumo corresponde a uma utilização média estimada de 4,4 e 11,1 mg.hab⁻¹.dia⁻¹ para o *tonalide* e o *galaxolide*, respetivamente (Balk e Ford, 1999).

Como se pode verificar na figura 2, o *galaxolide* é o *musk* sintético mais produzido e consumido na UE. Na verdade, apenas este *musk* apresenta nos últimos anos uma tendência de aumento de produção e consumo, contrastando com a diminuição de grande parte dos outros nitro *musks* e policíclicos (Kiyemet, 2009). O perfil de consumo do *galaxolide* na Dinamarca está representado na figura 3 (Törneman, 2008).

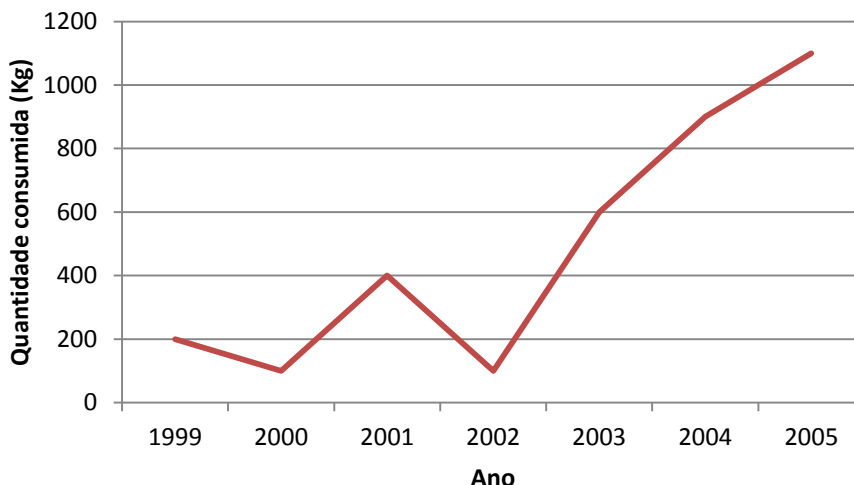


Figura 3 - Quantidade consumida de HHCB na Dinamarca. Adaptado de (Törneman, 2008)

Com a globalização e o aumento da população mundial, torna-se evidente que, salvo restrições a nível da legislação ou descoberta de novos compostos, o aumento da quantidade consumida de *galaxolide* é uma tendência que continuará ao longo dos anos. Em suma, os *musks* policíclicos representam a classe de compostos mais consumidos, sendo o *galaxolide* o composto com maior impacto no consumo. Paralelamente, os *musks* macrocíclicos apresentam uma tendência de aumento no mercado nos próximos anos, contrastando com a redução progressiva dos nitro *musks* e a situação indefinida dos alicíclicos, devido à sua recente descoberta (European Chemicals Agency, 2008).

A nível da legislação europeia, esta tem vindo a ser cada vez mais exigente no que toca à utilização dos *musks*. Em 1995 apenas o *musk ambrette* (MA) estava rotulado como substância proibida (Diretiva de Execução 95/34/EU) e passados três anos foram acrescentadas mais dois *musks* a este grupo – *musk moskene* (MM) e *musk tibetene* (MT) (Diretiva de Execução 98/62/EU). Em 2004, com a Diretiva de Execução 2004/88/EU foi restringido o uso do *musk xylene* (MX) e *musk ketone* (MK) na maioria dos produtos de higiene e proibida a sua utilização em produtos de higiene oral. O mesmo se registou com o AHTN na Diretiva de Execução 2008/42/EU. O REACH (*Regulation on Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) classifica o *musk xylene* (MX) como vPvB (*very persistent and very bioaccumulative*), desaconselhando a utilização deste químico. Atualmente, na UE, encontra-se em vigor a Diretiva de Execução 2012/21/EU e pela IFRA (Associação Internacional de Fragrâncias) que legisla as concentrações máximas permitidas destes compostos em produtos de higiene de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Legislação europeia e limitações ao uso dos *musks* em produtos de higiene

Musks	Directiva 2012/21/EU (%m/m)	IFRA	REACH	
Nitro musks	MA	Proibido	---	
		Restringido		
		Fragrâncias finas: 1,4% Eau de toilette: 0,56% Produtos hidroalcoólicos: 0,042%		
	MK	Produtos mantidos na pele após aplicação: 0,042% Produtos com enxaguamento após aplicação: 0,042% Produtos de aplicação oral: 0%	---	---
	MM	Proibido	Proibido	---
	MT	Proibido	Proibido	---
	Restringido			
	Fragrâncias finas: 1,0% Eau de toilette: 0,4% Produtos hidroalcoólicos: 0,03%			
MX	Produtos mantidos na pele após aplicação: 0,03% Produtos com enxaguamento após aplicação: 0,03% Produtos de aplicação oral: 0%	Proibido	Regulamento N.º 412/2012 - vPvB	
DPMI	---	---	---	
ADBI	---	---	---	
HHCB	---	---	---	
		Restringido		
		Produtos mantidos na pele após aplicação: 2%	---	
		Produtos com enxaguamento após aplicação: -		
Musks policíclicos	Restringido			
	Fragrâncias finas: 2,5% Eau de toilette: 0,1% Produtos hidroalcoólicos: 1,0%			
AHTN	Produtos mantidos na pele após aplicação: 0,1% Produtos com enxaguamento após aplicação: 0, 2% Produtos de aplicação oral: 0%	---	---	
ATII	---	---	---	

--- não consta da legislação

Esta legislação europeia sobre a regulamentação dos produtos cosméticos, representada na Tabela 5, foi transposta para a lei nacional (Decreto-Lei n.º 189/2008), que foi

posteriormente alterado pelos Decreto-Lei n.º 115/2009, Decreto-Lei. n.º 113/2010, Decreto-Lei n.º 63/2012 e Decreto-Lei n.º 245/2012.

A acrescentar a esta legislação, a Associação Internacional de Fragrâncias (IFRA) estabeleceu restrições adicionais à legislação europeia e que devem ser cumpridas por todas as empresas que a compõem. Como se pode observar na Tabela 5, existe uma autorregulação, pois alguns compostos que foram proibidos/restringidos pela IFRA (como é o caso do MX e AHMI) ainda não o foram à luz da legislação europeia.

É importante referir que ainda existem lacunas importantes a nível de legislação no que toca aos *musks* macrocíclicos e alicíclicos (European Chemicals Agency, 2008).

Face a estes dados, torna-se importante avaliar a exposição humana e ambiental a estes compostos, determinando as principais fontes de contaminação, formas de introdução no meio ambiente e sua distribuição nos vários compartimentos ambientais em que se concentram e principais riscos para o Homem.

2.5 Exposição humana e ambiental a *musks*

Tal como mencionado anteriormente, a principal fonte de *musks* são os produtos cosméticos e de higiene pessoal (perfumes, loções, géis de banho, champôs, desodorizantes, etc.), bem como os produtos de limpeza como detergentes e amaciadores de roupa. Assim, é esperado que a exposição humana a *musks* provenha maioritariamente do contacto direto através da pele com os produtos de higiene e cuidado pessoal e até de limpeza (embora com menor expressão). Apesar deste órgão proporcionar uma barreira de proteção natural, alguns compostos presentes nestes produtos de higiene, nomeadamente *musks*, poderão penetrar no organismo. Outros produtos de cuidado pessoal e limpeza são aplicados através de pulverização, existindo nesse caso um maior risco de exposição por inalação e até ingestão (L. Loretz *et al.*, 2006; L. Loretz *et al.*, 2005; J. W. Biesterbos *et al.*, 2013). Quanto à exposição ambiental, é esperado que os resíduos provenientes da utilização humana sejam a maior fonte de contaminação. De facto, os *musks* são incorporados em produtos com uma elevada taxa de utilização e, por isso, são continuamente introduzidos no meio ambiente através dos sistemas urbanos de esgotos. Devido às suas propriedades (bioacumulação e lipofilicidade), estes compostos são apenas parcialmente biodegradáveis e portanto, quando chegam às estações de tratamento de águas residuais não são completamente removidos. Logo, os efluentes das ETAR's, bem como as suas lamas, constituem o principal meio de contaminação.

Diversos estudos reportaram a presença destes compostos em diferentes compartimentos ambientais como águas de rios (Lee *et al.*, 2010) (150-16720 ng.L⁻¹),

(Cavalheiro *et al.*, 2013) (45-2347 ng.L⁻¹) e (Winkler *et al.*, 2000) (25-260 ng.L⁻¹) sedimentos (Wombacher e Hornbuckle, 2009) (0,5-20 ng.kg⁻¹) e (Laessig *et al.*, 2012) (10,24-24,12 ng.kg⁻¹) lamas (Herren e Berset, 2000) (10000-60000 ng/kg), (Shek *et al.*, 2008) (351-78600 ng.L⁻¹), (Zeng *et al.*, 2005) (192-21214 ng.L⁻¹), (Smyth *et al.*, 2007) (126-19800 ng.L⁻¹) e (Guo *et al.*, 2010) (250-82000 ng.L⁻¹) organismos aquáticos (Rimkus *et al.*, 1999) (<1-3600 µg/kg de gordura), (Rimkus e Wolf, 1995) (<10-1060 µg/kg de gordura) e até em leite e tecidos humanos (Kang *et al.*, 2010) (26,4-586 ng.g⁻¹).

Tendo em conta a exposição humana e ambiental a estes compostos, torna-se importante o conhecimento das características a nível da sua persistência (P), bioacumulação (B) e toxicidade (T) dos *musks* com uma maior taxa de produção e utilização (Tabela 6).

Tabela 6 - Características dos *musks* de maior consumo nos critérios de P, B e T (OSPAR Comissão, 2004)

<i>Musks</i>	Persistência (P)	Bioacumulação (B)	Toxicidade (T)
MX	P ou mP	B ou mB	Incerto
MK	P ou mP	nB	Incerto
AHTN	Potencialmente P	nB	nT
HHCB	Potencialmente P	nB	nT
Macrocíclicos	nP	---	---
Alicíclicos	---	---	---

Os nitro *musks* MX e MK têm uma elevada persistência no meio ambiente, atingindo até a cotação de muito persistentes (mP). Ao MX acresce o fato de ser bioacumulativo (B ou mB). Na família dos policíclicos, o AHTN e o HHCB são as duas substâncias com maior interesse comercial. Estudos apontam para que ambos não apresentem efeitos adversos para a saúde quando incorporados em produtos de higiene e cuidado pessoal (nB e nT) (HERA, 2004) e (OSPAR Comissão, 2004).

Tal como mencionado anteriormente o *musk tibetene* (MT), *musk moskene* (MM) e *musk ambrette* (MA) estão proibidos na Europa, uma vez que estes têm as seguintes características:

- MA – composto fototóxico, fotoalergénico e neurotóxico;
- MM – composto tóxico e bioacumulativo;
- MT – composto tóxico, carcinogénico e apresenta atividade estrogénica.

Relativamente ao grupo dos macrocíclicos, ainda parece haver pouca informação sobre os riscos sanitários e ambientais que estes possam apresentar. Apesar disso, devido à sua estrutura semelhante aos *musks* naturais, estes parecem apresentar menores riscos

ambientais, pois parecem ser mais facilmente degradados por ação microbiana do que os seus antecessores (OSPAR Comissão, 2004) e (Peters, 2005). Quanto aos *musks* alicíclicos não existe, até ao momento, informação quanto à sua potencial toxicidade.

Em termos de saúde para o Homem e impacte no ambiente, os *musks* apresentam baixa biodegradabilidade, o que conduz a um aumento dos riscos visto estes compostos se acumularem nas diversas matrizes. Tal como mencionado anteriormente, desde a década de 90 que os nitro *musks* e os *musks* policíclicos são encontrados nas águas, peixes, tecido adiposo humano e leite humano (Schwartz *et al.*, 2000).

Como já foi referido, a principal fonte de exposição humana e de contaminação ambiental são os produtos de higiene e cuidado pessoal. Embora vários estudos tenham sido efetuados na sua determinação em compartimentos ambientais, poucos se focaram na determinação dos *musks* nos produtos de origem, sendo esse um dos objetivos deste trabalho. Para levar a cabo esse objetivo, torna-se imperioso, antes de mais, escolher um método de análise para estes compostos.

2.6 Métodos analíticos para a determinação de *musks* em produtos de higiene

Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos métodos analíticos para a determinação dos *musks* em diferentes matrizes (águas, sedimentos, solos, ar, biota, amostras humanas, produtos de higiene e limpeza). A maioria deles utiliza cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) como técnica instrumental. No entanto, as amostras não poderão ser analisadas em bruto, sendo necessário haver primeiramente uma preparação, dada a necessidade de eliminar interferentes e pré-concentrar as amostras. Para tal, diversas técnicas de extração têm sido empregues.

2.6.1 Técnicas de extração

Neste capítulo, serão apenas abordadas técnicas de extração utilizadas na determinação de *musks* em produtos de higiene e cuidado pessoal.

2.6.1.1 Extração líquido-líquido (LLE)

Esta técnica tem por base os princípios de transferência de massa. Uma amostra líquida contacta com um solvente orgânico imiscível, de forma a extrair os analitos de interesse.

Assim, é esperado que o analito, tendo mais afinidade para o solvente orgânico, migre para a fase rica no solvente de extração. Logo, a eficiência da extração depende da afinidade do analito pelo solvente de extração, da quantidade de solvente utilizada e do número de extrações (Lee *et al.*, 2012).

A extração líquido-líquido apresenta as vantagens de ser simples e poder utilizar diversos tipos de solventes, consoante os compostos em estudo (seleção por questões de solubilidade e seletividade) (Queiroz *et al.*, 2001). Por outro lado, esta técnica possui uma série de desvantagens, de onde se destacam:

- Perdas de analito em amostras com elevada afinidade com a água (os analitos são apenas parcialmente extraídas pelo solvente orgânico);
- Possíveis impurezas e/ou contaminantes do solvente também são concentradas conjuntamente com a amostra;
- Possível formação de emulsões;
- Utilização de volumes relativamente elevados de amostra e de solventes;
- Alguns solventes orgânicos utilizados usualmente são tóxicos;
- Processo suscetível a erros e de difícil automação.

Apesar destas desvantagens, a extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de preparação de amostras e tem sido largamente utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em diversas matrizes (Queiroz *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012).

2.6.1.2 Extração em fase sólida (SPE)

Conjuntamente com a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida (SPE) é um dos métodos mais utilizados no pré-tratamento das amostras. A extração em fase sólida ocorre fundamentalmente em 4 etapas (Kuklennyik *et al.*, 2007):

- i. Condicionamento com solvente adequado das colunas SPE, ativando os centros disponíveis de modo a assegurar as interações entre os analitos e os grupos funcionais do sorvente;
- ii. Introdução da amostra, ocorrendo a retenção do analito;
- iii. Lavagem do sorvente de modo a retirar possíveis interferentes que tenham ficado retidos na coluna;
- iv. Eluição e captação do analito, recorrendo a solventes orgânicos adequados.

Em termos comparativos com a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida pode reduzir o tempo necessário de preparação da amostra e consome uma pequena quantidade de solventes (He *et al.*, 2007).

2.6.1.3 Extração por ultrassons (USE)

Este é um método de extração de compostos orgânicos não voláteis e semi-voláteis usualmente a partir de solos, lamas e resíduos sólidos. Neste tipo de extração, a amostra é colocada em contacto com um solvente e este sistema é introduzido num banho de ultrassons. As ondas ultrassónicas propagam-se a alta velocidade através do solvente de extração, provocando a formação de bolhas de cavitação. Quando estas bolhas colapsam junto da superfície da amostra, as ondas de choque resultantes promovem a migração dos analitos para a fase líquida. A extração por ultrassons é mais rápida do que os métodos convencionais e permite um consumo mais baixo de solventes (Babić *et al.*, 1998). No entanto, este método não é o mais adequado para aplicações em que a concentração de analitos na amostra é relativamente baixa (Trinity College, 1996).

2.6.1.4 Extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)

A extração por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) é baseada em vários princípios físico-químicos envolvendo forças mecânicas aplicadas à amostra e as interações entre a matriz e um suporte sólido (Barker, 2007). Neste processo, a amostra é colocada num almofariz contendo um suporte sólido adequado. Estes são misturados manualmente, utilizando um pilão, promovendo o rompimento da estrutura física da amostra.. O material resultante é então transferido e empacotado numa coluna adequada para a realização de eluição sequencial com solventes apropriados (Kristenson e Brinkman, 2006).

Esta técnica tem sido utilizada como alternativa às metodologias clássicas de extração em fase sólida (SPE), pois requer apenas cerca de 5% da quantidade de solvente utilizada nos métodos tradicionais e pode ser realizada de uma forma mais célere. Para além disso, o MSPD é uma técnica que apresenta custos mais baixos e possibilita a realização simultânea da extração e cleanup das amostras (Barker, 2007; Barker, 2000).

2.6.1.5 Método QuEChERS

O método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) para extração de pesticidas de alimentos (Anastassiades *et al.*, 2003).

Este método tem por base três etapas. Primeiro, a amostra é extraída com o auxílio de um solvente orgânico, normalmente acetonitrilo (ACN) e, em seguida, são adicionados sais anidros e/ou tampões como o sulfato de magnésio, cloreto de sódio, acetato de sódio, etc. Estes irão garantir uma melhor separação de fases, permitindo que os compostos sejam extraídos para a fase orgânica. Na terceira etapa, é efetuado um *clean-up* através de um processo de extração dispersiva em fase sólida (d-SPE), de modo a remover possíveis interferentes. Utilizam-se sorventes como o PSA (Amina primária/secundária) para remoção de compostos polares, ácidos gordos, açúcares, ácidos orgânicos e alguns lípidos iónicos e o C₁₈ para remoção de compostos apolares como lípidos. É importante notar que a seleção dos sorventes e proporções em que são utilizados são de extrema importância para evitar a co-extração de compostos alvo na etapa de *clean-up*, o que diminuiria a eficácia do processo de extração (CVUA, 2013).

Os QuEChERS têm sido utilizados com sucesso na extração de pesticidas, produtos farmacêuticos, compostos organoclorados, fenóis em diversas matrizes (Rouvière *et al.*, 2012).

As principais vantagens desta metodologia de extração são a rapidez, facilidade de implementação (requer um menor processamento da amostra), necessidade de baixas quantidades de solvente e o baixo custo quando comparado com o das técnicas convencionais de extração em fase sólida. (Bragança *et al.*, 2012; Ciešlik *et al.*, 2011). Usando este método pode-se preparar cerca de 10 amostras a cada 30 min com um custo que não atinge 1€ por amostra (Ciešlik *et al.*, 2011).

Esta metodologia de QuEChERS ainda não foi amplamente aplicada como método de extração para determinação de *musks* em produtos de higiene e cuidado pessoal. Na verdade, a aplicação desta técnica a *musks* foi estudada pela primeira vez em 2012, pelo nosso grupo de investigação (Homem *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2013) e será utilizado na realização deste trabalho.

Acoplada às técnicas de extração estão os métodos instrumentais de análise, que permitirão identificar e quantificar os compostos nas amostras em estudo.

2.6.2 Métodos instrumentais de análise

Dos métodos utilizados para a análise de *musks* destacam-se a cromatografia gasosa acoplada a um detetor de captura de eletrões (GC-ECD), eletroforese capilar e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O GC-ECD é particularmente sensível a compostos halogenados, organometálicos e com grupos nitro (Skoog *et al.*, 2007). Por esta razão este método já foi usado para detetar MX e MK (Angerer e Käßlerlein, 1997) e (Rimkus *et*

al., 1999). Os compostos previamente separados provenientes da coluna cromatográfica são conduzidos através do gás de arraste para o detetor. Quando chegam a este detetor, o gás de arraste sofre ionização, formando-se eletrões. Os compostos orgânicos contendo grupos funcionais eletronegativos tendem a capturar esses eletrões, criando uma diminuição significativa no campo elétrico.

A eletroforese capilar consiste no transporte em solução eletrolítica de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, em que se consegue separar os solutos de acordo com as mobilidades eletroforéticas. Este método foi utilizado para a deteção de AHTN, HHCB, ATII e AHMI (Martínez-Girón *et al.*, 2010).

Quanto ao GC-MS, esta é a técnica mais utilizada para a determinação e será este o método instrumental escolhido para a elaboração deste trabalho, pelo que será descrito em maior detalhe o seu princípio de funcionamento.

2.6.2.1 Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia é um método físico de separação de substâncias em que os componentes a serem analisados são separados pela interação entre uma fase móvel e estacionária.

A cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa é um método analítico que combina a separação dos componentes da mistura ao longo do tempo (GC) com a caracterização dos componentes (MS). A figura 4 apresenta um esquema de um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa.

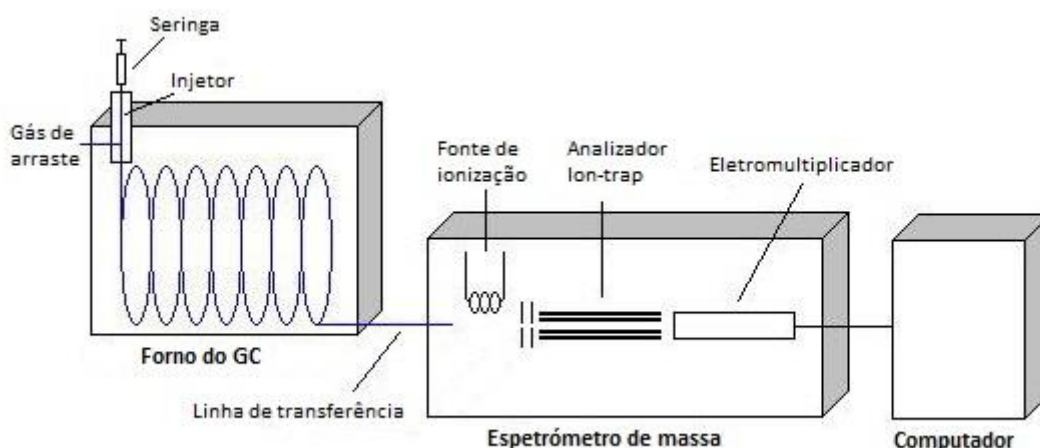


Figura 4 - Esquema dos componentes de um sistema de GC-MS. Adaptado de (ChemWiki, 2013)

A amostra é introduzida no injetor onde é vaporizada e entra em contato com o gás de arraste. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa para uma coluna cromatográfica

que é revestida por uma fase estacionária, onde ocorre a separação da mistura (Karaiskakis e Gavril, 2004). De seguida os compostos entram no detetor, permitindo a sua identificação e quantificação.

Devido à sua simplicidade, sensibilidade e efetividade para separar os componentes de misturas, a cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa, é uma das ferramentas mais importantes no trabalho de investigação. É utilizada em diversas pesquisas, nas quais se destacam as pesquisas médicas, biológicas, químicas, forenses. Destaca-se a área da química, onde se insere o tema desta tese – a pesquisa de *musks* em produtos de higiene e cuidado pessoal.

2.6.2.1.1 Gás de arraste

O gás de arraste desempenha um papel importante e deve ser escolhido em função do tipo de detetor utilizado. Este deve ser seco, livre de oxigénio e quimicamente inerte, não devendo reagir com a amostra em análise, tendo apenas a função de arrastar a amostra ao longo de toda a coluna cromatográfica. Os gases mais utilizados são o hélio, hidrogénio, azoto e o argón (Skoog *et al.*, 2007; Hübschmann, 2009).

2.6.2.1.2 Injetor

O injetor é um dispositivo que permite a introdução da amostra no sistema de cromatografia. A amostra pode ser introduzida no estado líquido (situação mais comum) ou adsorvida num suporte (fibra de SPME) ou ainda em gás. As amostras líquidas são injetadas com microseringas calibradas para o interior de uma câmara de vaporização, através de um septo de borracha. Esta deverá estar a uma temperatura tal que permita volatilizar rapidamente a amostra (de um modo geral, cerca de 50 °C acima da temperatura de ebulição do componente menos volátil da amostra). Hoje em dia, a maioria das injeções já não são efetuadas manualmente, mas recorrendo a injetores automáticos (*autosampler*). Apesar de existirem diversos tipos de injetores, os mais comuns são os de *split/splitless* (Hübschmann, 2009; Wake Forest University, 2013).

Este modo de funcionamento do injetor é utilizado quando têm de ser injetadas pequenas quantidades de amostra na coluna. Assim, a amostra injetada é vaporizada sendo que posteriormente dividida entre a coluna ou rejeitada consoante esteja o injetor em modo *split* ou *splitless*. Podem ser utilizados rácios de 20:1 até 500:1, onde a maior parte da amostra é

expelida, permitindo uma diminuição da quantidade dos analitos a analisar (Hübschmann, 2009; Skoog *et al.*, 2007).

2.6.2.1.3 Coluna cromatográfica

É na coluna que ocorre a separação dos compostos através das diferenças de ponto de ebulição e da afinidade entre os analitos e a fase estacionária que revestem as colunas. O tipo de colunas cromatográficas é classificado de acordo com o seu diâmetro interno, podendo a sua fase estacionária ser líquida ou sólida. Atualmente as colunas capilares são as mais utilizadas, pois são mais eficientes. Estas podem ainda ser divididas em colunas *wall coated open tubular* (WCOT) e *support coated open tubular* (SCOT). A primeira é composta apenas por um tubo capilar recoberto com uma fina camada de uma fase estacionária, enquanto na segunda, a superfície interior do capilar está recoberta por um suporte sólido e revestida com uma fase estacionária líquida (Skoog *et al.*, 2007).

As colunas cromatográficas estão inseridas dentro de um forno termostaticado, de modo a que a temperatura possa ser controlada. O ponto de ebulição dos analitos e dos solventes utilizados, conjuntamente com o grau de separação definem a temperatura ótima da coluna. Usualmente é efetuado um programa de temperaturas, quando as amostras contêm analitos numa ampla gama de pontos de ebulição.

A escolha de uma coluna com uma fase estacionária mais apropriada é fulcral para se conseguir uma separação entre os diferentes analitos que possam constituir a amostra. Assim, a fase estacionária deve apresentar afinidade com os compostos a analisar, de modo a que estes tenham um tempo de residência razoável dentro da coluna, ocorrendo uma separação adequada. Normalmente a polaridade da fase estacionária deve coincidir com a dos componentes da amostra, ou seja, compostos apolares devem ser analisados em colunas apolares e compostos polares em colunas polares (Jansen *et al.*, 2010; Hübschmann, 2009). Assim, numa coluna apolar a eluição é realizada por ordem crescente dos pontos de ebulição, enquanto numa coluna polar, para tempos de retenção semelhantes, a eluição é realizada por ordem crescente de polaridade (Hübschmann, 2009).

2.6.2.1.4 Detetor

O detetor de espectrometria de massa é o mais poderoso de todos os detetores de cromatografia gasosa. Tem por objetivo medir a razão de massa/carga (m/z) dos iões produzidos pela amostra (Skoog *et al.*, 2007).

A amostra é então ionizada e fragmentada, geralmente por uma fonte de iões. Como demonstra a figura 5, durante este processo, a amostra é bombardeada por eletrões que ionizam a molécula, fazendo com que estas percam um eletrão devido à repulsão eletrostática (Skoog *et al.*, 2007). Os iões produzidos chegam então ao analisador de massas. No caso deste trabalho experimental, um *ion trap* (armadilha de iões). Este tem como função alterar o campo elétrico e magnético no interior do dispositivo, para que as trajetórias dos iões capturados com razão massa/carga consecutiva se tornem sequencialmente instáveis e os iões tenham de abandonar o *ion trap* por ordem da sua razão massa/carga. Na saída os iões atingem um detetor, fornecendo um sinal (March, 2000).

A espectrometria de massa também é aplicada para a obtenção de informação mesmo quando os compostos não são completamente separados. A natureza do detetor MS permite a quantificação de mais do que um composto mesmo co-eluídos, desde que os iões apresentem razões massa/carga diferentes.

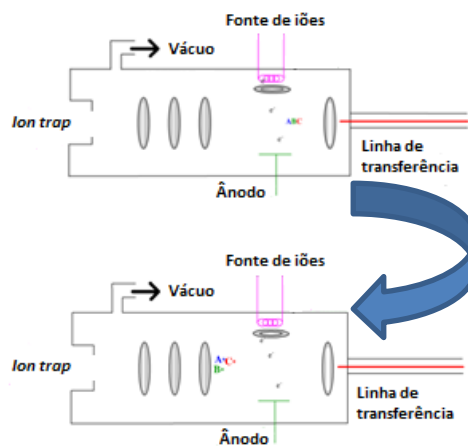


Figura 5 - Esquema de funcionamento da fonte de iões. Adaptado de (ChemWiki, 2013)

2.6.2.1.5 Análise de dados

A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa faz com que no resultado desta junção de equipamentos se gerem várias informações finais. Como tal, no fim de cada análise obtêm-se duas representações gráficas: intensidade de sinal em função do tempo de retenção (cromatograma) e a intensidade do sinal em função da razão massa/carga (espectro de massa).

A aquisição dos dados pode ocorrer em *full-scan* ou *selected ion storage* (SIS). No primeiro caso, o cromatograma obtido é resultado da soma de todos os sinais detetados pelo espectrómetro de massa, ou seja, desde o valor mais baixo de m/z até ao mais elevado. O segundo apenas tem em conta uma determinada gama de valores m/z . Deste modo é aumentada a sensibilidade do método, o que por vezes conduz à diminuição do valor do limite de deteção do método. Apesar destas vantagens, o SIS fornece uma informação qualitativa limitada pois não é criado um espectro de massa característico para os compostos alvo.

3 Estado da Arte

Nesta secção irão ser apresentados estudos já publicados sobre a determinação de *musks* sintéticos em produtos de higiene e cuidado pessoal, dando especial ênfase aos procedimentos de extração e *clean-up*, aspetos instrumentais e concentrações detetadas nestas matrizes.

Esta é uma área emergente e os estudos sobre os *musks* têm vindo a aumentar de ano para ano. São imensas as matrizes em estudo, desde ar, água, solo, biota, lamas, etc., mas estudos aplicados a produtos de higiene são ainda reduzidos. Tal como mencionado anteriormente, os produtos de higiene são a principal fonte de *musks*. Torna-se, portanto, essencial estudar as concentrações e distribuições destes analitos nestas matrizes, para que se possa avaliar a exposição humana e ambiental associada ao uso destes produtos. Na Tabela 7 estão sumarizados os artigos sobre a determinação de *musks* em produtos de higiene.

Reinner e Kannan (2006) analisaram três *musks* (*galaxolide*, *tonalide* e um produto de degradação do *galaxolide*, o HHCB-lactona) em diferentes produtos de higiene e de limpeza. Para isso recorreram à tradicional extração líquido-líquido (LLE) com um solvente orgânico e analisaram os extratos obtidos por GC-MS. Estes autores obtiveram uma recuperação média de 123% e limites de deteção na ordem dos 5 ng.g⁻¹.

Roosens *et al.* (2007) seguiram um procedimento similar ao descrito anteriormente, mas utilizaram água como co-solvente na extração dos *musks*. Antes da injeção em GC-MS, estes autores optaram por passar o extrato por uma coluna de sílica (processo de *cleanup*) de modo a remover possíveis interferentes. A sua eluição foi efetuada com hexano e diclorometano. Este processo conduziu a percentagens de recuperação elevadas (74-138%) e limites de quantificação baixos (3 - 17 ng.g⁻¹). Nas análises efetuadas aos produtos de higiene e limpeza verificaram que o *galaxolide* (HHCB) foi o *musk* detetado em maior concentração (22 mg.g⁻¹), enquanto o *tonalide* (AHTN) foi o mais frequentemente detetado nas amostras (70%), seguido pelo *galaxolide* (55% das amostras). Estes autores também verificaram que os *musks* sintéticos se encontravam presentes em maiores concentrações nos perfumes, loções corporais e produtos de banho.

Zhang *et al.* (2008) também combinaram a extração líquido-líquido com uma etapa de *cleanup*. No entanto, para esta última etapa optaram por utilizar uma coluna de sílica/alumina. Este método conduziu a percentagens de recuperação um pouco mais baixas do que os métodos referidos anteriormente (62-83%). Com este estudo os autores verificaram que a maioria dos produtos analisados continha *musks*. O *galaxolide* e a *tonalide* foram detetados em 61% e 36%, respetivamente, das amostras analisadas. No entanto, poucas amostras

continham nitro *musks* (16% *musk ketone* e 6% *musk xylene*). Os *musks* policíclicos foram detetados com concentrações na ordem dos $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Martínez-Girón *et al.* (2010) desenvolveram um trabalho similar a Roosens *et al.* (2007), diferindo apenas no método de análise. Estes autores optaram por utilizar a eletroforese capilar para separar e quantificar *musks* policíclicos quirais em amostras de perfumes. Este método apresenta limites de quantificação mais elevados do que os obtidos pelos autores mencionados anteriormente, não sendo por isso adequado para a análise de produtos que contenham *musks* a níveis baixos de concentração. Martínez-Girón *et al.* (2010) detetaram *galaxolide* e *tonalide* nas amostras analisadas ($14,5 \pm 1,3 \text{ mg.g}^{-1}$ e $9,6 \pm 0,7 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente).

Lu *et al.* (2011) utilizaram o método reportado por Reinner e Kannan (2006) para a determinação de *musks* em diferentes produtos de higiene, mas introduziram algumas modificações. Estes autores recorreram à extração por ultrassons com solventes orgânicos (hexano e hexano/acetato de etilo, 1:1 v/v). Efetuaram o *cleanup* utilizando cartuchos de SPE contendo sílica gel. Esta metodologia conduziu a elevadas percentagens de recuperação (81,7 - 91,6%) e baixos limites de quantificação ($0,50 - 3,01 \text{ ng.g}^{-1}$). Tal como referido anteriormente, a extração em ultrassons tem a vantagem de ser mais rápida do que os métodos convencionais e permitir um consumo mais baixo de solventes. Para além disso, requer um menor processamento da amostra do que a extração líquido-líquido convencional. Neste estudo, os autores verificaram que mais de 80% das amostras analisadas continham pelo menos um *musk* e que o *galaxolide* era o composto predominante (apresentava a concentração mais elevada em 52% das amostras) e mais frequentemente detetado (73%). Verificaram também que as concentrações mais elevadas foram detetadas em produtos de cabelo ($50,3 \text{ mg.g}^{-1}$) e sabonetes ($27,8 \text{ mg.g}^{-1}$).

Sanchez-Prado *et al.* (2011) e Lopez-Gazpio *et al.* (2012) também investigaram a presença de *musks* em perfumes. Devido às elevadas concentrações esperadas neste tipo de amostras, os autores optaram por apenas diluí-las num solvente apropriado. No primeiro estudo, os autores correram à análise por GC-MS, enquanto no segundo utilizaram cromatografia eletrocínética micelar. Ambos os estudos conduziram a recuperações elevadas (94,1-107%), embora no primeiro caso os limites de deteção sejam mais baixos. Uma vez mais, o *galaxolide* foi o *musk* detetado em maior concentração.

Llompart *et al.* (2013) desenvolveram uma nova metodologia para a análise de diversos *musks* sintéticos em produtos de higiene. Para isso recorreram à extração dispersiva em fase sólida (MSPD) e analisaram os extratos obtidos por GC-MS. Na extração utilizaram sulfato de sódio como agente exsicante e Florisil como agente dispersivo. Esta mistura foi colocada numa

pequena coluna e os analitos foram eluídos com acetato de etilo. As recuperações obtidas neste estudo variaram entre 85 e 105% e os limites de deteção entre 1,2 e 37 ng.g⁻¹. Os valores obtidos são semelhantes aos descritos nos trabalhos mencionados anteriormente. Neste estudo os autores verificaram ainda que em todas as amostras analisadas o *galaxolide* estava presente e que este, conjuntamente com o *tonalide* eram os compostos presentes em maior abundância. Por outro lado, observaram que as concentrações de *musks* eram superiores em produtos que deverão ser mantidos na pele após aplicação, como por exemplo, cremes corporais e faciais, desodorizantes e *aftershaves*. A metodologia aplicada neste estudo tem como principais vantagens a sua elevada eficiência e baixo custo de extração.

No nosso grupo de investigação já foram desenvolvidos dois estudos sobre a determinação de *musks* em vários produtos de higiene. Um primeiro estudo, desenvolvido por Correia *et al.* (2013), focou-se na implementação de uma técnica simples de extração através de QuEChERS para avaliar a presença de *galaxolide*, recorrendo a HPLC com deteção de fluorescência. Numa primeira etapa as amostras foram extraídas com o auxílio de um solvente orgânico em ultrassons e em seguida foi adicionado MgSO₄ e NaCH₃COO. Estes sais foram utilizados para garantir uma melhor separação de fases, permitindo que os compostos fossem extraídos para a fase orgânica. Numa terceira etapa, foi efetuado o *cleanup* através de um processo de extração dispersiva em fase sólida (sorventes: PSA e C₁₈), de modo a remover possíveis interferentes. Um segundo estudo, com base na mesma metodologia de extração e análise por GC-MS, foi implementado por Homem *et al.* (2013). Este novo método permitiu a deteção de 12 *musks* em diversos produtos de higiene. Os limites de deteção variaram entre 0,01 e 15,80 ng.g⁻¹ e as recuperações entre 40-109%. De uma forma geral, os limites de deteção obtidos neste método foram inferiores aos obtidos nos estudos anteriormente referidos. Na verdade esta metodologia de extração e *cleanup* é vantajosa quando comparada com as técnicas mais tradicionais: é mais célere, requer menos manuseamento dos extratos (evitando por isso perdas e risco de contaminação cruzada), utiliza volumes reduzidos de solvente (normalmente são solventes não clorados) e é menos dispendiosa. Com este trabalho foi ainda possível concluir que o *galaxolide* (83%) e o *exaltolide* (75%) foram os compostos mais frequentemente detetados e que concentrações mais elevadas de *musks* foram detetadas em hidratantes e produtos de banho e cabelo, enquanto as pastas de dentes apresentaram os níveis mais baixos destes compostos. As concentrações de *musks* detetadas nestas amostras variaram entre 2 e 882340 ng.g⁻¹. Esta será a metodologia utilizada na realização deste trabalho.

Assim, tendo por base esta pesquisa bibliográfica verifica-se que o *galaxolide* e o *tonalide* são os *musks* mais frequentemente detetados e, de uma forma geral, cujas concentrações

apresentam níveis mais elevados. Os produtos de higiene com maior teor de *musks* são os perfumes, loções/cremes, produtos de banho e de cabelo.

Tabela 7 - Resumo dos métodos analíticos utilizados para determinação dos *musks* em produtos de higiene

Matriz	Analitos	Método		% Rec	LD (ng.g ⁻¹)	LQ (ng.g ⁻¹)	C (ng.g ⁻¹)	Referências
		Extração	Análítico					
Perfumes, loções corporais, desodorizantes géis de banho, sabonetes e espumas de barbear, produtos de cabelo e produtos de limpeza	HHCB						<5 – 4,99x10 ⁶	Reiner & Kannan (2006)
	HHCB-lactona	100 – 500 mg amostra LLE (3x5 mL HEX, 5 min)	GC-MS	123 ± 0,6	5	---	<5 – 2,17x10 ⁵	
	AHTN						<5 – 4,51x10 ⁵	
Loções corporais, perfumes, desodorizantes, produtos de cuidado de cabelo e banho, e produtos de limpeza	AHTN	50 – 200 mg amostra		74 - 85		4	5 – 8,0x10 ⁶	Roosens <i>et al.</i> (2007)
	HHCB	LLE (0,5 mL H ₂ O + 3 mL HEX)	GC-MS	98 - 110	---	17	20 - 2,2x10 ⁷	
	MK	SPE (300 mg Na ₂ SO ₄ + 500 mg sílica-gel; 2 mL HEX + 6 mL DCM)		81 - 102		3	<3 – 5,0x10 ²	
	MX			90 - 138		3	<3 – 2,6x10 ⁴	
Perfumes, gel banho, sabonete líquido de mãos, sabonete líquido facial, champô, pasta de dentes e cremes faciais e corporais, amaciador de roupa e detergente	DPMI			79,2	3	6	n.d.	Zhang <i>et al.</i> (2008)
	ADBI			73,8	2	4	n.d.	
	AHMI			75,4	2	4	n.d.	
	ATII	? mg amostra LLE (3x HEX)	GC-MS	71,1	3	6	n.d.	
	AHTN	SPE (coluna de sílica/alumina)		83,4	3	6	<3 – 4,69x10 ⁴	
	HHCB			77,8	3	6	<3 – 8,04x10 ⁵	
	MK			68,7	3	6	9x10 ⁴ – 2x10 ⁵	
	MX			62,3	3	6	3x10 ⁵ – 5x10 ⁵	
Perfumes	AHTN				25 mg.L ⁻¹	75 mg.L ⁻¹	(9,6±0,7)x10 ⁶	Martínez-Girón <i>et al.</i> (2010)
	HHCB	100 mg amostra LLE (0,5 mL H ₂ O + 3 mL HEX)	Eletroforese capilar	90 - 116	49 mg.L ⁻¹	147 mg.L ⁻¹	(14,5±1,3)x10 ⁶	
	ATII	SPE (300 mg Na ₂ SO ₄ + 500 mg sílica-gel; 2 mL HEX + 6 mL DCM)			26 mg.L ⁻¹	78 mg.L ⁻¹	n.d.	
	AHMI				---	---	n.d.	
Pasta de dentes, champôs, condicionadores, produtos de cuidado de corpo, sabonetes, loções corporais e maquiagem	AHTN					2,33	<2,33 – 2,25x10 ⁵	Lu <i>et al.</i> (2011)
	HHCB	300-500 mg amostra USE (2 x 5 mL HEX, 20 min + 5 mL EA/HEX (1:1), <i>overnight</i>)	GC-MS	81,7 - 91,6	---	3,01	<3,01 – 1,01x10 ⁶	
	HHCB-lactona					1,28	<1,28 – 5,09x10 ⁴	
	MK	SPE (200 mg Na ₂ SO ₄ + 500 mg sílica-gel; 6 mL HEX + 5 mL DCM)				1,02	<1,02 – 8,23x10 ⁴	
	MX					0,50	<0,50 – 1,22x10 ⁴	

Rec – Recuperação; LD – Limite de Detecção; LQ – Limite de Quantificação; C – Concentração; HEX – Hexano; DCM – Diclorometano; EA – Acetato de etilo; n.d. – não detetado.

Tabela 7 - Resumo dos métodos analíticos utilizados para determinação dos *musks* em produtos de higiene (cont.)

Matriz	Analitos	Método		% Rec	LD (ng.g ⁻¹)	LQ (ng.g ⁻¹)	C (ng.g ⁻¹)	Referências
		Extração	Analítico					
Perfumes	DPMI	Diluições (acetato de etilo)	GC-MS	107 ± 2,9	4,8x10 ⁻⁷ (% w/v)		<1,7x10 ⁻¹ (% w/v)	Sanchez-Prado <i>et al.</i> (2011)
	ADBI			92,8 ± 5,1	2,0x10 ⁻⁷ (% w/v)		<5,8x10 ⁻² (% w/v)	
	AHMI			101 ± 2,8	1,9x10 ⁻⁷ (% w/v)		<4,8x10 ⁻³ (% w/v)	
	MA			99,2 ± 3,5	1,0x10 ⁻⁶ (% w/v)		<LQ	
	ATII			96,8 ± 4,8	2,5x10 ⁻⁷ (% w/v)		<6,8x10 ⁻³ (% w/v)	
	HHCB			---	2,1x10 ⁻⁷ (% w/v)	---	<1,6 (% w/v)	
	MX			100 ± 2,1	1,1x10 ⁻⁶ (% w/v)		<6,5x10 ⁻⁴ (% w/v)	
	AHTN			94,1 ± 3,6	2,7x10 ⁻⁷ (% w/v)		<1,3(% w/v)	
	MM			102 ± 2,3	2,3x10 ⁻⁷ (% w/v)		<1,3x10 ⁻¹ (% w/v)	
	MT			107 ± 6,1	1,1x10 ⁻⁶ (% w/v)		<LQ	
MK	99,6 ± 7,0	8,8x10 ⁻⁷ (% w/v)		<3,8x10 ⁻¹ (% w/v)				
Perfumes	AHTN	Diluições (solução contendo NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄ , NaH ₂ PO ₄ e CH ₃ NO)	MECK-DAD		6,5 mg.L ⁻¹	19,4 mg.L ⁻¹	(2,6 – 19,3)x10 ⁶	Lopez-Gazpio <i>et al.</i> (2012)
	HHCB			95,7 – 106,7	3,7 mg.L ⁻¹	11,1 mg.L ⁻¹	n.d. – 23,8x10 ⁶	
	ATII				3,3 mg.L ⁻¹	9,9 mg.L ⁻¹	n.d. – 15,6x10 ⁶	
Loções corporais, cremes, sabonetes, champôs, condicionadores, pastas de dentes	HHCB	2000 mg amostra USE (5 mL H ₂ O + 15 mL ACN, 10 min) QuEChERS (6000 mg MgSO ₄ + 1500 mg NaCH ₃ COO/ 900 mg MgSO ₄ + 300mg PSA + 150 mg C ₁₈)	HPLC-FL	65-95	1	---	40 – 2,80x10 ⁵	Correia <i>et al.</i> (2013)

Rec – Recuperação; LD – Limite de Detecção; LQ – Limite de Quantificação; C – Concentração; MECK-DAD – cromatografia eletrocínica micelar capilar com detecção de díodos; HPLC-FL – cromatografia gasosa com detecção de fluorescência; n.d. – não detetado.

Tabela 7 - Resumo dos métodos analíticos utilizados para determinação dos *musks* em produtos de higiene (cont.)

Matriz	Analitos	Método		% Rec	LD (ng.g ⁻¹)	LQ (ng.g ⁻¹)	C (ng.g ⁻¹)	Referências
		Extração	Analítico					
Géis de banho e champôs, gel das mãos, sabonetes, hidratantes, desodorizantes e pastas de dentes	DPMI			81 – 109	0,49		n.d. – 1,13x10 ⁴	
	ADBI			45 – 97	0,34		n.d. – 3,28x10 ²	
	AHMI			43 – 97	0,17		n.d. – 3,01x10 ²	
	EXA			48 – 102	3,33		n.d. – 9,04x10 ⁴	
	MA	500 mg amostra USE (3 mL ACN, 10 min)		64 – 102	3,75		n.d.	
	HHCB	QuEChERS (2400 mg MgSO ₄ + 750 mg NaCH ₃ COO/ 180 mg MgSO ₄ + 60mg PSA + 30 mg C ₁₈)	GC-MS	42 – 100	0,01	---	n.d. – 8,82x10 ⁵	Homem <i>et al.</i> (2013)
	MX			63 – 109	15,80		n.d.	
	AHTN			41 – 108	8,33		n.d. – 2,03x10 ⁵	
	MM			40 – 101	5,77		n.d.	
	MT			42 – 106	3,16		n.d.	
MK			36 - 109	2,70		n.d.		
Sabonetes líquidos, loções corporais, cremes, esfoliantes, champôs, condicionadores, espumas e géis de cabelo, <i>aftershaves</i>	DPMI				1,2	4,1	n.d. – 4,22x10 ⁵	
	ADBI				2,0	6,6	n.d. – 3,34x10 ³	
	AHMI				2,0	6,7	n.d. – 6,54x10 ³	
	MA				5,8	19	n.d. – 9,73x10 ²	
	ATII	100 mg amostra			8,1	27	n.d. – 4,10x10 ²	
	HHCB	MSPD (200 mg Na ₂ SO ₄ + 400 mg Florisil, 5 min)	GC-MS	85 – 105	5,2	11	n.d. – 9,98x10 ⁵	Llompart <i>et al.</i> (2013)
	MX	SPE (mistura proveniente do MSPD +100 mg Florisil, 1 mL EA)			4,9	16	n.d. – 2,99x10 ⁵	
	AHTN				3,9	11	n.d. – 1,96x10 ⁶	
	MM				1,9	6,3	n.d.	
	MT				3,5	11	n.d. – 27,5	
Ambrettolide				37	130	n.d. – 8,40x10 ²		
MK				3,0	10	n.d. – 6,21x10 ³		

Rec – Recuperação; LD – Limite de Detecção; LQ – Limite de Quantificação; C – Concentração; n.d. – não detetado

4 Descrição Técnica

4.1 Reagentes

Neste trabalho foram estudados doze *musks* (5 nitro *musks*, 5 policíclicos e 2 macrocíclicos). Os padrões sólidos dos *musks* policíclicos sintéticos *cashmeran*, *celestolide*, *galaxolide*, *phantolide* e *tonalide* foram adquiridos à empresa LGC Standards (Barcelona, Espanha) com 99% pureza, exceto para o *galaxolide* que continha aproximadamente 25% de dietilftalato (DEP). O *musk tibetene* e *muks moskene* (10 mg.L⁻¹ em ciclohexano) foram também comprados à empresa LGC Standards. O *musk ambrette* e o *musk ketone* foram adquiridos como padrões de sólidos à empresa Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha) com 99% e 98% de pureza, respetivamente. O *musk xylene* foi obtido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) como uma solução de 100 mg.L⁻¹ em acetonitrilo. O *exaltolide* e o *ethylene brassylate* também foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich com ≥95% e ≥99% de pureza, respetivamente.

O sulfato de magnésio e acetato de sódio utilizados na preparação dos QuEChERS foram adquiridos à Sigma-Aldrich, enquanto os sorbentes PSA e C₁₈ à Supelco (Bellefonte, PA, EUA). O sulfato de magnésio utilizado nas experiências foi previamente *mufado* a 450 °C durante 12 h. Todos os solventes orgânicos (grau analítico) foram adquiridos à VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

4.2 Preparação de padrões

Para cada *musk* foram preparadas soluções *stock* individuais em ciclohexano contendo 13 g.L⁻¹, exceto para o *exaltolide* e *ethylene brassylate* (10 g.L⁻¹), *musk ambrette* e *ketone* (7 g.L⁻¹).

Uma solução *stock* intermédia de concentração 10 mg.L⁻¹ contendo todos os *musks* policíclicos e macrocíclicos e os *musks ambrette* e *ketone* foi preparada em acetonitrilo através da diluição de quantidades apropriadas das soluções *stock* individuais. A solução *stock* final foi obtida através da evaporação em azoto de quantidades apropriadas do *musk tibetene* e *moskene*, seguida da adição das quantidades necessárias da solução intermédia anteriormente preparada e do padrão individual de *musk xylene*, perfazendo o volume com acetonitrilo. Os padrões de calibração (5 - 4000 µg.L⁻¹) foram preparados em acetonitrilo a partir da solução *stock*. Um padrão de controlo de 400 µg.L⁻¹ em acetonitrilo foi injetado diariamente no GC-MS. Todas as soluções foram armazenadas e conservadas a -20 °C e protegidas da luz.

4.3 Amostras

Um total de 119 produtos de beleza e de cuidado pessoal foram comprados em lojas de retalho no Porto (Portugal) em 2012/2013. As amostras foram divididas em 5 categorias de acordo com a sua composição: perfumes ($n=19$), produtos de corpo e cabelo ($n=54$), desodorizantes ($n=12$), pasta de dentes ($n=12$) e hidratantes ($n=22$). Para cada categoria, foram selecionadas as marcas mais vendidas no grande Porto, tendo em conta os dados fornecidos pelas maiores cadeias retalhistas do país e por uma empresa revendedora de perfumes. Na tabela 8 encontra-se uma descrição mais detalhada destes produtos.

Tabela 8 - Resumo dos produtos de cuidados pessoais investigados

Categoria	Tipo	<i>n</i>	Categoria	Tipo	<i>n</i>
Perfumes ($n=19$)	Perfume	19	Pasta de dentes ($n=12$)	Pasta de dentes	6
				Pasta de dentes criança	6
Produtos de corpo e cabelo ($n=54$)	Gel banho	10	Hidratantes ($n=22$)	Creme de mãos	4
	Gel banho criança	10		Cremes faciais	4
	Sabonete líquido mãos	7		Loção corporal	2
	Champô	11		Loção corporal criança	4
	Champô criança	8		Leite corporal	2
	Condicionador	8		Leite corporal criança	2
Desodorizantes ($n=12$)	Roll-on	12	Creme corporal	4	

n - número de amostras em cada categoria

4.4 Método de extração e *cleanup*

O método de extração e *cleanup* utilizado neste trabalho foi anteriormente desenvolvida no grupo de investigação (Homem *et al.*, 2013). De uma forma resumida, 500 miligramas de cada amostra foi pesada para um tubo de polipropileno de fundo cónico e adicionou-se 3 mL de acetonitrilo. De seguida, as amostras foram agitadas em vórtex durante 3 minutos e sujeitas a ultrassons durante 10 min. O primeiro QuEChERS (2400 mg de $MgSO_4$ e 750 mg de $NaCH_3COO$) foi então adicionado e a mistura foi novamente agitada em vórtex durante mais 3 min. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a 3700 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi transferido para o tubo que continha o segundo QuEChERS (180 mg $MgSO_4$, 60 mg PSA e 30 mg de C_{18}). Mais uma vez, as amostras foram agitadas (3 min) e centrifugadas. O sobrenadante foi retirado para frascos de vidro âmbar e concentrado a 1 mL sob uma corrente suave de azoto, sendo posteriormente analisado por GC-MS. Sempre que necessário, os extratos foram diluídos para um volume adequado e reanalisados. Esta metodologia encontra-se resumida no fluxograma da figura 6. Já para os perfumes, a metodologia utilizada

envolveu apenas diluições das amostras originais de forma a conseguir-se uma correta análise pelo GC-MS.

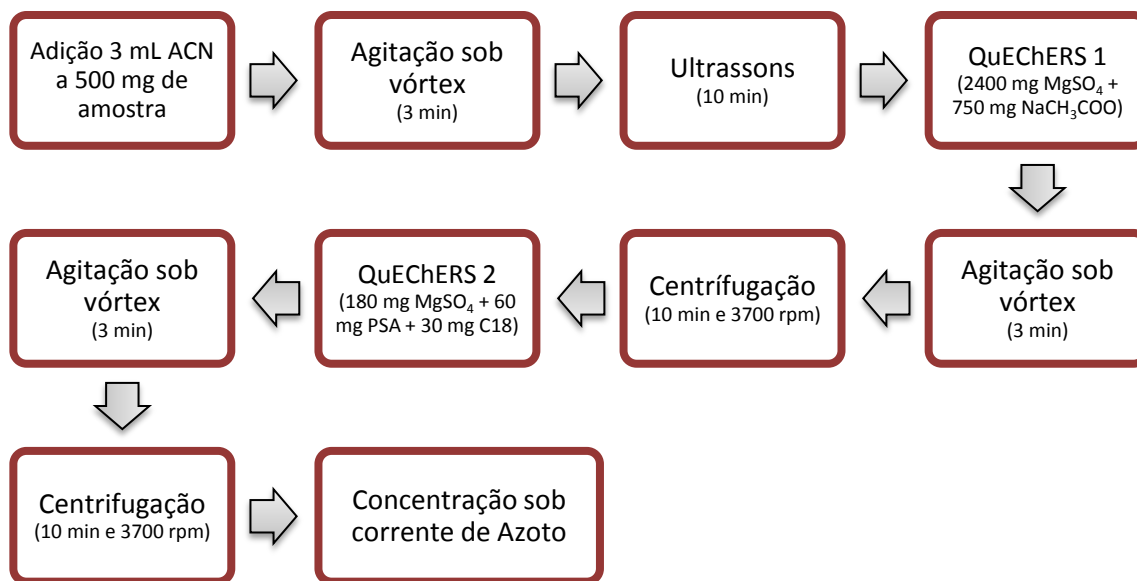


Figura 6 - Fluxograma da metodologia QuEChERS

4.5 Instrumentação

Os *musks* foram analisados através de um sistema Varian *Ion Trap* GC-MS (Walnut Creek, CA, EUA), equipado com um cromatógrafo 450-GC, um espectrómetro de massa com *Ion trap* 240-MS, um injetor *split/splitless* CP-1177, um *autosampler* modelo CP-8410 e um sistema de aquisição de dados Varian *MS workstation* (v. 6.9.3). O espectrómetro de massa equipado com *ion trap* utilizou como modo de ionização o impacto de eletrões (EI, 70 eV). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna capilar Varian CP-Sil 8 CB (50 m x 0,25 mm i.d., 0,12 µm) combinada com uma pré-coluna desativada FS (5 m x 0,530 mm i.d.) da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA). O programa de temperaturas utilizado no forno foi a seguinte: 60 °C (manter 1 min), subir a temperatura a uma taxa de 6 °C.min⁻¹ até 150 °C (manter 10 min), de seguida subir novamente a uma taxa de 6 °C.min⁻¹ até 225 °C e finalmente subir a 20 °C.min⁻¹ até atingir 300 °C (manter 2,5 min). O tempo total de análise foi de cerca de 45 min.

O gás de arraste utilizado foi hélio com uma pureza de 99,999%, a um fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹. A injeção (1 µL) foi efetuada em modo *splitless* (durante 5 min) e a temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. As temperaturas do *manifold*, *ion trap* e da linha de transferência foram mantidas a 50, 250 e 250 °C, respetivamente. A corrente de emissão do

filamento foi de 50 μ A. A análise dos compostos-alvo foi efetuada em modo SIS (*selected ion storage*).

Os tempos de retenção, bem como os iões de identificação e quantificação de cada *musk* estão referenciados na Tabela 9.

Tabela 9 - Iões de identificação e de quantificação e tempo de retenção de cada *musk*

Composto	Tempo de retenção (min)	Ião de identificação (m/z)	Iões de quantificação (m/z)
<i>Cashmeran</i>	19,90	191	163 + 135
<i>Celestolide</i>	29,26	229	173 + 244
<i>Phantolide</i>	30,70	229	187 + 171
<i>Exaltolide</i>	32,77	67	83 + 69
<i>Musk ambrette</i>	32,94	253	91 + 77
<i>Galaxolide</i>	33,42	243	213 + 128
<i>Musk xylene</i>	33,67	282	115 + 128
<i>Tonalide</i>	33,78	243	159 + 244
<i>Musk moskene</i>	34,30	263	128 + 115
<i>Musk tibetene</i>	35,47	251	115 + 128
<i>Musk ketone</i>	36,50	279	128 + 115
<i>Ethylene brassylate</i>	37,08	83	98 + 227

4.6 Controlo de qualidade

Os *musks* estão presentes numa grande variedade de produtos de higiene e cuidado pessoal. Por essa razão, a análise destes compostos requer alguns cuidados a fim de evitar a contaminação das amostras. Os detergentes usados no laboratório e cosméticos pessoais foram evitados por parte de todo o pessoal do laboratório durante o período em que as amostras foram manuseadas e extraídas. Em cada lote de extrações foram sempre efetuados brancos. Nestes brancos foram detetados em níveis vestigiais HHCB, DPMI e EXA. Os valores encontrados no branco foram subtraídos a todas as concentrações obtidas. Foram também efetuados brancos cromatográficos, tendo-se verificado que não existia qualquer “efeito de memória”.

4.7 Acondicionamento, destino e tratamento de resíduos

Os resíduos líquidos gerados consistiam geralmente em soluções orgânicas contendo acetoneitrilo e vestígios de *musks*, enquanto os sólidos em misturas de diferentes sorventes como $MgSO_4$, $NaCH_3COO$, PSA e C_{18} . Todos estes resíduos foram recolhidos em recipientes fechados devidamente etiquetados e foram armazenados longe da luz e de fontes de ignição para posterior tratamento de resíduos por parte do EcoFEUP (Sistema de Gestão Ambiental da FEUP).

5 Resultados e Discussão

5.1 Validação do Método Analítico

Tal como mencionado anteriormente, neste estudo foi utilizada uma metodologia de QuEChERS associada à deteção por GC-MS para a determinação de *musks* em produtos de higiene e cuidado pessoal. Esta metodologia foi previamente desenvolvida e otimizada no grupo de investigação (Homem *et al.*, 2013). A quantificação dos doze *musks* foi efetuada pelo método do padrão externo.

Todos os *musks* estudados neste trabalho apresentaram um comportamento linear entre 5 e 4000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com exceção do *musk xylene*, *ethylene brassylate* (10-4000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), *musk ambrette* e *exaltolide* (25-4000 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Em todos os casos os coeficientes de correlação determinados variaram entre 0,9797 e 0,9995 e obteve-se uma boa separação cromatográfica. Os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados com base na razão sinal-ruído ($S/N=3$ e $S/N=10$, respetivamente). Os valores do LOD variaram entre 0,01 ng.g^{-1} para o *galaxolide* e 5,77 ng.g^{-1} para o *ethylene brassylate* (Tabela 10). Estes valores são, de um modo geral, inferiores aos obtidos por outros autores (Zhang *et al.*, 2008; Llompart *et al.*, 2013).

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (%CV) de três extrações independentes, enquanto a exatidão foi avaliada pela recuperação, utilizando o método de adição de padrão. Estes ensaios foram efetuados a três níveis distintos de concentração (200, 400 e 800 ng.g^{-1}) e para cada uma das categorias dos produtos de higiene selecionados. Os resultados globais de precisão são aceitáveis, tendo-se obtido valores inferiores a 15% para todos os tipos de amostras estudados. Diferentes recuperações foram obtidas de acordo com o tipo de formulação estudada. Obtiveram-se os valores mais elevados para os hidratantes de pele e desodorizantes (cerca de 97%) e os mais baixos para as pastas de dentes (75%). Estes valores mais baixos deverão estar relacionados com a dificuldade de remoção dos álcoois, que conferem estabilidade às pastas de dentes de modo a que estas não se transformem em pó.

Tabela 10 - Parâmetros de validação do método analítico

	<i>Musks</i>											
	DPMI	ADBI	AHMI	EXA	MA	HHCB	MX	AHTN	MM	MT	MK	ETH ^c
Gama de linearidade ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	5-4000	5-4000	5-4000	25-4000	25-4000	5-4000	10-4000	5-4000	5-4000	5-4000	5-4000	10-4000
LOD (ng.g^{-1})	0,49	0,34	0,17	3,33	3,75	0,01	5,00	2,22	2,86	4,00	1,94	5,77
LOQ (ng.g^{-1})	1,64	1,12	0,56	11,11	12,50	0,03	16,67	7,41	9,52	13,33	6,45	19,23
PRECISÃO (%CV)												
Perfumes ^a						1-5						
Produtos de corpo e cabelo	1-5	4-8	4-5	2-7	2-10	4-5	2-9	4-10	5-7	1-4	1-8	---
Desodorizantes	4-9	4-5	4-7	2-4	1-5	2-3	5-7	3-5	2-5	4-9	5-6	---
Pastas de dentes	3-5	5-6	5-6	2-11	3-13	5-6	7-12	4-7	4-13	5-6	5-11	---
Hidratantes	7-9	4-11	3-9	7-8	3-12	2-14	8-9	9-12	4-14	8-10	5-10	---
EXATIDÃO (%Rec)												
Perfumes ^b	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Produtos de corpo e cabelo	95-109	56-59	59-70	94-102	100-108	57-66	102-112	76-82	71-101	70-103	96-108	---
Desodorizantes	89-91	92-93	94-95	94-98	101-102	98-100	89-96	91-102	89-93	102-104	99-102	---
Pastas de dentes	81-107	60-75	57-71	57-75	64-91	50-69	70-104	57-73	50-97	63-99	103-105	---
Hidratantes	82-91	93-97	93-97	91-96	101-107	91-97	83-109	97-108	87-95	106-108	92-109	---

^a Desvio padrão relativo de três injeções da mesma amostra diluída de perfume

^b Os perfumes apenas sofreram diluições e, por isso, considerou-se que não existiam efeitos de matriz

^c O *ethylene brassylate* (ETH) apenas foi quantificado nas amostras de perfume

Na figura 7 e 8 são apresentados dois cromatogramas (modo SIS) de uma amostra de hidratante corporal e da mesma amostra com adição de padrão (800 ng.g⁻¹). Como se pode verificar, na amostra com adição de padrão os picos referentes aos *musks* aumentaram em relação aos da amostra. Esta contaminação permite averiguar a existência destes mesmos compostos na amostra, uma vez que facilita a sua localização no cromatograma.

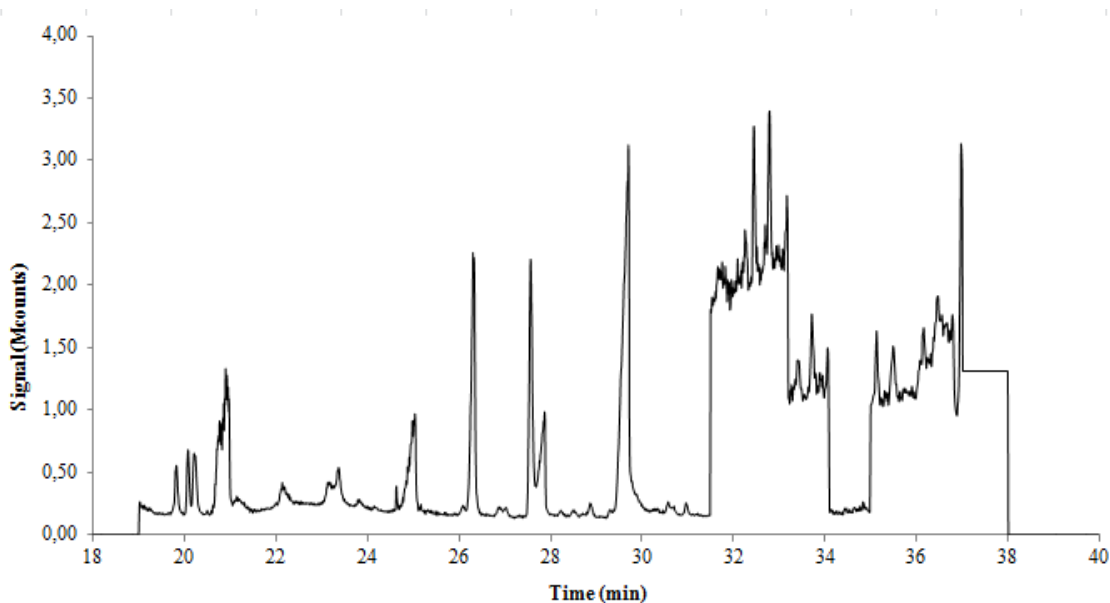


Figura 7 - Cromatograma de um hidratante

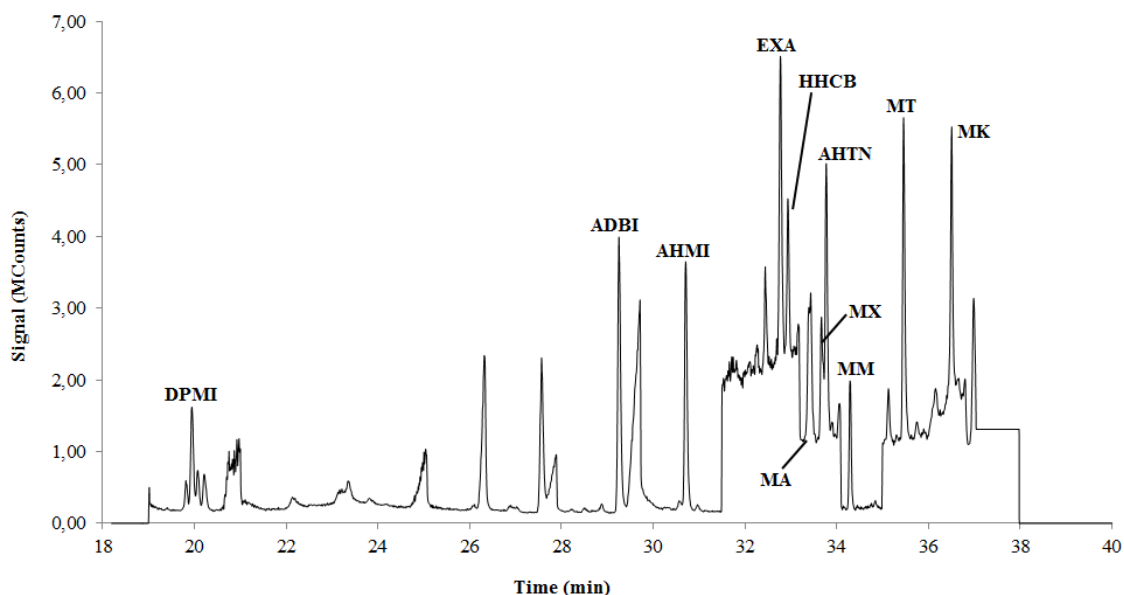


Figura 8 - Cromatograma de um hidratante com adição de padrão 800 µg.g⁻¹.

5.2 *Musks* nos produtos de higiene e cuidado pessoal

Esta metodologia analítica foi aplicada à análise de 119 produtos de higiene e cuidado pessoal, de modo a estimar o padrão de utilização destes produtos pela população da área metropolitana do Porto.

Em todas as amostras analisadas foram detetados *musks*. Verificou-se 354 registos de *musks* nas 119 amostras analisadas, tornando-se clara a existência de diversos *musks* na constituição de cada produtos de higiene (média de 3 *musks*/PCP).

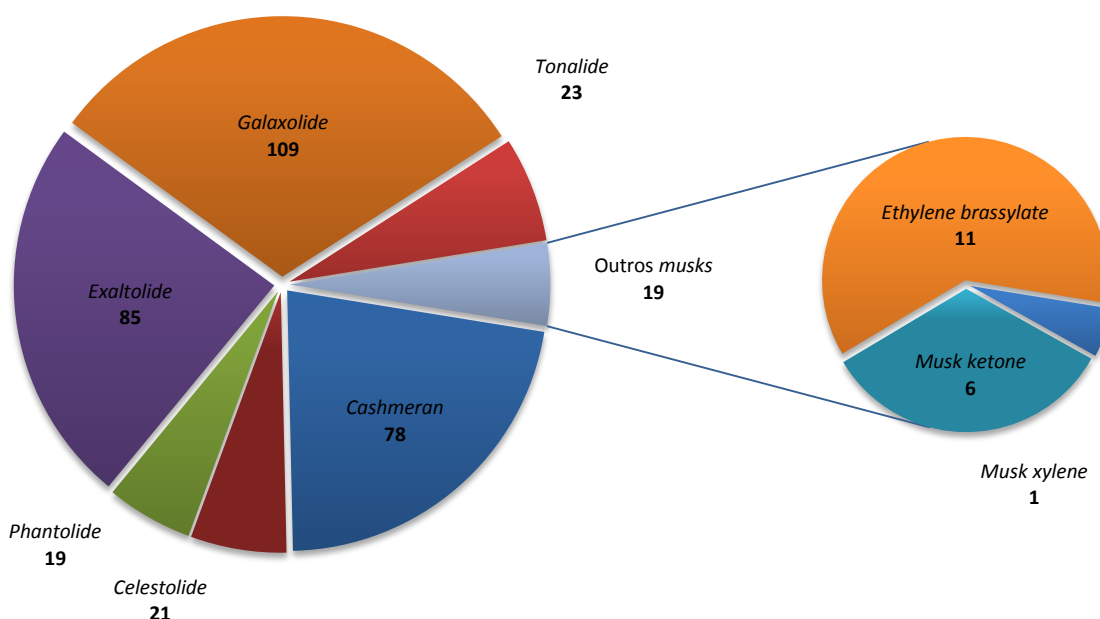


Figura 9 – Número de amostras contendo cada um dos *musks* analisados (n=119)

Tal como ilustra a figura 9, os *musks* mais detetados foram o *galaxolide* (92%), *exaltolide* (71%) e *cashmeran* (62%). Os restantes *musks* foram detetados em percentagens menos significativas (<20%). O *musk ambrette*, *musk moskene* e *musk tibetene* (*musks* de utilização proibida na União Europeia) não foram detetados em qualquer uma das amostras. No entanto, os nitro *musks* de utilização restrita, *musk ketone* e *musk xylene*, foram detetados em 6 (5%) e 1 (0,8%) amostras, respetivamente. Na Tabela 11 estão descritas as concentrações médias, gama de concentrações em que foram detetados e frequência resultantes da análise dos diversos produtos de higiene. As concentrações de cada *musk* em cada uma das amostras analisadas encontram-se sumarizadas no Anexo 1.

Como referido anteriormente, os nitro *musks* (*musk ketone* e *musk xylene*) foram encontrados em 5% das amostras analisadas, tendo sido detetados em sabonetes líquidos, cremes de mãos, champôs de criança e condicionadores. Apesar da utilização destes compostos em produtos de higiene ter sido restringida por parte da União Europeia (Directiva 2012/21/EU), nenhum deles ultrapassou os limites legais em vigor. Apesar da utilização do *musk xylene* ser proibida por parte de todos os associados da IFRA, este *musk* foi detetado num produto de higiene de criança (champô) com uma concentração de 3,4 mg.kg⁻¹.

Em 98% das amostras foram registados *musks* policíclicos. Ou seja, apenas 2 das 119 amostras analisadas (1 perfume e 1 creme hidratante) não continham esta classe de *musks*. O *galaxolide* foi detetado em todas as amostras analisadas de pastas de dentes, sabonetes líquidos, creme de mãos e faciais, condicionadores de cabelo e produtos de criança (champôs, géis de banho, cremes, leites e loções hidratantes).

Tabela 11 - Concentrações (mg.kg⁻¹; média e gama) e frequência de detecção (%) dos musks nos produtos de higiene na área metropolitana do Porto

Categorias	Produtos	n	<i>Cashmeran</i>	<i>Celestolide</i>	<i>Phantolide</i>	<i>Exaltolide</i>	<i>Galaxolide</i>	<i>Musk xylene</i>	<i>Tonalide</i>	<i>Musk ketone</i>	<i>Ethylene Brassylate</i>
Perfumes	Perfume	Média	883,22	2,35	6,74	4748,72	10031,76	n.d.	6698,51	n.d.	4286,56
		Gama	n.d.-4149,63	n.d.-2,77	n.d.-15,74	n.d.-22089,38	n.d.-31124,00	n.d.	n.d.-19840,21	n.d.	n.d.-24485,94
		Frequência	58	11	26	74	95	n.d.	58	n.d.	58
Produtos de corpo e cabelo	Gel banho	Média	59,84	0,02	n.d.	83,57	89,65	n.d.	54,46	n.d.	---
		Gama	0,05-512,66	n.d.-0,02	n.d.	n.d.-532,94	n.d.-460,07	n.d.	n.d.-54,46	n.d.	---
		Frequência	100	10	n.d.	90	70	n.d.	10	n.d.	---
	Gel banho criança	Média	0,57	n.d.	n.d.	66,21	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	---
		Gama	n.d.-1,05	n.d.	n.d.	n.d.-309,75	0,0004-0,48	n.d.	n.d.	n.d.	---
		Frequência	50	n.d.	n.d.	70	100	n.d.	n.d.	n.d.	---
	Sabonete líquido mãos	Média	4,08	0,02	0,32	12,88	39,67	n.d.	0,64	10,10	---
		Gama	n.d.-18,74	n.d.-0,02	n.d.-0,35	0,78-53,59	0,020-106,50	n.d.	n.d.-1,18	n.d.-18	---
		Frequência	71	29	29	100	100	n.d.	43	29	---
	Champô	Média	9,17	1,05	1,01	237,98	1558,10	n.d.	5,08	n.d.	---
		Gama	n.d.-52,48	n.d.-5,50	n.d.-4,90	n.d.-1752,30	<LOQ-12861,33	n.d.	n.d.-5,08	n.d.	---
		Frequência	55	55	45	73	100	n.d.	9	n.d.	---
Champô criança	Média	0,69	n.d.	n.d.	2,38	3,52	3,42	n.d.	6,59	---	
	Gama	n.d.-1,63	n.d.	n.d.	n.d.-6,70	<LOQ-20,83	n.d.-3,42	n.d.	n.d.-12,71	---	
	Frequência	38	n.d.	n.d.	88	100	13	n.d.	25	---	
Condicionador	Média	0,97	0,13	0,05	20,93	229,92	n.d.	n.d.	1,38	---	
	Gama	n.d.-3,05	n.d.-0,21	n.d.-0,14	n.d.-50,91	0,01-405,36	n.d.	n.d.	n.d.-1,38	---	
	Frequência	63	75	38	88	100	n.d.	n.d.	13	---	
Desodorizantes	<i>Roll-on</i>	Média	3,58	n.d.	0,11	51,17	0,02	n.d.	0,03	n.d.	---
		Gama	n.d.-8,55	n.d.	n.d.-0,22	n.d.-137,72	n.d.-0,06	n.d.	n.d.-0,05	n.d.	---
		Frequência	83	n.d.	17	67	75	n.d.	25	n.d.	---
Pastas de dentes	Pasta de dentes adulto	Média	0,04	n.d.	n.d.	n.d.	0,002	n.d.	n.d.	n.d.	---
		Gama	n.d.-0,05	n.d.	n.d.	n.d.	0,00001-0,005	n.d.	n.d.	n.d.	---
		Frequência	67	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	n.d.	n.d.	---
Pasta de dentes criança	Média	0,05	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	n.d.	n.d.	n.d.	---	
	Gama	n.d.-0,05	n.d.	n.d.	n.d.	0,0004-0,04	n.d.	n.d.	n.d.	---	
	Frequência	17	n.d.	n.d.	n.d.	100	n.d.	n.d.	n.d.	---	
Hidratantes	Creme mãos	Média	2,56	0,78	n.d.	23,24	7,87	n.d.	n.d.	16,80	---
		Gama	n.d.-2,56	n.d.-0,78	n.d.	n.d.-34,24	0,006-31,43	n.d.	n.d.	n.d.-16,80	---
		Frequência	25	25	n.d.	75	100	n.d.	n.d.	25	---
	Creme, leite e loção corporal adulto	Média	10,03	1,44	0,01	364,95	103,09	n.d.	10,34	n.d.	---
		Gama	n.d.-29,87	n.d.-1,44	n.d.-0,01	n.d.-1421,41	n.d.-309,23	n.d.	n.d.-10,34	n.d.	---
		Frequência	75	13	13	88	63	n.d.	13	n.d.	---
	Creme, leite e loção corporal criança	Média	1,14	n.d.	n.d.	34,87	0,07	n.d.	0,03	n.d.	---
		Gama	n.d.-2,58	n.d.	n.d.	n.d.-101,07	0,01-0,26	n.d.	n.d.-0,04	n.d.	---
		Frequência	50	n.d.	n.d.	67	100	n.d.	33	n.d.	---
Creme facial	Média	0,93	0,01	0,06	15,81	38,28	n.d.	10,49	n.d.	---	
	Gama	0,20-1,82	n.d.-0,02	n.d.-0,06	2,42-33,16	<LOQ-45,05	n.d.	n.d.-10,49	n.d.	---	
		Frequência	100	50	25	100	100	25	n.d.	---	

n.d.: não detetado; <LOQ: inferior ao limite de quantificação

A sua menor incidência regista-se nos cremes, leites e loções para adulto, bem como geis de banho e desodorizantes. Este composto foi detetado com uma concentração mais elevada em perfumes (31000 mg.kg^{-1}). O *exaltolide* também foi detetado na totalidade das amostras de sabonetes líquidos. No entanto, à semelhança do que acontece com o *galaxolide*, a concentração máxima registada ocorreu nas amostras de perfumes (22000 mg.kg^{-1}). O *cashmeran*, terceiro *musk* mais detetado, foi encontrado em todos os cremes faciais e geis de banho para adulto analisados. A sua concentração máxima registada ocorreu também ela em perfumes (4150 mg.kg^{-1}). Dos *musks* policíclicos, apenas o *tonalide* se encontra restringido pela legislação europeia. Este foi encontrado em 23 amostras, mas em nenhuma delas ultrapassou os limites impostos.

Os *musks* macrocíclicos foram detetados em cerca de 75% das amostras analisadas. Neste trabalho, foram estudados apenas dois tipos de *musks* pertencentes a esta classe, o *ethylene brassylate* e o *exaltolide*. O primeiro apenas foi estudado nas amostras de perfumes, devido a problemas com o efeito de matriz. Na verdade, este composto quando analisado em GC-MS produz fragmentos muito semelhantes aos dos ácidos gordos presentes na maioria das amostras estudadas, levando a erros de quantificação. Assim, optou-se por apenas fazer a quantificação deste *musk* em amostras de perfumes (matriz livre de ácidos gordos). Este composto foi detetado em cerca de 58% dos perfumes analisados e a sua concentração variou entre 2 e 24000 mg.kg^{-1} . O *exaltolide* foi detetado em todas as categorias de produtos de higiene analisados, com excepção das pastas de dentes. A sua frequência de deteção foi superior nos sabonetes líquidos e nos cremes faciais. À semelhança do que se verificou com os *musks* policíclicos, este composto foi detetado com uma concentração superior nas amostras de perfume (22000 mg.kg^{-1}).

Os produtos de criança são os que registam uma menor variedade de *musks* dentro do mesmo tipo de produtos. Em contrapartida, os perfumes, sabonetes líquidos, condicionadores, champôs e cremes faciais são os que apresentam uma maior pluralidade de *musks*. A concentração total média de *musks* encontrada em cada tipo de produto de higiene está representada na Figura 10.

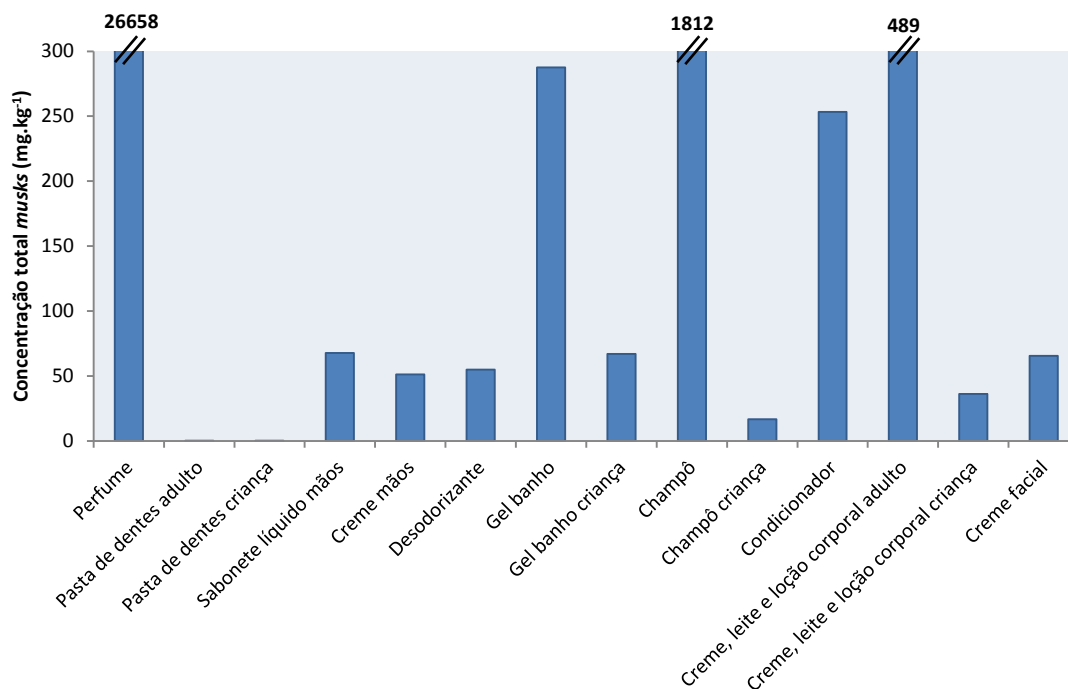


Figura 10 - Concentração total média de musks (mg.kg⁻¹) nos diferentes tipos de amostras

Em termos comparativos, os perfumes são os produtos que apresentam maiores concentrações médias totais de *musks* (26658 mg.kg⁻¹), seguidos dos champôs com 1812 mg.kg⁻¹, cremes, leites e loções corporais (489 mg.kg⁻¹) e dos géis de banho (288 mg.kg⁻¹). O teor total de *musks* é mais baixo nas pastas de dentes e os champôs de criança.

Na figura 11 está representada a distribuição relativa dos *musks* que compõem cada tipo de produto analisado.

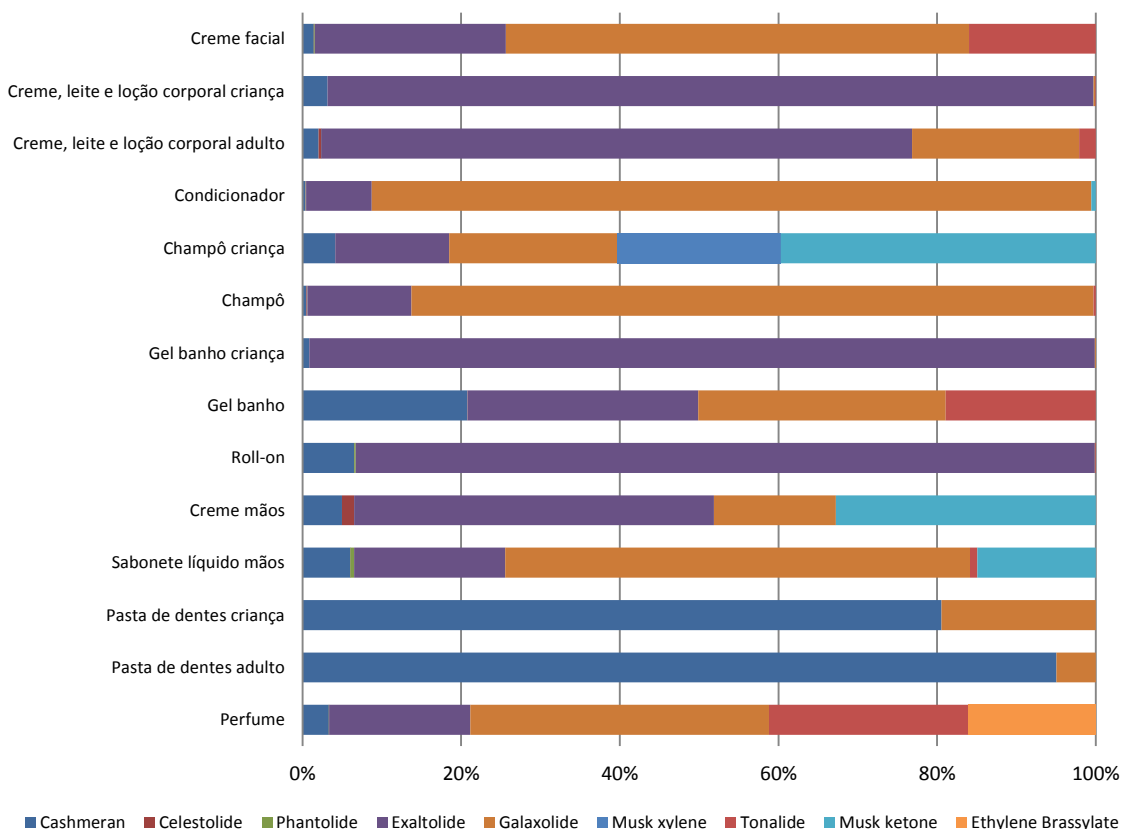


Figura 11 - Distribuição relativa dos *musks* nos produtos de higiene em estudo.

Através da análise da Figura 11, constata-se que o *exaltolide* e *galaxolide* em quase todos os produtos de higiene analisados representam mais de 50% da composição em *musks*. O *exaltolide* é utilizado em maior proporção nos cremes, leites e loções tanto de adulto como de criança, géis de banho de criança e desodorizantes, enquanto o *galaxolide* em condicionadores, cremes faciais e champôs de adulto. O *cashmeran* também se destaca, uma vez que predomina na composição das pastas de dentes de adulto e de criança. Apesar do *musk ketone* ter sido encontrado em apenas 6 amostras, as concentrações em que foi detetado foram suficientemente elevadas para que fosse considerado um dos principais constituintes dos champôs de bebé, creme de mãos e sabonetes líquidos analisados.

Reiner e Kannan (2006) analisaram 60 produtos de higiene (perfumes, loções corporais, desodorizantes, géis de banho, sabonetes, espumas de barbear e produtos de cabelo) e limpeza nos EUA com o intuito de detetar *galaxolide* e *tonalide*. O *galaxolide* foi detetado em 72% e o *tonalide* em 32% das amostras analisadas. Em todos os desodorizantes foi registada a presença do *galaxolide*. Também foi neste tipo de produtos de higiene que o *tonalide* foi registado com maior frequência (75%). Ao contrário do que aconteceu neste estudo, Reiner e Kannan (2006) não detetaram nenhum destes *musks* nos géis de banho ($LOD = 5 \text{ ng.g}^{-1}$). O

valor de concentração mais elevado para o *galaxolide* e *tonalide* foram registados em perfumes com 4990 mg.kg⁻¹ e 4510 mg.kg⁻¹, respetivamente. Uma situação semelhante foi verificada neste trabalho.

Vários estudos sobre a determinação de *musks* em produtos de higiene foram efetuados na Europa (Roosens *et al.*, 2007; Sanchez-Prado *et al.*, 2011; Lopez-Gazpio *et al.*, 2012; Correia *et al.*, 2013; Llompart *et al.* 2013). A maioria destes estudos incidiu apenas na deteção dos principais *musks* policíclicos (*galaxolide*, *tonalide*) e nitro *musks* (*musk xylene*, *musk ketone*), embora Sanchez-Prado *et al.* (2011) e Llompart *et al.* (2013) tenham incluído alguns *musks* macrocíclicos. De um modo geral, estes autores concluíram que os *musks* policíclicos, nomeadamente o *galaxolide*, era o composto mais frequentemente detetado. Verificaram também que as concentrações mais elevadas de *musks* sintéticos se encontravam nos perfumes, desodorizantes, hidratantes corporais e produtos de banho. Conclusões semelhantes foram obtidas neste trabalho. Estudos semelhantes foram efetuados na China (Zhang *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2011). Tal como nos estudos Europeus, o *musk* detetado com maior frequência é o *galaxolide*, seguido do *tonalide* e do *musk ketone*. Das amostras analisadas os perfumes e os produtos de cuidado capilar são os que apresentam teores mais elevados de *musks*. No entanto, as concentrações dos *musks* policíclicos sintéticos são ligeiramente inferiores às encontradas nos estudos Europeus e em alguns casos, às encontradas neste estudo. Relativamente aos nitro *musks*, estes parecem ter maior expressão nos produtos provenientes da China.

5.3 Avaliação da exposição humana a *musks*

A principal fonte de exposição humana a *musks* deverá ser a aplicação dérmica, através do contacto direto de produtos de higiene e cosméticos com a pele. Embora a exposição por inalação seja também possível (principalmente com a utilização de perfumes e produtos em *spray*), esta ocorre normalmente em menor extensão.

Assim, neste trabalho foram estimados os valores de exposição dérmica diária a *musks*, considerando o perfil de consumo (adulto e criança) da população da área metropolitana do Porto. Para este estudo apenas se consideraram os produtos de higiene analisados como fontes dos *musks* sintéticos. Para o cálculo da exposição diária a *musks* foram combinados dados de exposição (quantidade aplicada de cada produto, frequência de aplicação, retenção dérmica) com os dados de distribuição dos *musks* (concentração média de *musks* para cada produto analisado). Logo, a exposição dérmica diária a *musks* é calculada de acordo com a Eq. (1):

$$\text{Exposição dérmica diária} = \frac{q_{\text{tot}} \times \text{Freq} \times \text{FR} \times C_{\text{musks}}}{\text{BW}} \quad (1)$$

 (Correia *et al.*, 2013)

 em que q_{tot} – quantidade diária aplicada de cada produto (g)

 Freq – frequência de aplicação (dia^{-1})

FR – Fator de retenção (%)

 C_{musks} – concentração média total de *musks* em cada produto ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

BW – peso corporal (kg)

Na Tabela 12 encontram-se os resultados referentes aos perfis de exposição dérmica, bem como as hipóteses formuladas para a sua determinação. A quantidade aplicada de cada produto, frequência de aplicação e fatores de retenção foram baseados em estudos anteriormente publicados (Loretz *et al.*, 2005, 2006, 2008; Roosens *et al.*, 2007). No entanto, tanto quanto é do nosso conhecimento, não existe nenhum estudo relativo a estes parâmetros de exposição diária a *musks*, referentes a produtos de criança. Para efeitos de cálculo extrapolaram-se os dados de produtos de adulto para os homólogos de criança, e admitiu-se um peso médio de uma criança de 15 kg, sendo o peso médio de um adulto de 60 kg (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010).

Tabela 12 - Perfis de exposição dérmica diária a *musks*

Tipo Produto	Quantidade total aplicada ^a (g)	Frequência de aplicação ^a (dia^{-1})	Fator de retenção ^a (%)	Exposição por dia (g)	Concentração média de <i>musks</i> ^b ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Exposição dérmica diária a <i>musks</i> ($\mu\text{g.kg}^{-1} \text{bw.dia}^{-1}$)
ADULTO *						
Perfume	0,75	1,00	100	0,75	26658	333,23
Pasta de dentes	1,10	2,00	17	0,37	0,04	0,0002
Sabonete líquido	0,80	6,00	1	0,05	67,70	0,05
Creme mãos	0,50	0,80	100	0,40	51,25	0,34
Desodorizante	0,50	1,00	100	0,50	54,92	0,46
Gel banho	5,00	1,00	1	0,05	287,54	0,24
Champô	8,00	1,00	1	0,08	1812,39	2,42
Condicionador	4,90	0,43	0,1	0,002	253,37	0,01
Creme, leite e loção corporal	8,00	0,71	100	5,70	489,86	46,37
Creme facial	0,75	2,00	100	1,60	65,58	1,64
TOTAL						383,76
CRIANÇA **						
Pasta de dentes criança	1,10	2,00	17	0,37	0,08	0,002
Gel banho criança	5,00	1,00	1	0,05	66,85	0,22
Champô criança	8,00	1,00	1	0,08	16,60	0,09
Creme, leite e loção criança	8,00	0,71	100	5,70	36,11	13,68
Sabonete líquido	0,80	6,00	1	0,05	67,70	0,22
TOTAL						14,21

^a valor estimado em estudos publicados; ^b concentração de *musks* determinado neste estudo; * peso médio = 60 kg; ** peso médio = 15 kg

Através da análise da Tabela 12, verifica-se que a exposição dérmica diária a *musks* de um adulto ($383,76 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{bw}\cdot\text{dia}^{-1}$) é quase 28 vezes maior à de uma criança ($14,21 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{bw}\cdot\text{dia}^{-1}$). Esta grande diferença poderá ser justificada com o uso de perfumes, uma vez que estes representam 87% de toda a exposição dérmica diária a *musks* por parte de um adulto. É importante referir que para este estudo não se considerou a utilização de águas de colónia por parte das crianças. A outra grande fatia de exposição dérmica diária a *musks* de um adulto encontra-se na categoria creme, leite e loção corporal ocupando desta forma cerca de 12%. Os restantes 1% de exposição dérmica diária estão relacionados com a utilização das restantes categorias de produtos de higiene. Quanto à exposição dérmica diária a *musks* de uma criança, os valores em causa são bastante mais baixos, uma vez que os produtos de higiene estudados contêm uma concentração de *musks* muito inferior aos homólogos para adulto, com a exceção das pastas de dentes que registam quase o dobro da concentração. Entre todos os *musks* utilizados, o *galaxolide* foi o que mais contribuiu para a exposição total a esta classe de compostos.

Existem poucos estudos relativos à avaliação da exposição dérmica a *musks*. (Lu *et al.*, 2011) $56,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ e (Roosens *et al.*, 2007) $125 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$. Estes valores são bem mais baixos que os registados, isto prende-se com o fato de apenas incluírem nos seus estudos a análise dos *musks galaxolide, tonalide, musk ketone* e *musk xylene*, contrastando com este estudo que fez a análise de 12 *musks*.

Os resultados obtidos neste estudo dependem das taxas de utilização dos produtos de higiene e da concentração de *musks* nesses mesmos produtos. Por conseguinte, tais variáveis dependem dos hábitos de cada população. Sendo assim, torna-se importante efetuar estes estudos numa escala regional, de modo a minimizar os erros associados à diferença que estas variáveis têm de região para região.

6 Conclusões

Neste trabalho foi utilizada a metodologia QuEChERS para extrair e efetuar posterior análise por GC-MS de 12 *musks* em PCPs. Este método é rápido, barato e utiliza pequenas quantidades de reagentes e material.

Em todas as amostras analisadas foram detetados *musks*. Os nitros *musks* (*musk ambrette*, *musk moskene* e *musk tibetene*) proibidos à luz da legislação europeia não foram detetados em nenhuma das amostras analisadas. No entanto, foram encontrados 6 produtos que continham *musks* restringidos (*musk ketone* e *musk xylene*). Apenas 1 produto (champô de criança) continha estes dois *musks* em simultâneo, não se encontrando de acordo com a legislação IFRA, atendendo a que a utilização do *musk xylene* é proibida pelas empresas associadas.

Todos os produtos analisados não ultrapassaram os limites impostos pela legislação europeia. As pastas de dentes e os champôs para crianças foram os que registaram uma menor concentração de *musks* (0,04-16,60 mg.kg⁻¹). Por outro lado, os perfumes, champôs e loções para o corpo apresentaram as maiores concentrações (489-26658 mg.kg⁻¹). De todos os *musks* utilizados, os perfumes são a classe de PCPs que detém a maior quantidade (87,2%), em contraste com as pastas de dentes (0,0006%). O *exaltolide* e *galaxolide* representam mais de 50% da composição de *musks* em cada categoria de PCPs.

Os cálculos da exposição dérmica diária a *musks* mostraram que num adulto é de 383,76 µg.kg⁻¹.dia⁻¹, enquanto que num bebé é cerca de 28 vezes menor (14,21 µg.kg⁻¹.dia⁻¹).

No âmbito desta tese, alguns dos resultados obtidos foram apresentados sob a forma de *poster* numa conferência internacional, ICCE 2013 - 14th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment, 25 - 28 June 2013, Barcelona (Spain) (Anexo 2).

7 Avaliação do trabalho realizado

7.1 Objetivos realizados

Os principais objetivos deste trabalho foram atingidos, tendo-se estimado o padrão de utilização dos produtos de higiene pessoal na população da área metropolitana do Porto e posteriormente, a exposição humana a *musks* através da monitorização dos seus níveis, nos produtos mais utilizados por esta população alvo.

7.2 Limitações e trabalho futuro

Apesar de se terem atingidos os objetivos propostos para este trabalho, existiram algumas limitações tais como o método de extração, analítico e até a formula utilizada nos cálculos de exposição dérmica diária a *musks*.

Nas amostras estudadas, excetuando os perfumes, não foi possível, a quantificação do *musk ethylene brassylate*, porque quando analisadas em GC-MS, os fragmentos obtidos eram muito semelhantes ao dos ácidos gordos existentes nos produtos de higiene. Assim, seria importante desenvolver uma nova metodologia que permitisse também a extração e quantificação do *ethylene brassylate* dos PCPs. Além disso, a metodologia de QuEChERS utilizada não se revelou apropriada para a análise de protetores solares.

Apesar dos bons resultados obtidos na quantificação por GC-MS, seria importante testar a utilização de uma coluna capilar com características mais polares (mais apropriada para o trabalho em questão, dado a natureza dos compostos estudados). No entanto, este ensaio não foi possível, atendendo a que o equipamento utilizado é partilhado por vários investigadores havendo necessidade de existirem condições que permitam a utilização por todos. Esta limitação fez com que o tempo de análise de cada amostra rondasse os 45 min. A gama de concentrações dos *musks* encontrados nos produtos de higiene estudados foi bastante alargada (várias amostras tiveram de ser diluídas) e por isso não foi possível analisar um ainda número superior de amostras.

Os cálculos da exposição diária deveriam ser realizados por faixas etárias mais estreitas e divididas por sexo, uma vez que o peso de um adulto varia com o sexo e o peso de uma criança está diretamente relacionado com a idade e sexo. Os valores de variáveis para exposição dérmica diária também deveriam ser revistos, uma vez que estes não serão iguais para um adulto e uma criança. Na verdade, uma criança terá uma área de exposição menor, mas uma

permeabilidade cutânea maior (devido à estrutura da pele), conduzindo a diferentes fatores de retenção.

O trabalho realizado é um primeiro passo para avaliações de risco, onde se efetua a determinação da exposição dos ecossistemas a *musks*. Após a utilização dos produtos de higiene, estes são libertados para o meio ambiente, podendo originar alterações destes ecossistemas.

8 Bibliografia

- Abramsson-Zetterberg, L., e P. Slanina. "Macrocyclic musk compounds—an absence of genotoxicity in the Ames test and the in vivo Micronucleus assay." *Toxicology Letters* 135 (2002): 155–163.
- Anastassiades, M., K. Maštovská, e S. J. Lehotay. "Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides." *Journal of Chromatography A* 1015 (2003): 163-184.
- Angerer, J., e H. U. Käfferlein. "Gas chromatographic method using electron-capture detection for the determination of musk xylene in human blood samples.: Biological monitoring of the general population." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 693 (1997): 71–78.
- Babić, S., M. Petrović, e M. Kaštelan-Macan. "Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil." *Journal of Chromatography A* 823 (1998): 3-9.
- Balk, F., e R. A. Ford. "Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU: I. Fate and exposure assessment." *Toxicology Letters* 111 (1999): 57-79.
- Barker, S. A. "Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis." *Journal of Chromatography A* 880 (2000): 63–68.
- Barker, S. A. "Matrix solid phase dispersion (MSPD)." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2007): 151-162.
- Biesterbos, J. W. H., Dudzina T., Delmaar C. J. E., Bakker M. I., Russel F. G. M., Goetz N. v., Scheepers P. T. J. "Usage patterns of personal care products: Important factors for exposure assessment." *Food and Chemical Toxicology* 55 (2013): 8–17.
- Bragança, I., A. Plácido, P. Paíga, V. F. Domingues, e C. Delerue-Matos. "QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils." *Science of The Total Environment* 433 (2012): 281–289.
- Cavalheiro, J., A. Prieto, M. Monperrus, N. Etxebarria, e O. Zuloaga. "Determination of polycyclic and nitro musks in environmental water samples by means of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection-gas chromatography–mass spectrometry analysis." *Analytica Chimica Acta* 773 (2013): 68–75.
- ChemWiki. *UCDavis* *ChemWiki*. 2013.
http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/889/=Gas_Chromatography-Mass_Spectrometer_Schematic.JPG (acedido em 5 de abril de 2013).

- Cieřlik, E., A. Sadowska-Rociek, J. M. M. Ruiz, e M. Surma-Zadora. "Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits." *Food Chemistry* 125 (2011): 773–778.
- Clara, M., Gnass O., Windhofer G., Krenn U., Hartl W., Braun K., Scharf K., Scheffknecht C. "Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment." *Chemosphere* 82 (2011): 1116–1123.
- Correia, P., A. Cruz, L. Santos, e A. Alves. "Human dermal exposure to galaxolide from personal care products." *International Journal of Cosmetic Science* 35 (2013): 299–309.
- CVUA. *Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart*. 2013. http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=5&ID=1652&Pdf=No (acedido em 9 de maio de 2013).
- Daughton, C. G., e T. A. Ternes. "Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?" *Environmental Health Perspectives* 107 (1999): 907-944.
- Eh, M. "New Alicyclic Musks: The Fourth Generation of Musk Odorants." *Chemistry & Biodiversity* 1 (2004): 1975–1984.
- European Chemicals Agency. *Data on Manufacture, Import, Export, Uses and Releases of Musk Xylene as Well as information on Potential Alternatives to Its Use*. National Institute for Public Health and the Environment, 2008.
- European Commission. "Food Safety: from the Farm to the Fork." *Opinion On Nitro Musk Compounds In Foods*. 1997.
- Fragrantica. *Fragrantica.com perfumes magazine*. 2013. <http://www.fragrantica.com/notes/Musk-4.html> (acedido em 2013 de março de 18).
- Giddings, J. M., D. Salvito, e A. E. Putt. "Acute toxicity of 4-amino musk xylene to *Daphnia magna* in laboratory water and natural water." *Water Research* 34 (2000): 3686–3689.
- Guo, R., I. Lee, U. Kim, e J. Oh. "Occurrence of synthetic musks in Korean sewage sludges." *Science of The Total Environment* 408 (2010): 1634–1639.
- Hall, B., et al. "European consumer exposure to cosmetic products, a framework for conducting population exposure assessments." *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007): 2097–2108.
- He, C., Y. Long, J. Pan, K. Li, e F. Liu. "Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2007): 133–150.
- HERA. *Environmental Risk Assessment Polycyclic on ingredients of Household Cleaning Products: Musks AHTN and HHCB*. HERA, 2004.

- Herren, D., e J. D. Berset. "Nitro musks, nitro musk amino metabolites and polycyclic musks in sewage sludges: Quantitative determination by HRGC-ion-trap-MS/MS and mass spectral characterization of the amino metabolites." *Chemosphere* 40 (2000): 565–574.
- Homem, V., J. A. Silva, C. Cunha, A. Alves, e L. Santos. "New analytical method for the determination of musks in personal care products by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe extraction followed by GC–MS." *Journal of Separation Science*, 2013: DOI 10.1002/jssc.201300190.
- Hübschmann, H. *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications, Second Edition*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2009.
- Hutter, H.-P., et al. "Higher blood concentrations of synthetic musks in women above fifty years than in younger women." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213 (2010): 124-130.
- Jansen, R., J. W. Hofstee, H. Bouwmeester, e E. v. Henten. "Automated Signal Processing Applied to Volatile-Based Inspection of Greenhouse Crops." *Sensors* 10 (2010): 7122–7133.
- Kang, C. S., et al. "Polybrominated diphenyl ethers and synthetic musks in umbilical cord Serum, maternal serum, and breast milk from Seoul, South Korea." *Chemosphere* 80 (2010): 116–122.
- Karaiskakis, G., e D. Gavril. "Determination of diffusion coefficients by gas chromatography." *Journal of Chromatography A* 1037 (2004): 147–189.
- Kiymet, N. *Determination of Synthetic Musk Compound Levels in Indoor Air*. Izmir: Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology, 2009.
- Kraft, P. "'Brain Aided" Musk Design." *Chemistry & Biodiversity* 1 (2004): 1957–1974.
- Kristenson, E. M., e U. A. T. Brinkman. "Recent advances in matrix solid-phase dispersion." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006): 96-111.
- Kuklennyik, Z., X. A. Bryant, L. L. Needham, e A. M. Calafat. "SPE/SPME–GC/MS approach for measuring musk compounds in serum and breast milk." *Journal of Chromatography B* 858 (2007): 177–183.
- Laessig, S. A., et al. *TSCA Workplan Chemical Risk Assessment HHCB 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta-γ-2-benzopyran*. U. S. Environmental Protection Agency, 2012.
- Lee, I., S. Lee, e J. Oh. "Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment." *Water Research* 44 (2010): 214–222.

- Lee, J., et al. "Cross-examination of liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase microextraction (SPME) methods for impurity profiling of methamphetamine." *Forensic Science International* 215 (2012): 175–178.
- Llompart, M., M. Celeiro, J. P. Lamas, L. Sanchez-Prado, M. Lores, e C. Garcia-Jares. "Analysis of plasticizers and synthetic musks in cosmetic and personal care products by matrix solid-phase dispersion gas chromatography–mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1293 (2013): 10–19.
- Lopez-Gazpio, J., R. Garcia-Arrona, M. Ostra, e E. Milán. "Optimization and validation of a nonaqueous micellar electrokinetic chromatography method for determination of polycyclic musks in perfumes." *Journal of Separation Science* 35 (2012): 1344–1350.
- Loretz, L. J., et al. "Exposure data for cosmetic products: Facial cleanser, hair conditioner, and eye shadow." *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008): 1516–1524.
- Loretz, L. J., et al. "Exposure data for cosmetic products: lipstick, body lotion, and face cream." *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005): 279–291.
- Loretz, L., et al. "Exposure data for personal care products: Hairspray, spray perfume, liquid foundation, shampoo, body wash, and solid antiperspirant." *Food and Chemical Toxicology* 44 (2006): 2008–2018.
- Lu, Y., T. Yuan, W. Wang, e K. Kannan. "Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China." *Environmental Pollution* 159 (2011): 3522–3528.
- March, R. E. "Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century." *International Journal of Mass Spectrometry* 200 (2000): 285–312.
- Martínez-Girón, A. B., A. L. Crego, M. J. González, e M. L. Marina. "Enantiomeric separation of chiral polycyclic musks by capillary electrophoresis: Application to the analysis of cosmetic samples." *Journal of Chromatography A* 1217 (2010): 1157–1165.
- Nakata, H, et al. "Asia–Pacific mussel watch for emerging pollutants: Distribution of synthetic musks and benzotriazole UV stabilizers in Asian and US coastal waters." *Marine Pollution Bulletin* 64 (2012): 2211–2218.
- OSPAR Comission. "Musk xylene and other musks." 2004.
- Patterson, D. B., W. C. Brumley, V. Kelliher, e P. L. Ferguson. "Application of U.S. EPA Methods to the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Determination of Clofibric Acid in Sewage Effluent by GC/MS." *U. S. Environmental Protection Agency* 34 (2000): 20-28.
- Peters, R. J. B. *Phthalates and Artificial Musks in Perfumes*. TNO Environment and Geosciences, 2005.

- Pickthall, J. "The musk odour." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1960: 423-436.
- Pietrogrande, M. C. "GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007): 1086-1094.
- Queiroz, S. C. N., C. H. Collins, e I. C. S. F. Jardim. "Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica." *Quim. Nova* 24 (2001): 68-76.
- Ravi, S., D. Padmanabhan, e V. R. Mamdapur. "Macrocyclic musk compounds: Synthetic approaches to key intermediates for exaltolide, exaltone and dilactones." *Journal of the Indian Institute of Sciences* 81 (2001): 299-312.
- Reiner, J. L., e K. Kannan. "A survey of polycyclic musks in selected household commodities from the United States." *Chemosphere* 62 (2006): 867-873.
- Rimkus, G. G. "Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment." *Toxicology Letters* 111 (1999): 37-56.
- Rimkus, G. G., e M. Wolf. "Nitro musk fragrances in biota from freshwater and marine environment." *Chemosphere* 30 (1995): 641-651.
- Rimkus, G. G., R. Gatermann, e H. Hühnerfuss. "Musk xylene and musk ketone amino metabolites in the aquatic environment." *Toxicology Letters* 111 (1999): 5-15.
- Rimkus, Gerhard G., e Manfred Wolf. "Nitro musk fragrances in biota from freshwater and marine environment." *Chemosphere* 30 (1995): 641-651.
- Roosens, L., A. Covaci, e H. Neels. "Concentrations of synthetic musk compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application." *Chemosphere* 69 (2007): 1540-1547.
- Rouvière, F., A. Buleté, C. Cren-Olivé, e C. Arnaudguilhem. "Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction." *Talanta* 93 (2012): 336-344.
- Sanchez-Prado, L., M. Llompart, J. P. Lamas, C. Garcia-Jares, e M. Lores. "Multicomponent analytical methodology to control phthalates, synthetic musks, fragrance allergens and preservatives in perfumes." *Talanta* 85 (2011): 370-379.
- Schwartz, S., V. Berding, e M. Matthies. "Aquatic fate assessment of the polycyclic musk fragrance HHCB: Scenario and variability analysis in accordance with the EU risk assessment guidelines." *Chemosphere* 41 (2000): 671-679.
- Scientific Committee on Consumer Safety. *The SCCS's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation*. European Commission, Directorate-General for Health & Consumers, 2010.

- Shek, W. M., M. B. Murphy, J. C. W. Lam, e P. K. S. Lam. "Synthetic polycyclic musks in Hong Kong sewage sludge." *Chemosphere* 71 (2008): 1241–1250.
- Skoog, West, Holler, e Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. USA: Thomson Brooks/Cole, 2007.
- Smyth, S. A., et al. "Sample storage and extraction efficiencies in determination of polycyclic and nitro musks in sewage sludge." *Chemosphere* 67 (2007): 267–275.
- Sommer, C. *The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry*. Vol. 3, cap. X em *The Handbook of Environmental Chemistry*, 1-16. Springer, 2004.
- Törneman, N. *Screening of musk substances*. Malmö: Swedish Environmental Protection Agency, 2008.
- Trinity College. 1996. <http://www.trincoll.edu/~henderson/textfi~1/416%20notes/3550b.pdf> (acedido em 9 de maio de 2013).
- U. S. Environmental Protection Agency. 2010. <http://www.epa.gov/ppcp/faq.html> (acedido em 13 de abril de 2013).
- Wake Forest University. *WFU*. 2013. <http://www.wfu.edu/chem/courses/organic/GC/index.html> (acedido em 5 de abril de 2013).
- Winkler, M., J. V. Headley, e K. M. Peru. "Optimization of solid-phase microextraction for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of synthetic musk fragrances in water samples." *Journal of Chromatography A* 903 (2000): 203–210.
- Wombacher, W. D., e K. C. Hornbuckle. "Synthetic Musk Fragrances in a Conventional Drinking Water Treatment Plant with Lime Softening." *J Environ Eng (New York)* 1192 (2009): 135-146.
- WWF. "Synthetic Musk Fragrances." 2000. <http://www.ngo.grida.no/wwfneap/Publication/briefings/Musk.pdf> (acedido em 18 de março de 2013).
- Yin, J., et al. "The occurrence of synthetic musks in human breast milk in Sichuan, China." *Chemosphere* 87 (2012): 1018–1023.
- Zeng, X., G. Sheng, Y. Xiong, e J. Fu. "Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangdong, China using GC–EI–MS." *Chemosphere* 60 (2005): 817–823.
- Zhang, X., et al. "Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China." *Chemosphere* 72 (2008): 1553–1558.
- Zhejiang NetSun Co., Ltd. *ChemNet*. 2013. <http://www.chemnet.com/> (acedido em 15 de março de 2013).

Anexo 1 – Concentrações de *musks* nos produtos de higiene

As tabelas A1-A15 são apresentadas as concentrações registadas dos 12 *musks* em estudo em todas as amostras analisadas.

Tabela A 1 - Concentração média de *musks* em amostras de perfume (g.kg⁻¹)

	Perfume (g.kg ⁻¹)									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
<i>Cashmeran</i>	0,02	0,19	0,05	n.d.	0,36	0,69	2,05	n.d.	0,17	n.d.
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,02	n.d.	0,01	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	7,90	4,01	2,40	1,32	5,30	4,06	n.d.	1,67	n.d.	22,09
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	31,12	30,52	17,21	0,01	0,0004	10,33	17,24	8,32	5,95	n.d.
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	13,19	n.d.	n.d.	19,55	n.d.	3,26	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,002	2,69	n.d.	n.d.	n.d.	3,25	9,94

Tabela A 2 - Concentração média de *musks* em amostras de perfume (g.kg⁻¹)

	Perfume (g.kg ⁻¹)								
	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19
<i>Cashmeran</i>	n.d.	1,27	n.d.	n.d.	0,01	n.d.	n.d.	0,74	4,15
<i>Celestolide</i>	0,003	n.d.	0,002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	0,005	n.d.	n.d.	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	n.d.	3,66	n.d.	0,56	n.d.	7,25	0,87	2,63	2,75
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,05	4,53	20,08	8,28	0,01	10,01	6,37	10,45	0,08
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	5,40	0,32	19,84	0,70	0,002	9,24	2,16	n.d.	0,02
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	0,01	4,83	0,01	0,89	0,01	n.d.	1,02	n.d.	24,49

Tabela A 3 - Concentração média de *musks* em amostras de pasta de dentes (mg.kg⁻¹)

	Pasta de dentes (mg.kg ⁻¹)					
	PD1	PD2	PD3	PD4	PD5	PD6
<i>Cashmeran</i>	0,05	0,04	n.d.	0,05	0,03	n.d.
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,00002	0,005	0,0002	0,00001	0,003	0,005
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---

Tabela A 4 - Concentração média de *musks* em amostras de pasta de dentes de criança (mg.kg⁻¹)

	Pasta de dentes de criança (mg.kg ⁻¹)					
	PDC1	PDC2	PDC3	PDC4	PDC5	PDC6
<i>Cashmeran</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	n.d.
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,001	0,005	0,04	0,006	0,0004	0,02
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---

Tabela A 5 - Concentração média de *musks* em amostras de sabonete líquido de mãos (mg.kg⁻¹)

	Sabonete líquido de mãos (mg.kg ⁻¹)						
	SLM1	SLM2	SLM3	SLM4	SLM5	SLM6	SLM7
<i>Cashmeran</i>	n.d.	1,02	0,52	18,74	n.d.	0,05	0,04
<i>Celestolide</i>	0,009	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	0,28	0,35	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	0,78	0,84	25,72	53,59	1,03	4,13	4,07
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	15,43	28,47	106,50	103,68	0,05	0,02	23,53
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	0,25	0,49	1,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,87	2,34
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 6 - Concentração média de *musks* em amostras de creme de mãos (mg.kg⁻¹)

	Creme de mãos (mg.kg ⁻¹)			
	CM1	CM2	CM3	CM4
<i>Cashmeran</i>	n.d.	2,56	n.d.	n.d.
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,78
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	6,95	34,24	28,54	n.d.
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,01	0,03	0,01	31,43
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	16,80
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---

Tabela A 7 - Concentração média de *musks* em amostras de desodorizante (mg.kg⁻¹)

	Desodorizante (mg.kg ⁻¹)											
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
<i>Cashmeran</i>	6,55	0,46	n.d.	8,55	3,17	5,44	2,63	0,60	0,77	6,03	n.d.	1,61
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,22	n.d.
<i>Exaltolide</i>	57,52	80,44	n.d.	12,12	39,24	n.d.	n.d.	0,20	16,45	137,72	65,70	n.d.
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,004	n.d.	0,0002	0,01	0,04	< LOQ	0,02	n.d.	< LOQ	0,06	n.d.	< LOQ
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	0,05	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 8 - Concentração média de *musks* em amostras de gel banho (mg.kg⁻¹)

	Gel banho (mg.kg ⁻¹)									
	GB1	GB2	GB3	GB4	GB5	GB6	GB7	GB8	GB9	GB10
<i>Cashmeran</i>	55,41	1,17	2,40	6,33	512,66	0,66	10,02	2,93	0,05	6,81
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,02
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	104,08	n.d.	1,93	10,91	532,94	9,82	6,50	62,21	0,59	23,15
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,32	0,03	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	0,11	460,07	6,02	161,00
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	54,46	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 9 - Concentração média de *musks* em amostras de pasta de dentes (mg.kg⁻¹)

	Gel banho criança (mg.kg ⁻¹)									
	GBB1	GBB2	GBB3	GBB4	GBB5	GBB6	GBB7	GBB8	GBB9	GBB10
<i>Cashmeran</i>	n.d.	0,61	n.d.	n.d.	1,05	n.d.	0,07	n.d.	0,86	0,27
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	309,75	n.d.	6,46	136,69	6,21	1,97	n.d.	0,17	n.d.	2,19
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,48	0,008	0,01	0,11	0,002	0,10	0,0004	0,045	0,02	0,01
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 10 - Concentração média de *musks* em amostras de champô (mg.kg⁻¹)

	Champô (mg.kg ⁻¹)										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	10	C11
<i>Cashmeran</i>	1,60	n.d.	0,28	n.d.	0,24	0,13	52,48	n.d.	n.d.	0,29	n.d.
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	0,09	n.d.	n.d.	n.d.	6	0,19	0,22	0,05	0,28
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	4,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	0,03	0,005	0,06
<i>Exaltolide</i>	3,63	n.d.	70,62	0,12	4,60	4,70	1752,30	59,92	n.d.	n.d.	7,93
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,01	< LOQ	571,65	0,005	80,33	0,001	12861,33	455,85	485,81	412,71	713,29
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,08
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 11 - Concentração média de *musks* em amostras de champô de criança (mg.kg⁻¹)

	Champô de criança (mg.kg ⁻¹)							
	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8
<i>Cashmeran</i>	n.d.	n.d.	1,63	0,17	0,26	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	0,48	0,29	2,97	1,95	0,19	4,10	6,70	n.d.
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,14	0,02	20,83	0,02	0,09	0,002	< LOQ	< LOQ
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	3,42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	0,46	12,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 12 - Concentração média de *musks* em amostras de condicionador (mg.kg⁻¹)

	Condicionador (mg.kg ⁻¹)							
	CO1	CO2	CO3	CO4	CO5	CO6	CO7	CO8
<i>Cashmeran</i>	1,47	n.d.	0,11	n.d.	n.d.	3,05	0,15	0,05
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	0,07	0,07	0,18	0,18	0,06	0,21
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	0,001	n.d.	n.d.	n.d.	0,0009	0,14
<i>Exaltolide</i>	0,68	1,06	50,91	12,21	33,83	47,58	0,27	n.d.
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,01	0,02	405,36	161,87	305,48	393,26	307,42	265,91
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	1,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 13 - Concentração média de *musks* em amostras de creme, leite e loção corporal (mg.kg⁻¹)

Creme, leite e loção corporal (mg.kg ⁻¹)								
	CLL1	CLL2	CLL3	CLL4	CLL5	CLL6	CLL7	CLL8
<i>Cashmeran</i>	22,48	0,07	n.d.	5,61	29,87	0,71	1,44	n.d.
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,44
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01
<i>Exaltolide</i>	1045,54	34,12	6,43	10,41	1421,41	11,57	26,15	n.d.
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	n.d.	< LOQ	n.d.	0,03	n.d.	0,001	< LOQ	309,23
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,34
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela A 14 - Concentração média de *musks* em amostras de creme, leite e loção corporal de criança (mg.kg⁻¹)

Creme, leite e loção corporal de criança (mg.kg ⁻¹)						
	CLLB1	CLLB2	CLLB3	CLLB4	CLLB5	CLLB6
<i>Cashmeran</i>	n.d.	n.d.	2,58	n.d.	0,36	0,47
<i>Celestolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Phantolide</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	5,44	101	7,59	n.d.	n.d.	25,40
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	0,05	0,26	0,03	0,05	0,02	0,01
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	n.d.	0,04	n.d.	0,02	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---	---	---

Tabela A 15 - Concentração média de *musks* em amostras de creme facial (mg.kg⁻¹)

Creme facial (mg.kg ⁻¹)				
	JA	JS	JC	JU
<i>Cashmeran</i>	1,82	1,41	0,20	0,28
<i>Celestolide</i>	0,004	n.d.	n.d.	0,02
<i>Phantolide</i>	0,06	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Exaltolide</i>	2,42	33,16	14,62	13,06
<i>Musk ambrette</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Galaxolide</i>	31,51	< LOQ	< LOQ	45,05
<i>Musk xylene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Tonalide</i>	10,49	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk moskene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk Tibetene</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Musk ketone</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ethylene Brassylate</i>	---	---	---	---

Anexo 2 – Poster apresentado em conferência internacional

ICCE 2013 - 14th EuChemS International Conference on Chemistry and the Environment, 25 - 28 June 2013, Barcelona (Spain)



Human Exposure Assessment to Musks in the Metropolitan Area of Porto (Portugal)

Vera Homem, Eduardo Silva, Lúcia Santos, Arminda Alves*

LEPAE, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, Portugal
Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal
*E-mail: aalves@fe.up.pt

Introduction

Synthetic musks are organic compounds commonly used in several cosmetics, personal care and household products like perfumes, lotions, deodorants, soaps, shampoos, detergents, etc. According to their chemical structure, they can be divided into four major classes – nitromusks, polycyclic, macrocyclic and aliphatic musks. When these compounds are consumed, part of them is drained into the sewer system and reaches the wastewater treatment plants (WWTPs) and part is volatilized. Without complete removal, the effluents discharges can contaminate the environment. Due to their extremely high incidence of utilization, lipophilic and persistent nature, synthetic musks tend to bioconcentrate and bioaccumulate in different matrices. Recent studies have contradicting the idea that these compounds were inert and had no toxic effects. However, due to the lack of information, there are no certainties about the real impact of musks. Therefore, it is extremely important to carry out Environmental Risk Assessment (ERA) studies. In line with this idea, it is essential to examine the concentrations of synthetic musks in personal care products to enable a prediction of the human and environmental exposure by measuring its inputs.

In this work, a simple, fast and reliable analytical method (QuEChERS/GC-MS) was used to analyse musks in personal care products. The products were chosen according to the usage patterns of the population in the Metropolitan Area of Porto, Portugal.

Experimental

SAMPLES	SAMPLE EXTRACTION (QUECHERS)	INSTRUMENTATION	METHOD VALIDATION
<ul style="list-style-type: none"> Personal care products were purchased in retail stores and perfumeries from Porto (Portugal) in 2012/2013. 	<p>EXTRACTION</p> <p>500 mg sample + 3 mL acetonitrile</p> <p>Vortex: 3 min Ultrasonids: 10 min</p> <p>QUENCHERS 1: 2400 mg MgSO₄ + 750 mg NaCH₃COO</p> <p>Vortex: 3 min Centrifuge: 10 min, 3700 rpm</p> <p>QUENCHERS 2: 180 mg MgSO₄ + 60 mg PSA + 30 mg C₁₈</p> <p>Vortex: 3 min Centrifuge: 3700 rpm, 10 min</p> <p>Concentrate to 1 mL (N₂ stream)</p> <p>* No special pre-treatment was applied to the analysis of perfumes, apart from the appropriate dilution with acetonitrile.</p>	<p>Varian Ion Trap GC-MS system with electron impact ionization</p> <ul style="list-style-type: none"> Column: CP-Sil 8 CB capillary column (50 m × 0.25 mm, 0.12 μm) Monitoring mode: Selected ion storage (SIS) Carrier gas: Helium (99.999%) at 1.0 mL min⁻¹ Manifold temperature: 50 °C Ion trap, transfer line and injector temperature: 250 °C Injection volume: 1 μL Filament emission current: 50 μA Oven temperature program: 60 °C (1 min) to 150 °C at a rate of 6 °C min⁻¹ (10 min), 225 °C at a rate of 6 °C min⁻¹, 300 °C at a rate of 20 °C min⁻¹ (2.5 min) Quantification ions: m/z 191 for cashmeran (DPMI); 229 for celestolide (ADBII); 229 for phantolide (AHMI); 67 for exaltolide (EXA); 253 for musk ambrette (MA); 243 for galaxolide (HHCB); 282 for musk xylene; 243 for tonalide (AHTN); 263 for musk moskene (MM); 251 for musk tibetene (MT); 279 for musk ketone (MK) and 83 for ethylene brassylate (EB) 	<ul style="list-style-type: none"> Linearity: 5 – 4000 μg L⁻¹ LOD^b: 0.01 ng g⁻¹ (HHCB) – 18.80 ng g⁻¹ (MX) Precision (%RSD): Perfumes: 1 – 5% Toothpastes: 2 – 13% Deodorants: 1 – 9% Body and hair wash: 1 – 10% Skin moisturizers: 2 – 19% Accuracy (%Rec): Toothpastes: 50 – 107% Deodorants: 89 – 104% Body and hair wash: 57 – 109% Skin moisturizers: 82 – 109% <p>^aLOD: detection limit (calculated from S/N = 3)</p> <p>Ethylene brassylate (EB) was only analysed in perfumes</p> <p><small>V. Homem, E. Silva, C. Cunha, A. Alves, L. Santos, New analytical method for the determination of musks in personal care products by QuEChERS extraction followed by GC-MS, Journal of Separation Science, 2013, DOI: 10.1002/jssc.201300190</small></p>

Results

SYNTHETIC MUSKS IN PERSONAL CARE PRODUCTS

- Most popular brands in the Metropolitan Area of Oporto were selected for each product category

Concentrations of synthetic musks in the personal care products most commonly used by the population of Metropolitan area of Oporto

- Toothpastes were also analysed. Only DPMI (0.041 μg.g⁻¹) and HHCB (0.002 μg.g⁻¹) were detected at trace levels.
- Synthetic musks were detected in all analysed samples
- Galaxolide (HHCB) was the most detected musk (81%)
- Toothpastes and hair conditioners were the personal care products with the lowest concentration of musks
- Banned nitromusks (MM, MA, MT) were not found in any analysed samples
- Galaxolide (HHCB) and exaltolide (EXA) were the predominant musks in the composition of personal care products

HUMAN EXPOSURE ASSESSMENT

The major source of human exposure to musks is expected to be the dermal application

Estimated daily dermal exposure to synthetic musks

Product type	Total amount per application ^a (g)	Frequency of Application ^a (day ⁻¹)	Retention factor ^a (%)	Exposure per day (g)	Average musk concentration (μg.g ⁻¹)	Daily dermal exposure to musks ^b (μg.kg ⁻¹ .bw.day ⁻¹)
Facial cream	0.75	2.00	100	1.60	53	1.41
Hand cream	0.50	0.80	100	0.40	51	0.34
Body lotion	8.00	0.71	100	5.68	488	46.26
Shampoo	8.00	1.00	1.0	0.08	1812	2.42
Hair conditioner	4.90	0.43	0.1	0.002	14	0.0005
Shower gel	5.00	1.00	1.0	0.05	288	0.24
Deodorant	0.50	1.00	100	0.50	55	0.46
Hand gel soap	0.80	6.00	1.0	0.05	68	0.05
Toothpaste	1.10	2.00	17	0.37	0.04	0.0003
Perfume	0.75	1.00	100	0.75	26658	333.23
TOTAL						384.40

$$\text{Daily exposure} = \frac{\text{Tot. amount} \times \text{Freq.} \times \text{RF} \times \text{C}}{\text{Body weight}}$$

Perfumes and body lotions were the highest contributors to the dermal exposure

^a Estimated values based on published studies
^b Adult body weight = 60 kg

Conclusions

Synthetic musks were detected in all analysed samples. Banned nitromusks were not found, but restricted nitromusks were detected in 4% of the samples, polycyclic in 98% and macrocyclic in 80%. Galaxolide, exaltolide and cashmeran were the most commonly detected compounds.

Toothpastes and hair conditioner revealed low levels of musks, while perfumes, shampoos and body lotions were the samples with the highest concentrations.

Considering a typical adult consume profile, estimation of a daily exposure to musks in the Metropolitan area of Porto was performed, exclusively using the analysed PCPs as sources. Daily dermal exposure is about 384.40 μg.kg⁻¹.bw.day⁻¹.



The authors would like to thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, for financial support (grant SFRH/BDP/76974/2011 and project PTDC/AGR/FL/102597/2008).

