

## ANEXO

### DETERMINAÇÃO DE TIMEROSAL NA VACINA

#### A) Proceder conforme Espectrofotometria de absorção no visível

##### **Ditizona, solução concentrada**

Dissolver 35 mg de ditizona em 80 mL de clorofórmio (para análise com ditizona). Transferir para balão volumétrico de 500 mL completar o volume com clorofórmio.

##### **Ditizona, solução diluída**

Diluir a solução concentrada de ditizona em clorofórmio (1:7).

#### **Procedimento para determinação de timerosal na amostra**

Homogeneizar a amostra e transferir 1 ml em duplicata para béqueres. Adicionar 3 ml de água purificada (diluição 1:4) e transferir 1 ml desta solução para um tubo de digestão. Adicionar 1 ml de água purificada e 2 ml de uma mistura de igual volume de ácido sulfúrico PA e ácido nítrico PA.

Levar a mistura à ebulição por 10 minutos. Resfriar. Adicionar 10 ml de água purificada e 2 ml de cloridrato de hidroxilamina a 50% (p/V). Levar novamente à ebulição por 1 minuto, resfriar e transferir o líquido para funil de separação filtrando através de algodão. Lavar o tubo com 70 ml de água purificada e transferir da mesma maneira para o funil de separação. Adicionar 10 ml da solução de ditizona 1:7, agitar vigorosamente por 1 minuto. Deixar em repouso por 1 minuto, filtrar em algodão e recolher a fase orgânica (clorofórmica) em Erlenmeyer. Proceder imediatamente a leitura do filtrado em espectrofotômetro a 490 nm. Preparo dos padrões e curva de calibração:

Preparar uma solução estoque de timerosal (1200 µg/ml em timerosal ou 600 µg/ml em Mercúrio).

A partir desta solução, preparar as soluções padrão em balões volumétricos de 100 ml. Estabelecer a curva de calibração com concentrações de 6 µg Hg/ml a 24 µg Hg/ml. Após o preparo das soluções padrão, proceder como descrito para a amostra. O branco é preparado utilizando-se 2 ml de água purificada no lugar da amostra. Utilizar a leitura dos padrões para fazer uma curva de calibração e determinar a concentração de timerosal na amostra por interpolação gráfica ou regressão linear.

#### B) Proceder conforme Espectrofotometria de absorção atômica

##### **Permanganato de potássio SR (aproximadamente 0,2 M)**

Especificação – Contém 3% (p/v) em água.

Estabilidade – Preparar para consumo imediato.

Conservação – Em recipientes bem fechados.

Armazenagem – Proteger da luz.

Segurança – Irritante. Cáustico.

#### **Procedimento para determinação de timerosal na amostra**

Transferir, quantitativamente, 1 ml da amostra para balão volumétrico de 50 ml, adicionar 0,5 ml de ácido nítrico e completar o volume com água bidestilada.

Preparar branco com água bidestilada. A partir de solução estoque de 1 000 ppm de Hg, preparar um padrão intermediário de 1 ppm de Hg e deste retirar alíquotas diferentes, de acordo com o intervalo de trabalho, transferindo-as para as células de reação contendo solução de permanganato de potássio. Determinar a absorvância a 253,6 nm em espectrofotômetro de absorção atômica com fonte de energia com lâmpada (6 mA) de catodo ôco de mercúrio, fenda H07 e nitrogênio como gás de arraste.

### **C) Proceder conforme Polarografia em pulso diferencial**

#### **Solução de nitrato de potássio 1000 mg/L**

Em balão volumétrico de 1 L, dissolver 1 g de nitrato de potássio e completar o volume com água deionizada.

#### **Solução de gelatina 1000 mg/L**

Em balão volumétrico de 200 mL, dissolver com água deionizada quente 200 mg de gelatina e completar o volumen com água deionizada.

#### **Eletrólito suporte**

Em um balão volumétrico de 1 L, pipetar 60 mL de solução de gelatina 1000 mg/L e completar o volume com solução de nitrato de potássio 1000 mg/L.

#### **Solução estoque de timerosal 200 ppm**

Em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver com água deionizada 20 mg de timerosal e completar o volume.

#### **Procedimento para determinação de timerosal na amostra**

Ajustar as condições operacionais, de acordo com o equipamento utilizado. Transferir para a célula polarográfica 10 mL do eletrólito suporte e 0,1 mL da solução padrão de timerosal de 200 ppm e fazer a leitura. Adicionar mais 0,1 mL do padrão de timerosal de 200 ppm nesta mesma célula e fazer nova leitura. Repetir o procedimento, consecutivamente, até obter os 5 pontos da curva analítica. Proceder então a análise da amostra, adicionando-se em uma nova célula polarográfica 10 mL do eletrólito suporte e 0,5 mL da amostra e fazer a leitura. Os pontos da curva analítica e as análises das amostras devem ser realizadas em triplicatas. Traçar a curva analítica e calcular a concentração de timerosal na amostra por interpolação gráfica, considerando-se o fator de diluição utilizado na análise.