



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Laura
Rubio Lareu

Tese de doutoramento

Estratexias analíticas integrais
para novos retos no control da
seguridade de cosméticos

Santiago de Compostela, 2022

Programa de Doutoramento en Ciencia e Tecnoloxía Química



TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTRATEGIAS ANALÍTICAS INTEGRAIS
PARA NOVOS RETOS NO CONTROL DA
SEGURIDADE DE COSMÉTICOS**

Laura Rubio Lareu

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E TECNOLOXÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022





DECLARACIÓN DA AUTORA DA TESE
ESTRATEGIAS ANALÍTICAS INTEGRAIS PARA NOVOS RETOS NO CONTROL DA
SEGURIDADE DE COSMÉTICOS

Dna. Laura Rubio Lareu

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En Santiago de Compostela, a 18 de Outubro de 2022

Asdo: Laura Rubio Lareu



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE
ESTRATEGIAS ANALÍTICAS INTEGRAIS PARA NOVOS RETOS NO
CONTROL DA SEGURIDADE DE COSMÉTICOS

Dna. Marta Lores Aguíñ

Dna. Carmen García Jares

INFORMAN:

Que a presente tese correspóndese co traballo realizado por Dna. Laura Rubio Lareu, baixo a nosa dirección/titorización, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directoras desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declaran tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de compendio de publicacións, nos que a participación da doutoranda foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, a 18 de Outubro de 2022

Asdo. Marta Lores Aguíñ

Asdo. Carmen García Jares



AGRADECIMENTOS

Despois destes catro anos, foron moitas as persoas que estiveron presentes dalgunha maneira nesta viaxe.

Quero comezar agradecendo ás miñas directoras, Marta Lores e Carmen Garcia-Jares, pola oportunidade de poder realizar esta tese doutoral e formarme con elas. Grazas Marta, por ese amor a primeira vista naquelas prácticas de QA III, por esa conexión e por mantela. A Carmen coñecina máis tarde, pero confiou en min dende o primeiro momento e grazas pola calma e tranquilidade. Grazas a ambas polo apoio, entusiasmo e axuda incondicional.

Grazas á equipa de LIDSA, á outra familia, con esa coa que, ás veces, compartimos máis tempo que coa propia. María C. ti es LIDSA, axuda constante e un pilar imprescindible. Grazas por reivindicar xuntas os nosos dereitos na USC e por todas esas nosas conversas. Grazas tamén aos meus *Doutorandiños*, por compartirmos esta etapa tan importante xuntos, apoiarnos e axudarnos. Aly, grazas por ser o meu compi de lab e todo o que implica, por ensinarme palabras e expresións latinas e por transmitir sempre a túa alegría. Lúa, grazas por estar sempre para as miñas preguntas tontas e por facerme un punto falando galego! Dani, sempre tan amable e disposto a botar unha man, e incluso ata responderme tamén en galego. Tamén ao último en chegar, Miguel, grazas por poñerme boa cara sempre que che pedía algo. Grazas tamén a María Llompart polos bos momentos na docencia das prácticas.

Pero LIDSA tamén son todas aquelas persoas que ao longo destes anos foron pasando polo laboratorio, que non quero esquecerme delas: técnicos, estudantes de TFGs (en especial, a “miña” Andrea),... Teño que facer unha especial mención a Pablo, por axudarme en todo cando comecei en LIDSA co TFG e TFM. A Perla, por transmitirmos todos os seus coñecementos. Grazas a Marlene e Eugenia por acompañarme nos inicios e a Rocío por seguilo facendo aínda agora. Grazas tamén aos que viñeron por un par de meses: Ante, Kristina, Edgar... pero en especial a Pi e Mika. Thanks for all our moments! I would also like to thank Mika, for our connection, for keep this

friendship, for "reading" my messages and helping me and for feeling you so close even though you are so far away.

Quero agradecer ao Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía por refuxiarme durante estes anos e aos veciños do GETEE. Tamén á Xunta de Galicia, ao proxecto NeoGiANT e ao programa ERASMUS+ pola financiación para os contratos e estancia.

Muito obrigada à Professora Cristina Barrocas Dias por me ter acolhido no laboratório Hércules da Universidade de Évora durante três meses. A Pedro e, especialmente a Mafalda, por ter comprendido o meu galego e se ter conectado comigo. Obrigada também aos meus colegas de Évora, Lisa e o nosso gato Semi, que se converteram em parte de mim.

Grazas ás miñas amigas Laura e Rocío, por apoiarme sempre aínda que non entenderan moi ben o que estaba facendo. E grazas por comprender a falta de tempo dos últimos meses.

Grazas aos amigos da carreira: Isa, Noemi, Xandro, Amancio, Kiko, Cris, Lara, Andrea, a pesar da distancia, estamos dalgunha maneira ao outro lado. Grazas a demais amigos e familia. En especial, quero agradecerlle a miña nai por todo o que fixo por min sempre e polo apoio (aínda que á súa maneira) destes anos. Grazas ás persoas que me acompañaron pero que lamentablemente hoxe non están. Á miña avoa, sempre soñei con que estiveras neste momento e non puido ser. Todo isto vai por ti, agardo que te sintas tan orgullosa de min como o estou eu de ti.

E por último, pero non menos importante, grazas (unha vez máis) por todo, Dani, por apoiarme e por aturarme cando nin eu mesma o fago. Non só por non deixarme caer, senón tamén por tenderme a man para levantarme e recordarme que eu podoo. Grazas tamén á túa familia por considerarme unha máis, suplir esa falta que eu teño e por alegrarse dos meus éxitos como se fosen teus.

ÍNDICE

Abreviaturas e acrónimos	i
Abstract	vii
I. Xustificación e obxectivos	1
II. Introducción	9
1. COSMÉTICOS	11
1.1. Introducción	11
1.2. Clasificación	12
1.3. Compostos obxectivo	13
<i>1.3.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)</i>	13
<i>1.3.2. Plastificantes</i>	14
<i>1.3.3. Outros compostos considerados</i>	17
<i>1.3.4. Glicois e derivados</i>	20
<i>1.3.5. Fragancias</i>	22
<i>1.3.6. Conservantes</i>	26
1.4. Aspectos regulatorios	28
1.5. Antecedentes analíticos	30
2. COSMÉTICOS <i>EXTREMOS</i> E PRODUTOS <i>BORDERLINE</i>	33
2.1. Introducción	33
2.2. Cosméticos <i>extremos</i>	33
2.3. Produtos <i>borderline</i>	34
<i>2.3.1. Tatuaxes e tinturas de henna</i>	35

2.3.2. <i>Tatuaxes de jagua</i>	37
2.4. Aspectos regulatorios	38
2.5. Antecedentes analíticos	41
3. INGREDIENTES NATURAIS	45
3.1. Introducción	45
3.2. Tipos	46
3.2.1. <i>Aceites esenciais (AEs)</i>	46
3.2.2. <i>Extractos naturais (ENs)</i>	47
3.3. Substancias de especial interese	48
3.3.1. <i>Outras fragrancias alerxénicas</i>	48
3.3.2. <i>Compostos polifenólicos</i>	51
3.4. Aspectos regulatorios	56
3.5. Antecedentes analíticos	57
4. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MOSTRA	61
4.1. Introducción	61
4.2. Dispersión da matriz en fase sólida (MSPD)	62
4.2.1. <i>Introdución</i>	62
4.2.2. <i>Procedemento experimental e factores da MSPD</i>	63
4.2.3. <i>Últimas tendencias e aplicacións</i>	65

4.3. Extracción asistida por ultrasóns (UAE)	66
4.3.1. <i>Introdución</i>	66
4.3.2. <i>Procedemento experimental e factores da UAE</i>	66
4.3.3. <i>Aplicacións</i>	67
4.4. Microextracción en fase sólida (SPME)	68
4.4.1. <i>Introdución</i>	68
4.4.2. <i>Procedemento experimental SPME</i>	69
4.4.3. <i>Factores que inflúen na eficiencia da extracción</i>	71
4.4.4. <i>Aplicacións</i>	72
4.5. Dixestión ácida	72
4.6. Tendencia á mínima preparación de mostra	73
5. TÉCNICAS DE ANÁLISE	75
5.1. <i>Introdución</i>	75
5.2. <i>Cromatografía de gases (GC)</i>	76
5.2.1. <i>Introdución</i>	76
5.2.2. <i>Espectrometría de masas</i>	76
5.3. <i>Cromatografía de líquidos (LC)</i>	78
5.3.1. <i>Introdución</i>	78
5.3.2. <i>Detector de diodos (DAD)</i>	79
5.3.3. <i>Espectrometría de masas (MS)</i>	80
5.3.3.1. <i>Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)</i>	81

5.3.3.2. <i>Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)</i>	82
5.4. Espectroscopia de absorción molecular UV-Vis	83
5.4.1. <i>Contido Fenólico Total (TPC)</i>	84
5.4.2. <i>Actividade Antioxidante (AA)</i>	84
5.5. Espectrometría de masas con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)	85
5.6. Outras técnicas	86
5.6.1. <i>Fluorescencia de raios X (XRF)</i>	87
5.6.2. <i>Difracción de raios X (XRD)</i>	87
5.6.3. <i>Microscopia electrónica de barrido acoplada a espectrometría de raios X de dispersión de enerxía (SEM-EDS)</i>	88
Referencias	91
III. Metodoloxía	117
IV. Resultados e Discusión	123
Capítulo 1. DETERMINACIÓN DE INGREDIENTES EN COSMÉTICOS	125
1.1. <i>Multi-target strategy to uncover unexpected compounds in rinse-off and leave-on cosmetics</i>	129
1.2. <i>Miniaturized sample preparation methods to simultaneously determine the levels of glycols, glycol ethers and their acetates in cosmetics</i>	131

Capítulo 2. ANÁLISE DE COSMÉTICOS *EXTREMOS* E PRODUTOS *BORDERLINE* **133**

- 2.1. *Extreme cosmetics and borderline products: an analytical-based survey of European regulation compliance* 137

Capítulo 3. CARACTERIZACIÓN DE TATUAXES E TINTES CAPILARES TEMPORAIS **139**

- 3.1. *Monitoring of natural pigments in henna and jagua tattoos for fake detection* 145

- 3.2. *High-resolution mass spectrometry for the comprehensive characterization of plant pigment-based tattoos and dyes formulations* 147

- 3.3. *Understanding the chemical and mineralogical composition of commercial henna and jagua tattoos and dyes – a multi-analytical approach* 149

- 3.4. *The chemistry behind the body art: Unveiling the elemental profile and heavy metal content of natural tattoos and dyes by ICP-MS* 151

Capítulo 4. INGREDIENTES NATURAIS EN FORMULAÇÕES COSMÉTICAS **183**

- 4.1. *Natural extracts and essential oils as ingredients in cosmetics: allergen survey and search for potential phytomarkers* 187

- 4.2. *Sourcing new ingredients for organic cosmetics: phytochemicals of *Filipendula vulgaris* flower extracts* 207

V. Discusión xeral	229
VI. Conclusions	251
Anexo I: Lista de publicacións	261
Anexo II: Review	267
<i>Body-decorating products: Ingredients of permanent and temporary tattoos from analytical and European regulatory perspectives</i>	269
Anexo III: Permisos das revistas	271
Anexo IV: Índice de figuras e táboas	277

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

			#
μ-MSPD	micro-dispersión da matriz en fase sólida	micro-matrix solid-phase dispersion	
μ-XRD	microdifracción de Raios X	micro-X-ray diffraction	
			A
AA	actividade antioxidante	antioxidant activity	
AE/EO	aceite esencial	essential oil	
AEMPS	Axencia Española de Medicamentos e Produtos Sanitarios	Spanish Medicines and Medical Products Agency	
AP	alquilfenol	alkylphenol	
APCI	ionización química a presión atmosférica	atmospheric pressure chemical ionization	
APEO	etoxilato de alquilfenol	alkylphenol ethoxylate	
			B
bbCID	disociación inducida por colisión de banda ancha	broadband collision-induced dissociation	
BDP	produtos de decoración corporal	body-decorating products	
BHA	butilhidroxianisol	butylhydroxyanisole	
BHT	butilhidroxitolueno	butylated hydroxytoluene	
			C
CAS	Chemical Abstracts Service		
CE/EC	Comisión Europea	European Commission	
CI	número de Índice de Cor	Color Index number	
CosIng	base de datos de ingredientes cosméticos	Cosmetic Ingredient Database	
CRC	cela de colisión e reacción	collision-reaction cell	

D

DAD	detector de rede de diodos	diode array detector
DI	inmersión directa	direct immersion

E

EI	ionización electrónica	electron ionization
EN/NE	extracto natural	natural extract
EPA	Axencia de Protección Ambiental	Environmental Protection Agency
ESI	ionización por electrospray	electrospray ionization

F

FE	fase estacionaria	stationary phase
FM	fase móbil	mobile phase
FS	escaneo completo	full scan

G

GC	cromatografía de gases	gas chromatography
GMP	boas prácticas de manufactura	good manufacturing practice

H

h	portátil	handheld
HESI	ionización por electrospray con temperatura	heated electrospray ionization
HNQ	2-hidroxi-1,4-naftoquinona	2-hydroxy-1,4-naphthoquinone
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia	high-performance liquid chromatography
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución	high-resolution mass spectrometry
HS	espazo de cabeza	headspace

HD	tintura capilar de henna	henna (hair) dye
HT	tatuaxe de henna	henna tattoo
HTD	tatuaxe-tintura de henna	henna tattoo-dye
HPT	tatuaxe derivado de planta	herbaceous plant tattoo
I		
ICP	plasma acoplado indutivamente	inductively coupled plasma
i.d.	diámetro interno	internal diameter
ISO	Organización Internacional de Normalización	International Organization for Standardization
J		
JT	tatuaxe de jagua	jagua tattoo
L		
LC	cromatografía de líquidos	liquid chromatography
LMR/MRL	límite máximo de residuo	maximum residue level
LOD	límite de detección	limit of detection
LOQ	límite de cuantificación	limit of quantification
M		
MS	espectrometría de masas	mass spectrometry
MS/MS	espectrometría de masas en tándem	tandem mass spectrometry
MW	peso molecular	molecular weight
m/z	relación masa-carga	mass-to-charge ratio
P		
PAH	hidrocarburo aromático policíclico	polycyclic aromatic hydrocarbon
PCP	produto de coidado persoal	personal care product

PDMS/	polidimetilsiloxano/	polydimethylsiloxane/
DVB	divinilbenceno	divinylbenzene
PPD	para-fenilendiamina	<i>p</i> -phenylenediamine
PTFE	politetrafluoroetileno	polytetrafluoroethylene

Q

QqQ	espectrómetro de masas de triplo cuadrupolo	triple-quadrupole mass spectrometer
QTOF	espectrometría de masas cuadrupolar e de tempo de voo	quadrupole time-of-flight mass spectrometry

R

RSD	desviación estándar relativa	relative standard deviation
------------	------------------------------	-----------------------------

S

SEM-EDS	microscopia electrónica de barrido acoplada a espectrometría por dispersión de enerxía de raios X	scanning electron microscopy coupled to energy dispersive X-ray spectrometry
SCCS	Comité Científico para a Seguridade dos Consumidores	Scientific Committee on Consumer Safety
SIM	monitorización de ións seleccionados	selected ion monitoring
SPME	microextracción en fase sólida	solid phase microextraction
SRM	monitorización de reaccións seleccionadas	selected reaction monitoring
Sup-	soportado/con soporte	supported

T

TOF	tempo de voo	time-of-flight
TPC	contido fenólico total	total phenolic content

U

UAE	extracción asistida por ultrasóns	ultrasound assisted extraction
UE/EU	Unión Europea	European Union
UHPLC	cromatografía líquida de ultra alta eficacia	ultra-high performance liquid chromatography
US	ultrasóns	ultrasounds
UV	ultravioleta	ultraviolet
UV-Vis	ultravioleta-visible	ultraviolet-visible

V

VP	presión variable	variable pressure
-----------	------------------	-------------------

X

XRD	difracción de raios X	X-ray diffraction
XRF	fluorescencia de raios X	X-ray fluorescence
XRPD	difracción de raios X en po	X-ray powder diffraction

ABSTRACT

The main objective of this thesis was the development of analytical methodologies to overcome challenges in the analysis of cosmetic ingredients. The first goal involves the determination of families of compounds widespread used in cosmetics. The second aim was focused on the characterization of plant-based temporary tattoos and dyes. Natural extracts and essential oils with potential applications as cosmetic ingredients were also included. For these purposes, different extraction techniques followed by analysis using several techniques highlighting chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry, have been used.

The present thesis comprises six sections. In **Section I** -Justification and objectives- the motivation and the main aims of this work are explained. In addition, the importance of developing analytical methodologies for the analysis of selected samples is highlighted. **Section II** -Introduction- is an overview about the target analytes and samples studied, including their classification, analytical background as well as the legal framework, followed by an explanation of the different analytical techniques employed. In **Section III** -Methodology- a brief description of the sample preparation and analytical techniques used is displayed. **Section IV** -Results and discussion- includes the presentation and discussion of the experimental work and obtained results carried out during this thesis.

The different studies are compiled in 9 works, of which six are articles already published, one is under review for publication and other two are prepared for submission, resulting in four different chapters:

Chapter 1. Determination of ingredients in cosmetics

This chapter includes two publications dealing with the analysis of a broad range of ingredients in cosmetics. The first one is based on the miniaturization of matrix solid-phase dispersion (μ -MSPD) followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) or liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-

MS/MS) to identify unexpected compounds in cosmetics. Regarding the second one, two environmentally friendly methodologies based on ultrasound-assisted extraction (UAE) and μ -MSPD combined with GC-MS analysis are proposed for the simultaneous determination of glycols and derived compounds in cosmetics.

Chapter 2. Analysis of *extreme* cosmetics and *borderline* products

This chapter is based in an article that address the assessment of an UAE procedure for the analysis of 70 ingredients in commercial cosmetic products of both extreme characteristics or considered as *borderline*. In addition, the potential transfer of plasticizers from plastic applicators to the cosmetics is investigated using a *Supported-UAE* (*Sup-UAE*) method. After GC-MS analysis, special attention is given to the results for certain ingredients such as phthalates, fragrances, and preservatives.

Chapter 3. Characterization of temporary tattoos and hair dyes

This chapter includes four works. The first one is an article conducted to identify the expected active ingredients in temporary henna and jagua tattoo products, and to confirm the absence of a recognized allergen such as *p*-phenylenediamine (PPD), by high-performance liquid chromatography with diode array detectors (HPLC-DAD) and ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry (QTOF-HRMS), respectively. The second article goes further by going deeper in the characterization of both temporary tattoo and hair dye products, performing targeted and untargeted analyses by UHPLC-QTOF-HRMS. The last two works deal with the inorganic composition of 34 commercial products for temporary tattooing and dyeing. One is based on a multi-analytical approach involving handheld X-ray fluorescence (h-XRF), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy coupled to energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS) conducted to obtain information on the mineralogical composition. The other work (under review) provides an informative

overview of the heavy metal contents in this type of products by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In both works, the results are discussed considering the European current cosmetic regulation and the potential risk to human health.

Chapter 4. Natural ingredients in cosmetic formulations

This last chapter comprises two works prepared for submission. The first one is focused on the analytical characterization of essential oils and natural extracts using direct injection and solid phase microextraction (SPME) followed by GC-MS analysis. Major components as well as phytomarkers and allergens are investigated. In the second work, the polyphenolic profile of extracts obtained from a partially or totally uncharacterized Galician organic crops is explored. UAE technique using green solvents and subsequent analysis by LC-MS/MS is proposed. Also, spectrophotometric indexes such as total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (AA) are evaluated. In both studies, the analyzed samples are intended to be used as natural ingredients in cosmetics.

In addition to these 9 works, during this PhD project, a review about ingredients of permanent and temporary tattoos has been published and it has been included in Annex II at the end of this thesis. This article comprehensively compiles their regulatory status in the European Union framework, as well as the analytical methodologies for the safety control of this type of products reported in the international scientific literature from the last two decades (2000-2019). Pigments, impurities, degradation products and other undesirable compounds are among the ingredients covered in this work.

Section V -General discussion- includes an overall discussion putting into a cohesive context all studies presented in the previous section.

Finally, **Section VI** comprehends the general conclusions extracted from the work presented in this thesis.

I. XUSTIFICACIÓN E OBXECTIVOS

Nos últimos anos, a preocupación pola imaxe é unha das características máis visibles da sociedade moderna desencadeando unha demanda que medra vigorosamente e un elevado consumo diario de produtos cosméticos e de coidado persoal. Isto supón un alto grao de exposición a multitude de compoñentes, polo que existe un crecente interese polo control da calidade e seguridade destes produtos.

A Unión Europea prohíbe ou restrinxe o uso de moitas substancias empregadas en cosmética mediante o Regulamento CE No 1223/2009 e as regulacións vixentes están en continua revisión. Aínda así, o descoñecemento ou información imprecisa referente aos ingredientes ou aditivos que poden conter os cosméticos é unha realidade.

Ademais, ante as actuais demandas, aparecen cosméticos con novos formatos así como outros que responden ás tendencias da cosmética natural, para os cales aínda non existe regulación específica.

Deste xeito, é preciso desenvolver estratexias analíticas que dean resposta aos novos retos que xorden do control dos ingredientes nos produtos cosméticos.

Así, esta tese foi levada a cabo baseándose nos seguintes obxectivos:

- I. Optimización de metodoloxías multianalito para a determinación de diferentes ingredientes en produtos cosméticos.

Desenvolveuse un método baseado na micro-dispersión da matriz en fase sólida (μ -MSPD), unha técnica de extracción miniaturizada que permite resultados adecuados empregando cantidades moi pequenas de disolventes. Para a análise de compostos non desexados en cosméticos, elixíronse as configuracións de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ou cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). **(Sección IV, Capítulo 1, 1.1).**

Propuxéronse dúas metodoloxías empregando extracción asistida por ultrasóns (UAE) e μ -MSPD combinadas con GC-MS

para a determinación de glicois e produtos derivados en cosméticos. Ambas estratexias se poden definir como verdes e respectuosas co medio ambiente (**Sección IV, Capítulo 1, 1.2**).

II. Abordaxe da análise de cosméticos de novo formato.

Fíxose unha selección de 70 ingredientes, incluíndo ftalatos, fragancias e conservantes frecuentes; así como de 50 produtos comerciais, abarcando tanto cosméticos *extremos* como *borderline* (**Sección IV, Capítulo 2, 2.1**).

Para a determinación dos ingredientes mencionados no amplo rango de mostras cosméticas seleccionadas, deseñáronse metodoloxías de UAE seguidas de análise mediante GC-MS. No caso de aqueles produtos que contaban con aplicadores de plástico, unha modificación desta técnica foi necesaria, UAE con soporte (*Sup-UAE*), para investigar a posible transferencia de plastificantes dende os dispositivos aos cosméticos.

Ademais de avaliar o cumprimento coa normativa europea, tamén se levou a cabo un estudo para comprobar se a etiquetaxe era correcta.

III. Desenvolvemento de métodos analíticos para a caracterización de tatuaxes e tinturas temporais con base natural.

Seleccionouse unha ampla variedade de produtos comercializados para tatuaxes temporais de henna e jagua. Despois da dilución das mostras, identificáronse os seus ingredientes activos mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detector de rede de diodos (HPLC-DAD), podendo detectar así posibles fraudes nestes produtos. Confirmouse tamén a ausencia nas mostras de para-fenilendiamina (PPD), un alérxeno reportado, empregando cromatografía líquida de ultra alta eficacia seguida de espectrometría de masas de alta resolución cuadrupolar e de tempo de voo (UHPLC-QTOF-HRMS). (**Sección IV, Capítulo 3, 3.1**).

Aplicouse un método baseado en UHPLC-QTOF-HRMS para cuantificar os ingredientes activos (*target*) así como realizar

paralelamente unha análise non dirixida (*non-target*) para profundar no coñecemento dos constituíntes de mostras temporais de tatuaxes e tinturas de pelo de henna e jagua. (**Sección IV, Capítulo 3, 3.2**).

- IV. Aplicación de diferentes enfoques analíticos co propósito de afondar na caracterización global de tatuaxes e tinturas con base de henna e jagua.

Para este fin, propónse unha aproximación multianalítica, incluíndo tres técnicas complementarias: fluorescencia de raios X portátil (h-XRF), difracción de raios X (XRD) e microscopia electrónica de barrido acoplada a espectrometría por dispersión de enerxía de raios X (SEM-EDS). Obtense información sobre o grao de homoxeneidade e da composición mineralóxica, contrastando coa regulación de cosméticos. (**Sección IV, Capítulo 3, 3.3**).

Por outra banda, desenvólvese unha metodoloxía de dixestión ácida seguida da análise mediante espectrometría de masas con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) para estudar o contido metálico e avaliar impurezas, comentando os posibles riscos para a saúde humana. (**Sección IV, Capítulo 3, 3.4**).

- V. Estudo de ingredientes naturais con potencial aplicación en formulacións cosméticas.

Levouse a cabo a caracterización de mostras de aceites esenciais e extractos naturais. Aplicáronse metodoloxías que implican dilucións sinxelas e análise directa ou microextracción en fase sólida (SPME) seguidas en ambos casos por GC-MS. Investigouse o contido alerxénico e os potenciais fitomarcadores. (**Sección IV, Capítulo 4, 4.1**).

A partir de cultivos galegos ecolóxicos pouco explorados, como o caso da Filipéndula (*Filipendula vulgaris*), obtivéronse extractos empregando UAE. Estudouse o seu perfil polifenólico mediante análise por LC-MS/MS. Tamén se avaliaron os índices de contido total fenólico (TPC) e actividade antioxidante (AA)

realizando medidas espectrofotométricas. (**Sección IV, Capítulo 4, 4.2**).

II. INTRODUCCIÓN

1. Cosméticos

1.1. INTRODUCCIÓN

Os cosméticos ou produtos de coidado persoal (PCPs) constitúen un grupo moi importante de produtos de consumo que xoga un papel esencial no estilo actual de vida das persoas. O seu uso remóntase a miles de anos de historia, cando as diferentes poboacións xa os empregaban como parte da hixiene ou con fins decorativos. Foi dende principios do século XX cando a industria cosmética experimentou un crecemento exponencial, converténdose nun sector global e dinámico. Ademais, os fabricantes melloran ou reformulan unha cuarta parte dos ingredientes dos produtos cosméticos cada ano para manterse á vangarda nun mercado altamente competitivo. Esta innovación constante está impulsada polos cambios nas expectativas e preferencias dos consumidores.

A palabra “*cosméticos*” vai máis aló dos cosméticos tradicionais, recoñecidos como maquillaxe, xa que tamén inclúe outros produtos fundamentais para o coidado da hixiene persoal. Así, os produtos cosméticos defínense na actual regulación vixente en Europa, CE No 1223/2009 [1], como “toda substancia ou mestura destinada a ser posta en contacto coas partes superficiais do corpo humano (epiderme, sistema piloso e capilar, uñas, beizos e órganos xenitais externos) ou cos dentes e mucosas da cavidade bucal, co fin exclusivo ou principal de limpalos, perfumalos, modificar o seu aspecto, protexelos, mantelos en bo estado ou corrixir olores corporais”.

O uso xeneralizado destes produtos provoca certa preocupación na sociedade sobre os efectos prexudiciais que algúns ingredientes das

formulacións cosméticas finais poden ter na saúde dos consumidores. Deste xeito, gañou importancia o control da seguridade dos cosméticos [2] e medrou a esixencia social por unha información clara no etiquetado sobre a súa composición.

Os cosméticos e PCPs empregados na vida cotiá das persoas son matrices complexas, formadas por unha gran variedade de compostos químicos, incluíndo familias de diferente natureza.

1.2. CLASIFICACIÓN

As formulacións cosméticas poden clasificarse atendendo ao seu propósito (hixiene, mantemento, protección e tratamento da pel etc.) ou á zona do corpo na que se apliquen (pel, ollos, beizos). Desta maneira, existe un amplo rango de produtos xerais ou máis específicos tales como: produtos de hixiene persoal (xabóns, xeles, desodorizantes, perfumes); para tratamentos faciais, incluíndo beizos, ollos e cabelo (cremas, locións, máscaras, maquillaxe, xampús, tinturas, lacas); destinados ao coidado corporal (cremas, xeles e aceites para a pel); cremas solares e produtos relacionados. En relación ás formas cosméticas nas que se poden presentar estes produtos, diferéncianse: cremas, emulsións, suspensións, solucións, pos, aerosois, espumas, lapis, barras, entre outras.

Así mesmo, a lexislación tamén establece a diferenza entre os produtos destinados a permanecer na superficie de contacto durante un tempo (produtos de permanencia ou *leave-on*) e aqueles outros que se eliminan tras a súa aplicación (produtos de aclarado ou *rinse-off*). Este é un aspecto importante dado que certos ingredientes están autorizados en distintas proporcións en función do tipo de cosmético.

1.3. COMPOSTOS OBXECTIVO



Ao longo desta tese, diferentes familias de compostos químicos usados nos cosméticos e PCPs foron determinadas.

1.3.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

Os hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compostos orgánicos constituídos por dous ou máis aneis de benceno fusionados entre si. Algunhas formulacións cosméticas precisan unha viscosidade específica que permita crear unha película protectora na pel (por exemplo, os bálsamos labiais) e para este fin presentan bases en vaselina ou aceites minerais. Os ingredientes permitidos que proceden da destilación incompleta do petróleo, poden introducir PAHs nos produtos finais tras o proceso de fabricación. Debido á súa ubicuidade, alta estabilidade no medio ambiente e toxicidade, 16 PAHs foron catalogados pola Axencia de Protección Ambiental dos Estados Unidos (EPA) como contaminantes prioritarios. A vía de exposición máis frecuente prodúcese por inhalación. Adicionalmente, unha gran parte deles están considerados como posibles carcinóxénicos en humanos [3,4].

A **Táboa 1.1** amosa os PAHs considerados nos traballos desta tese, cos números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

Táboa 1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

PAHs	Número CAS	MW	Estrutura química
Naftaleno (NAP)	91-20-3	128,2	
Acenaftileno (ACY)	208-96-8	152,2	

Táboa 1.1. (cont.) Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

PAHs	Número CAS	MW	Estrutura química
Acenafteno (ACE)	83-32-9	154,2	
Fluoreno (FLU)	86-73-7	166,2	
Fenantreno (PHEN)	85-01-8	178,2	
Antraceno (ANC)	120-12-7	178,2	
Fluoranteno (FLA)	206-44-0	202,3	
Pireno (PYR)	129-00-0	202,3	
Benzo[a]antraceno (B[a]A)	56-55-3	228,3	
Criseno (CHY)	218-01-9	228,3	
Benzo[b]fluoranteno (B[b]F)	205-99-0	252,3	
Benzo[k]fluoranteno (B[k]F)	207-08-9	252,3	
Benzo[a]pireno (B[a]P)	50-32-8	252,3	

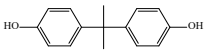
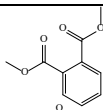
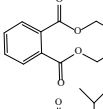
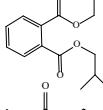
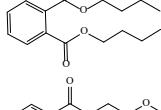
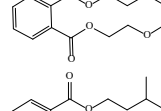
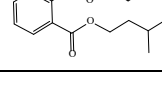
1.3.2. Plastificantes

Os plastificantes presentan múltiples usos como ingredientes na formulación de produtos cosméticos. Empréganse como disolventes e diluúntes sen olor, fixadores de fragancias, aditivos para incrementar a suavidade ou potenciar o brillo e para favorecer a penetración en

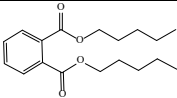
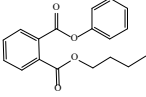
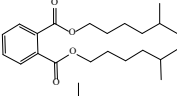
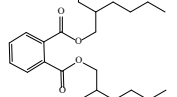
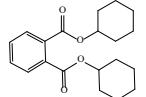
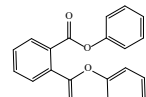
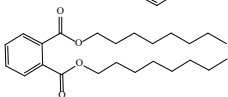
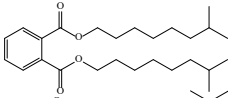
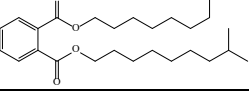
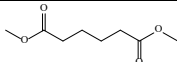
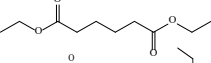
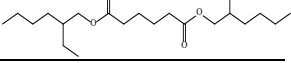
produtos como esmaltes, lacas para o cabelo ou perfumes. Así e todo, tamén poden migrar do envase de plástico ao produto cosmético, causa á que se asocia a súa presenza frecuente nas formulacións [5]. Pódense diferenciar segundo o ácido do que están formados: ftalatos (ésteres do ácido ftálico con varios alcohois) e adipatos (ésteres do ácido adípico). Algúns ftalatos están relacionados cunha potencial toxicidade [6] e incluso son clasificados como disruptores endócrinos [7].

A **Táboa 1.2** mostra os plastificantes obxectivo, os seus números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

Táboa 1.2. Plastificantes, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Plastificantes	Número CAS	MW	Estrutura química
Bisfenol A (BPA)	80-05-7	228,3	
Ftalatos			
Dimetilftalato (DMP)	131-11-3	194,2	
Dietilftalato (DEP)	84-66-2	222,2	
Diisobutilftalato (DIBP)	84-69-5	278,3	
Dibutilftalato (DBP)	84-74-2	278,3	
Dimetoxietilftalato (DMEP)	117-82-8	282,3	
Diisopentiloftalato (DIPP)	605-50-5	306,4	

Táboa 1.2. (cont.) *Plastificantes, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.*

Plastificantes	Número CAS	MW	Estrutura química
Ftalatos			
Dipentilftalato (DPP)	131-18-0	306,4	
Bencilbutilftalato (BBP)	85-68-7	312,4	
Diisoheptilftalato (DIHP)	41451-28-9	362,5	
Di(etilhexil)ftalato (DEHP)	117-81-7	390,6	
Diciclohexilftalato (DCHP)	84-61-7	330,4	
Difenilftalato (DPhP)	84-62-8	318,3	
Di-n-octilftalato (DNOP)	117-84-0	390,6	
Diisonilftalato (DINP)	28553-12-0	418,6	
Diisodecilftalato (DIDP)	89-16-7	446,7	
Adipatos			
Dimetiladipato (DMA)	627-93-0	174,2	
Dietiladipato (DEA)	141-28-6	202,2	
Di(etilhexil)adipato (DEHA)	103-23-1	370,6	

1.3.3. Outros compostos considerados

Existen outras agrupacións de compostos non desexados en cosméticos como os pesticidas, nitrosaminas, alquilfenois (APs) derivados de etoxilatos de alquilfenol (APEOs) ou tintes oxidativos.

En canto aos pesticidas, a Comisión Europea (CE) defíneos como "algo que prevén, destrúe ou controla un organismo nocivo ("praga") ou unha enfermidade, o que protexe os vexetais ou os produtos vexetais durante a súa produción, almacenamento e transporte". Hai unha gran diversidade de pesticidas, e pódense distinguir diferentes familias segundo o organismo sobre o que actúan, como herbicidas, insecticidas e funxicidas, entre outros moitos [8]. Os pesticidas poden ser empregados para tratar plantas que se usan como materia prima de ingredientes cosméticos naturais, polo que se poden transferir trazas destes aos produtos acabados. A pesar do seu uso xeneralizado, existe unha preocupación pública polos danos que poden ocasionar debido á súa toxicidade tanto para o medio ambiente como para a saúde animal e humana.

A presenza de trazas de nitrosaminas nos cosméticos pode ter a súa orixe tanto nas materias primas coma nos produtos xerados na formulación, mediante a reacción de compostos que conteñen nitróxeno (aminas secundarias ou terciarias), axentes nitrosantes (óxidos de nitróxeno) ou outros ingredientes permitidos que conteñan grupos nitro (como por exemplo os conservantes bronoprol ou bronidox).

Os etoxilatos de alquilfenol (APEOs) son tensioactivos non iónicos que se usan habitualmente como axentes espumantes ou emulsionantes. A biodegradación destes orixina alquilfenois (APs) [9,10], os cales, debido aos seus efectos estroxénicos, se consideran disruptores endócrinos. Certos APEOs, como o (mono-, di-, tri-) etoxilato de 4-nitrofenol, preséntase en formas comercializadas baixo o nome de *NP40 Alternativo*.

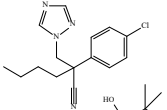
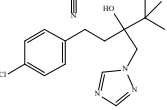
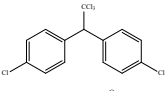
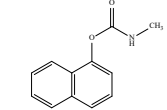
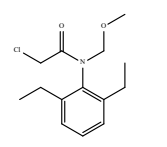
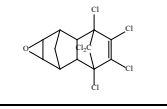
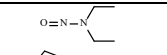
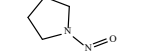
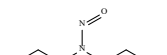
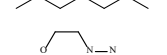
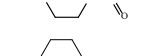
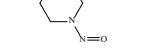
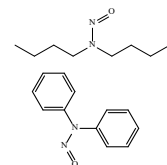
Finalmente, as tinturas capilares son uns produtos moi populares no mercado dos cosméticos. As tinturas oxidativas, como o seu propio nome indica, involucran un proceso oxidativo para xerar a cor desexada. Preséntanse como unha mestura binaria dun precursor ou base (normalmente para- e orto-fenilendiaminas) e un modificador (meta-fenilendiaminas ou hidroxifenóis) [11]. A variedade de cores e tonalidades é o resultado das diferentes combinacións entre ambos. Estas tinturas permanentes non se consideran na regulación vixente e a creación dunha lista positiva é un dos obxectivos da Unión Europea (UE) a curto e medio prazo [12].

A **Táboa 1.3** recolle a información destes outros compostos considerados, incluíndo os números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.


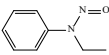
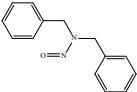

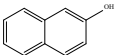
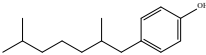
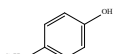
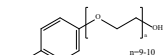
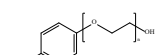
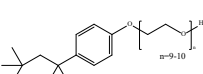
Táboa 1.3. Outros compostos considerados, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Outros compostos	Número CAS	MW	Estrutura química
Pesticidas			
Monocrotofós (MNC)	6923-22-4	223,2	
Clorpirifos-metilo (CPM)	5598-13-0	322,5	
Simazina (SIM)	122-34-9	201,7	
Propazina (PRZ)	139-40-2	229,7	
Clorprofam (CP)	101-21-3	213,7	
Kresoxim-metilo (KRM)	143390-89-0	313,3	
Iprodiona (IPR)	36734-19-7	330,2	

Táboa 1.3. (cont.) Outros compostos considerados, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Outros compostos	Número CAS	MW	Estrutura química
Pesticidas			
Miclobutanil (MYC)	88671-89-0	288,8	
Tebuconazol (TBC)	107534-96-3	307,8	
4,4-dicloro difenil tricloroetano (DDT)	50-29-3	354,5	
Carbarilo (CAR)	63-25-2	201,2	
Alacloro (ALA)	15972-60-8	269,8	
Dieldrin (DIE)	60-57-1	380,9	
Nitrosaminas			
N-nitrosodietilamina (NDEA)	55-18-5	102,1	
N-nitrosopirrolidina (NPYR)	930-55-2	100,1	
N-nitrosodipropilamina (NDPA)	621-64-7	130,2	
N-nitrosomorfolina (NMOR)	59-89-2	116,1	
N-nitrosopiperidina (NPPI)	100-75-4	114,1	
N-nitrosodibutilamina (NDBA)	924-16-3	158,2	
N-nitrosodifenilamina (NDPhA)	86-30-6	198,2	

Táboa 1.3. (cont.) Outros compostos considerados, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Outros compostos	Número CAS	MW	Estrutura química
Nitrosaminas			
N-nitroso-N-metilanilina (NMA)	614-00-6	136,2	
N-nitroso-N-etilanilina (NEA)	612-64-6	150,2	
N-nitrosodibencilamina (NDBZA)	5336-53-8	226,3	
Tintes oxidativos			
1,4-dihidroxibenceno	123-39-1	110,1	
2-naftol	135-19-3	144,2	
APs e APEOs			
Nonilfenol (NP)	25154-52-3	220,4	
Isómeros de 4-nonilfenol (4NP)	84852-15-3	220,4	
(mono-, di-, tri) Etoxilato de 4-octilfenol (OPEO)	26636-32-8	-	
NP40 alternativo	9016-45-9	-	
Tritón X-100 (TX-100)	9002-93-1	-	

1.3.4. Glicóis e derivados

Os glicóis poden considerarse aditivos multifuncionais, dado que ao seren humectantes e presentar unha forte capacidade de unión á auga, empréganse nos cosméticos para reducir o contido da mesma. Esta é

unha estratexia alternativa de conservación e a súa eficacia antimicrobiana aumenta coa lonxitude da cadea. Os glicóis son os principais precursores dos éteres de glicol.

Os éteres de glicol son compostos químicos que presentan as características de solubilidade tanto dos éteres como dos alcohois. Dado que son solubles en auga e en moitos disolventes orgánicos [13], aplícanse amplamente tanto en produtos orgánicos coma noutros de base acuosa. Clasifícanse en dúas series, *e* ou *p*, segundo sexan a base de etileno ou óxido de propileno, respectivamente. Son os derivados da serie *e* os que se atopan principalmente en produtos farmacéuticos e cosméticos [14]. Son empregados como disolventes eficaces e redutores da viscosidade, servindo como axentes de acoplamento favorecendo a miscibilidade das fases acuosa e orgánica.

Por outra banda, unha ampla evidencia científica demostra que os éteres de glicol da serie *e* de menor peso molecular e os seus acetatos correspondentes teñen efectos tóxicos na reprodución [15]. Mentres que algúns son clasificados como teratoxénicos [16], outros son absorbidos mediante a penetración dérmica e posteriormente transformados, sendo perigosos para a saúde humana [15,17].

A **Táboa 1.4** recompila os números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas dos glicóis e dos seus derivados considerados nesta tese. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

Táboa 1.4. Glicóis e compostos derivados, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Glicóis	Número CAS	MW	Estrutura química
Etilenglicol (ETG)	107-21-1	62,1	
Dietilenglicol (DEG)	111-46-6	106,1	
Tetrametilenglicol (TMG)	110-63-4	90,1	

Táboa 1.4. (cont.) Glicóis e compostos derivados, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Éteres de glicol	Número CAS	MW	Estrutura química
Éter monometílico de etilenglicol (EGME)	109-86-4	76,1	
Éter dimetílico de etilenglicol (EGDME)	110-71-4	90,1	
Éter monoetilico de etilenglicol (EGEE)	110-80-5	90,1	
Éter monobutílico de etilenglicol (EGBE)	111-76-2	118,2	
Éter monometílico de dietilenglicol (DEGME)	111-77-3	120,1	
Éter dimetílico de dietilenglicol (DEGDME)	111-96-6	134,2	
Éter monoetilico de dietilenglicol (DEGEE)	111-90-0	134,2	
Éter monobutílico de dietilenglicol (DEGBE)	112-34-5	162,2	
Éter monometílico de propilenglicol (PGME)	1589-47-5	90,1	
Éter dimetílico de trietilenglicol (TEGDME)	112-49-2	178,2	
Acetatos de éteres de glicol			
Acetato de EGME (EGMEA)	110-49-6	118,1	
Acetato de EGEE (EGEEA)	111-15-9	132,2	
Acetato de PGME (PGMEA)	108-65-6	132,2	
Acetato de éter monometílico de isopropilenglicol (iPGMEA)	70657-70-4	132,2	

1.3.5. Fragancias

As fragancias son o resultado dunha mestura de substancias químicas odoríferas con identidade propia que lle confiren






















características sensoriais identificables. Non obstante, acostúmase falar de fragancia referíndose a cada un dos compoñentes químicos que compoñen dito aroma. As fragancias son engadidas a miúdo aos cosméticos e PCPs para proporcionar un aroma agradable (un dos atributos que máis valoran os consumidores na súa elección) pero tamén para enmascarar os olores desagradables das materias primas [18]. Pódense clasificar en dous grupos:

- Fragancias alerxénicas (presuntos alérxenos, *suspected allergenic*): provocan irritacións da pel ou reaccións alérxicas, como sensibilidade cutánea, erupcións ou dermatite, entre outras. O Comité Científico de Seguridade dos Consumidores (SCCS) revelou que a frecuencia da alerxia de contacto debida a estas substancias na poboación europea sitúase en torno ao 1-3% [19,20]. Nesta tese consideráronse as 26 fragancias alerxénicas que a UE considera (listadas no Anexo III do Regulamento EC No 1223/2009 [1]). Defínense como volátiles e están formadas por compostos individuais de natureza química moi diversa, comprendendo alcohois, aldehidos, ésteres, terpenos, terpenoides...

- Almisces sintéticos (*musks*): os almisces naturais, moi apreciados polo seu aroma único, proceden de especies animais e vexetais protexidas, polo que actualmente non se utilizan. Por isto, os almisces sintéticos semellan unha boa alternativa, xa que proporcionan propiedades olfactivas similares ás dos almisces naturais e abaratan o custe do perfume. Non obstante, algunhas destas substancias sintéticas descríbense como xenobióticos bioacumulables e persistentes, resultando estar asociados a diferentes tipos de dermatite, efectos canceríxenos e disfunción endócrina. Clasifícanse segundo a súa estrutura química en almisces nitroxenados (*nitromusks*, derivados do di-, tri-nitrobenceno), policíclicos (*polymusks*, con moléculas de indano e tetralina na estrutura química básica), macrocíclicos (cetonas macrocíclicas de orixe animal ou lactonas de orixe vexetal) e acíclicos ou lineais [21,22].

A **Táboa 1.5** recolle as substancias alerxénicas e almiscres sintéticos estudados, cos seus números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

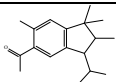
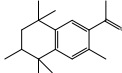
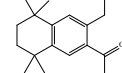
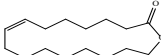
Táboa 1.5. Fragancias (fragancias alerxénicas e almiscres sintéticos), número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Fragancias alerxénicas	Número CAS	MW	Estrutura química
Pineno	80-56-8	136,2	
Limoneno	5989-27-5	136,2	
Alcohol bencílico	100-51-6	108,1	
Linalol	78-70-6	154,2	
2-octionato de metilo	111-12-6	154,2	
Citronelol	106-22-9	156,3	
Citral	5392-40-5	152,2	
Xeraniol	106-24-1	154,2	
Cinamaldehido	104-55-2	132,2	
Hidroxicitronelal	107-75-5	172,3	
Alcohol de anís	105-13-5	138,2	
Alcohol cinamílico	104-54-1	134,2	
Euxenol	97-53-0	164,2	
Metileuxenol	93-15-2	178,2	
Isoeuxenol	97-54-1	164,2	
Cumarina	91-64-5	146,1	
α-isometilionona	127-51-5	206,3	
Lilial®	80-54-6	204,3	
Amilcinamal	122-40-7	202,3	
Lyral®	31906-04-4	210,3	
Alcohol amilcinamílico	101-85-9	204,3	

Táboa 1.5. (cont.) Fragancias (fragancias alerxénicas e almiscres sintéticos), número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Fragancias alerxénicas	Número CAS	MW	Estrutura química
Farnesol	4602-84-0	222,4	
Hexilcinamal	101-86-0	216,3	
Benzoato de bencilo	120-51-4	212,2	
Salicilato de bencilo	118-58-1	228,2	
Cinamato de bencilo	103-41-3	238,3	
Almiscres sintéticos	Número CAS	MW	Estrutura química
Almiscres nitroxenados			
Almiscre de xileno	81-15-2	297,3	
Almiscre cetona	81-14-1	294,3	
Almiscre ambreta	83-66-9	268,3	
Almiscre de mosqueno	116-66-5	278,3	
Almiscre tibetano	145-39-1	266,3	
Almiscres policíclicos			
Galaxolida	1222-05-5	258,4	
Celestolida	13171-00-1	244,4	
Fantolida	15323-35-0	244,4	
Cashmeran	33704-61-9	206,3	

Táboa 1.5. (cont.) Fragancias (fragancias alerxénicas e almiscres sintéticos), número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Almiscres sintéticos	Número CAS	MW	Estrutura química
Almiscres policíclicos			
Traseolida	68140-48-7	258,4	
Tonalida	1506-02-1	258,4	
Versalida	88-29-9	258,4	
Almiscres macrocíclicos			
Ambretolida	7779-50-2	252,4	

1.3.6. Conservantes


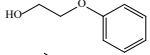

Os conservantes son compostos químicos que se engaden co fin de manter a integridade e garantir a estabilidade das formulacións cosméticas no tempo. A maioría dos produtos poden ser degradados facilmente por microorganismos e a contaminación microbiana representa un risco importante para a saúde dos consumidores [23]. A presenza de auga (base acuosa), a temperatura de almacenamento e o pH son algúns dos factores que inflúen no crecemento microbiano. Así, a adición de conservantes ten como obxectivo principal inhibir este deterioro debido ao crecemento microbiano, polo que cumpren unha función crucial antimicrobiana. É importante ter en conta que un produto cosmético tamén pode ser degradado debido a outros axentes externos como o aire ou a luz solar. Adicionalmente, outras substancias que non se consideran estritamente conservantes no marco lexislativo, como os antioxidantes (función antioxidante) ou os absorbentes de luz (función fotoprotectora), tamén poden agregarse para protexer os cosméticos de procesos oxidativos indesexables e da degradación fotoquímica. Estes inclúense na maioría dos métodos para determinar conservantes. A pesar dos innegables beneficios que aportan os

conservantes, dado que as principais vías de exposición son por inhalación ou absorción a través da pel, tamén se describiron efectos negativos na saúde xa que unha exposición excesiva pode provocar alerxias de contacto ou dermatite cutánea [24,25].

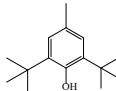
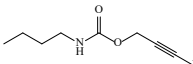
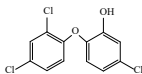
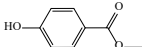
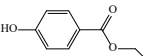
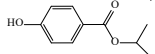
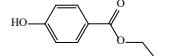
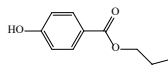
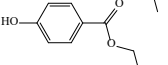
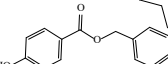
Os conservantes antimicrobianos poden clasificarse segundo o grupo funcional predominante na súa estrutura molecular en: alcohois e derivados, haloxenados, ácidos orgánicos, ésteres e sales, entre outros. Nestes últimos, cabe destacar os parabenos (ésteres do ácido 4-hidroxibenzoico) cuxo uso caeu drasticamente debido ao rexeitamento social por mor dos seus efectos nocivos a longo prazo e só catro deles están permitidos con restricións. Isto levou aos fabricantes a retiralos das fórmulas cosméticas e, de feito, é habitual ver o termo “sen parabenos” nas etiquetas dos produtos para atraer aos consumidores [24]. Ademais, outros compostos antioxidantes engádense como sistemas de conservación, sendo os máis coñecidos o butilhidroxitolueno (BHT) e o butilhidroxianisol (BHA), aínda que tamén son reportados en estudos como disruptores endócrinos [26].

A **Táboa 1.6** amosa os conservantes considerados nos traballos presentados, os seus números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

Táboa 1.6. Conservantes, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Conservantes	Número CAS	MW	Estrutura química
Bronidox	30007-47-7	212,0	
Fenoxietanol (PhEtOH)	122-99-6	138,2	
Butilhidroxianisol (BHA)	121-00-6	180,2	

Táboa 1.6. (cont.) Conservantes, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Conservantes	Número CAS	MW	Estrutura química
Butilhidroxitolueno (BHT)	128-37-0	220,4	
Iodopropinilbutilcarbamato (IPCB)	55406-53-6	281,1	
Triclosán	3380-34-5	289,5	
Metilparabeno (MeP)	99-76-3	152,1	
Etilparabeno (EtP)	120-47-8	166,2	
Isopropilparabeno (iPrP)	4191-73-5	180,2	
Propilparabeno (PrP)	94-13-3	180,2	
Isobutilparabeno (iBuP)	4247-02-3	194,2	
Butilparabeno (BuP)	94-26-8	194,2	
Bencilparabeno (BzP)	94-18-8	228,2	

1.4. ASPECTOS REGULATORIOS

A Axencia Española de Medicamentos e Produtos Sanitarios (AEMPS) é a autoridade competente no noso país para o seguimento da seguridade dos cosméticos e PCPs. En relación ás autoridades competentes europeas, a Comisión Europea está asesorada cientificamente polo SCCS, o cal emite informes sobre os riscos para a saúde e seguridade dos produtos cosméticos e os seus ingredientes.

Calquera produto cosmético no mercado ten que cumprir unha base legal fundamental: ten que ser seguro baixo condicións normais de uso.

Todos os cosméticos comercializados en Europa deben cumprir co Regulamento CE No 1223/2009 [1], que, a través dos diferentes anexos, proporciona listas de substancias en constante revisión e actualización. O Anexo II lista compostos químicos prohibidos nos produtos cosméticos. Pola súa parte, o Anexo III inclúe listas de substancias permitidas para o seu uso como ingredientes cosméticos, aínda que a maioría delas presentan restricións específicas en canto á concentración máxima permitida en función do tipo de produto final, o seu uso e a parte do corpo na que se aplica. Ademais, nos Anexos IV, V e VI recóllense outras listas positivas para familias concretas como os colorantes, conservantes e filtros UV, respectivamente, para ser permitidos como ingredientes coas funcións correspondentes nos cosméticos.

Normalmente, a presenza de substancias prohibidas non se debe á adición intencionada do fabricante, senón que poden proceder de impurezas dos ingredientes permitidos, ou ata poden xerarse da reacción de diferentes compostos orgánicos presentes na formulación en condicións particulares. Unha decisión de aplicación da CE [27] indica claramente que a presenza de restos de substancias e impurezas prohibidas debe permanecer nun nivel tan baixo como sexa razoablemente alcanzable (ALARA) seguindo as Boas Prácticas de Fabricación (GMP). Cando tal presenza sexa tecnicamente inevitable, os fabricantes de cosméticos están obrigados á súa xustificación. Tamén se recomenda que a industria cosmética siga mellorando as súas prácticas para eliminar estas substancias no produto cosmético acabado.

Nese marco lexislativo [1] tamén se inclúen normas para a correcta etiquetaxe e outros puntos relacionados coa seguridade. A presenza de substancias perfumantes e aromáticas como fragancias (alérxenos e almíscres sintéticos) indicárase cos termos "*parfum*" ou "*fragrance*". É obrigatoria a mención das 26 substancias alérxicas na lista de ingredientes da etiqueta se os niveis de concentración no produto final superan o 0,01% en peso ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) para produtos que se aclaran (*rinse-off*) e o 0,001% en peso ($10 \mu\text{g g}^{-1}$) para aqueles outros de permanencia (*leave-on*).

Finalmente, en todos os traballos recollidos nesta tese se detallan as regulacións e restricións específicas actuais para as substancias obxectivo incluídas.

1.5. ANTECEDENTES ANALÍTICOS

O enorme número de substancias a controlar, a súa ampla gama de estruturas químicas así como a variedade de matrices complexas nas que poden estar contidas, supoñen un enorme reto dende o punto de vista da metodoloxía analítica que é preciso desenvolver.

No marco da UE existen varios métodos analíticos oficiais propostos para determinar certos ingredientes nos produtos cosméticos. A pesar disto, unha revisión xeral de metodoloxía publicada [28] pon de manifesto que os métodos son escasos para o control necesario da totalidade de substancias lexisladas. Isto débese a que a maioría dos métodos soamente cobren un número relativamente pequeno de ingredientes. Resulta evidente que as metodoloxías analíticas para o control da seguridade dos produtos cosméticos e de coidado persoal deben ser robustas e fiables, ademais do cumprimento de estritos criterios de calidade. Deste xeito, teñen que permitir a detección e cuantificación de compostos restrinxidos e aqueles prohibidos, chegando a niveis traza, co fin de cumprir os requisitos legais.

Nas últimas décadas, as novas aportacións foron orientadas tanto á actualización de métodos obsoletos así como á mellora dos oficiais existentes. O desenvolvemento de enfoques multianalíticos é a estratexia idónea para abordar a análise dos compoñentes dos cosméticos. Nos novos avances, a inclusión de detectores selectivos na técnica cromatográfica así como a axeitada preparación da mostra son factores esenciais. Ademais, búscase a compatibilidade cos principios da *Química Analítica Verde* e que sexan potencialmente miniaturizables e transferibles a protocolos de análise de rutina. Ao longo do apartado 5 desta mesma sección comentaranse as diferentes

metodoloxías analíticas aplicadas con anterioridade a cada unha das familias estudadas.

2. Cosméticos *extremos* e produtos *borderline*

2.1. INTRODUCCIÓN

Os produtos de decoración corporal (BDP, a sigla en inglés de *body-decorating products*) e os cosméticos faciais son un dos pilares de consumo diario e amosan moi diversa composición química. A innovación impulsa á industria cosmética para ofrecer produtos orixinais e novidosos que os fagan máis atractivos aos consumidores. Neste contexto, xorden cosméticos que presentan unhas características magnificadas (os que se denominaran *cosméticos extremos* ao longo desta tese) e tamén outros que poden ser catalogados como cosméticos pero cuxo límite non está claro respecto a outro tipo de produtos comerciais (denominados produtos fronteirizos ou *borderline*).

A caracterización química destas formulacións, incluíndo ingredientes principais, impurezas e aditivos indesexables, preséntase como un desafío. A aplicación directa destes artigos de beleza e decoración na pel ou no cabelo humano, implica un alto grao de exposición a unha ampla variedade de compostos químicos. A avaliación da seguridade destes BDP é imprescindible, polo que é necesario desenvolver ferramentas analíticas que permitan a súa análise así como abordalos dende a perspectiva dunha normativa axeitada.

2.2. COSMÉTICOS EXTREMOS

Unha das últimas tendencias da industria cosmética está relacionada con produtos que presentan características particulares, para magnificar as súas funcións e/ou a súa durabilidade. Estas

características poden considerarse extremas (“*cosméticos extremos*”): maquillaxe de longa duración, máscaras de pestanas resistentes á auga, barras de beizos de elevada permanencia, alongadores e voluminizadores de pestanas, lapis con efecto tatuaxe, voluminizadores de beizos, entre outros.

Moitos destes cosméticos presentan aplicadores, cuxa función é facilitar a transferencia do produto cosmético dende o recipiente á área de aplicación de destino dun xeito relativamente controlado. Segundo os criterios do *Manual sobre o ámbito de aplicación do Regulamento de produtos cosméticos* [29], un aplicador é un artigo, non forma parte do produto senón que pode verse como parte do envase primario (material en contacto directo co produto cosmético). Como se mencionou no apartado anterior, relaciónase a presenza de certos compoñentes das formulacións con esta posible transferencia [5]. Polo tanto, débese demostrar que non hai migración de substancias potencialmente nocivas e/ou incluso prohibidas dende o aplicador ao produto cosmético.

2.3. PRODUTOS *BORDERLINE*

Existe outra corrente que inclúe unha enorme diversidade de produtos comerciais, denominados produtos fronteirizos ou *borderline*, os cales non son clasificados estritamente como cosméticos senón que poden incluírse en categorías diferentes como artigos médicos e farmacéuticos, biocidas ou xoguetes. Adicionalmente, o produto pode ser multifuncional, por exemplo, un protector solar (función cosmética) cun repelente de insectos engadido (función biocida).

As tatuaxes e tinturas temporais constitúen unha alternativa común ás permanentes e poden englobarse no grupo de produtos *borderline*. Foron moi utilizadas dende a antigüidade, pero nos últimos anos foron gañando popularidade entre persoas de diferentes idades, procedencias

e culturas. Son un grupo de BDP consistente en sistemas de arte corporal que se aplican sobre a pel ou cabelo e están deseñados para durar pouco tempo (1-2 semanas). Se se deposita un pigmento, denomínanse tatuaxes ou tinturas temporais, pero se se coloca unha imaxe transferible coñécense como tatuaxes adhesivas ou calcomanías. Recentemente, as tendencias apuntan cara produtos a base de pigmentos naturais [30], como é o caso da coñecida e tradicional henna e tamén o da máis novidosa jagua. Dende o punto de vista da composición, as tatuaxes e tinturas temporais de orixe vexetal son produtos totalmente diferentes, como se explicará a continuación.

2.3.1. Tatuaxes e tinturas de henna

A henna é un exemplo dun cosmético tradicional utilizado en diferentes partes do mundo dende moito tempo atrás. As tatuaxes e tinturas temporais a base de henna son as máis coñecidas. A henna é un pigmento natural que se obtén a partir da planta *Lawsonia inermis* (da familia *Lythraceae*) e que presenta como ingrediente activo a lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona, HNQ), responsable da típica coloración marrón-avermellada [31]. A lawsona interactúa directamente cos grupos funcionais amina ou xofre da queratina debido á súa forte afinidade. A henna é orixinaria de rexións tropicais e subtropicais secas do norte de África e do sur de Asia e cultívase comercialmente en Marrocos, Sudán, India, Paquistán, Sri Lanka e outros países. Tras secar e triturar as follas e talos desta planta tropical, xérase un po de cor verde parda. Despois de mesturalo con auga ou aceites esenciais, obtense unha pasta que se utiliza tradicionalmente como tinta para decorar uñas, mans e pés. Comercialízanse baixo diferentes formulacións, abarcando coloracións que van dende as típicas (vermella, marrón ou negra) a outras cores máis rechamantes (azul, rosa, verde, entre outras moitas).

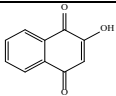
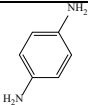
As tatuaxes de henna negra acostuman estar adulteradas con certos aditivos, que lle confiren propiedades desexadas (cor máis escura, maior rapidez na fixación, maior durabilidade, brillo,...). Un dos

aditivos habituais é a *para*-fenilendiamina (PPD), un recoñecido alérxeno [32-34], cuxo uso directo sobre a pel está prohibido e a súa adición pode causar graves efectos como cicatrices e sensibilización permanente. Ante o aumento da demanda, a AEMPS alertou na súa campaña do ano 2021 sobre os riscos asociados ao uso das tatuaxes temporais de henna negra [35].

Durante séculos, moitas civilizacións tamén empregaron a henna como axente natural de tintura capilar. Os produtos para coloración do cabelo son cosméticos moi populares no mercado actual para coidar a imaxe persoal. Entre as diferentes formulacións, a henna é de orixe natural e clasifícase na categoría de tinturas temporais [36], as cales non envolven reaccións químicas no proceso de formación da cor e elimínanse facilmente cun par de lavados. Na actualidade, as tinturas temporais parecen ser un enfoque máis atractivo debido aos problemas cutáneos derivados do uso de tinturas capilares sintéticas, sobre todo aquelas permanentes.

A **Táboa 2.1** amosa o ingrediente activo da henna e o alérxeno PPD, cos números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

Táboa 2.1. Ingredientes da henna, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Ingrediente activo	Número CAS	MW	Estrutura química
Lawsona (HNQ)	83-72-7	174,2	
Alérxeno			
<i>para</i> -fenilendiamina (PPD)	106-50-3	108,1	

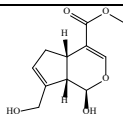
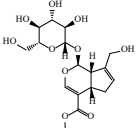
2.3.2. Tatuaxes de jagua

Máis recentemente, achouse no mercado a incorporación de produtos temporais para tatuaxe a base de jagua. Aínda que se trata dunha moda actual nos países avanzados, xa foi empregada de xeito tradicional por poboacións indíxenas para a decoración corporal.

Nestas tatuaxes, o pigmento natural obtense a partir dun froito dunha planta tropical amazónica coñecida como *Genipa americana* L., da familia das Rubiáceas. A tinguidura procede do zume do froito e vólvese azul escuro-negro cando se aplica directamente sobre a pel. Pola súa coloración, podería substituír á PPD nas tatuaxes de henna negra para escurecelas. Os principais ingredientes da jagua son o xenipósido (un iridoide glicosilado) e o seu derivado bioactivo, a xenipina, a cal pode obterse por hidrólise do xenipósido e tamén está presente noutro tipo de plantas como a *Gardenia jasminoides*. A xenipina é incolora pero ao poñerse en contacto coa pel, reacciona inmediatamente coas proteínas para xerar a cor escura do pigmento. Non obstante, como a epiderme se rexenera constantemente, desaparece da pel aos poucos días.

A **Táboa 2.2** recolle os ingredientes activos da jagua, cos números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

Táboa 2.2. Ingredientes da jagua, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Ingredientes activos	Número CAS	MW	Estrutura química
Xenipina	6902-77-8	226,2	
Xenipósido	24512-63-8	388,4	

Alguns estudos suxeriron que a jagua se pode converter nun novo alérxeno de contacto nas tatuaxes temporais [37,38]. Nos últimos anos, describiuse un caso de dermatite alérxica de contacto provocada por este tipo de tatuaxes comercializadas a través de Internet, onde se identificaba a xenipina como o composto causante da reacción [39].

É importante resaltar que existen factores que poden afectar en gran medida á composición química final destes produtos naturais. Entre eles atópanse: factores naturais e antropoxénicos como o cultivo en zonas contaminadas [40,41], procesamento posterior ou degradación dos compoñentes [42]. Así mesmo, os preparados de henna e jagua poden estar enriquecidos con diversas herbas, ou materiais químicos naturais ou sintéticos como colorantes ou sales metálicas, para dotalos de certas características adicionais. Sospéitase que o material engadido pode incluír varios produtos minerais que conteñen metais pesados [43], debido a que ou ben estaban presentes nos ingredientes de partida ou foran introducidos involuntariamente durante os diferentes pasos de preparación. Os metais pesados encóntranse de maneira xeneralizada entre os produtos cosméticos de cor [44,45]. Deste xeito, aínda que o mecanismo de interacción coa pel está relacionado cos ingredientes activos que proporcionan as coloracións típicas, é certo que outros compostos, como certos metais, poden contribuír ou ter unha acción sinérxica nesta coloración.

2.4. ASPECTOS REGULATORIOS

A situación normativa actual non está clara, non só para os BPD no seu conxunto, senón incluso para cada categoría individual. Estes formatos innovadores de cosméticos *extremos* e os produtos fronteirizos deben cumprir tamén coa normativa de cosméticos aplicable vixente no marco da UE, Regulamento No 1223/2009 [1], co fin de garantir a súa seguridade.

O marco normativo en materia dos produtos *borderline* está lonxe de ser claro. Teñen que seguir o *Manual de Produtos Borderline* [29], elaborado por un subgrupo de traballo enfocado a estes produtos en concreto. Dita guía avalía cada produto e as súas características de acordo ás novidades comerciais e ás evidencias científicas. A pesar de non prescribir cal é o marco lexislativo que se aplica, suxírese que un produto concreto pode catalogarse ou non no ámbito de aplicación do Regulamento de cosméticos e propónse outras directivas, como a de medicamentos [46,47], téxtiles [48], biocidas [49] ou xoguete [50], poden aplicarse conxuntamente. Polo que, as autoridades europeas só recomendan a(s) normativa(s) que deben cumprir e as opinións expresadas non son xuridicamente vinculantes.

Se ben é certo que todos os tipos de tatuaxes están comprendidas baixo os produtos fronteirizos, as tatuaxes temporais teñen composicións químicas moi diversas e unha lexislación confusa. Neste caso concreto, deberían seguir tamén a Directiva sobre xoguete [50] e estar correctamente etiquetados segundo a normativa de cosméticos vixente [1]. Sen embargo, atópanse lonxe de cumprir con estes requisitos, como se demostrará no Capítulo 3 da presente tese.

Aínda non se publicaron normas sobre os pigmentos con base natural para as tatuaxes temporais. Ao permaneceren menos tempo en contacto coa pel do usuario, semella obvio que presentan menos probabilidades de causar danos graves. Non obstante, como se comentou anteriormente, xa foron reportados casos de alerxia para os diferentes tipos de tatuaxes temporais. O feito de que a maioría dos produtos comerciais de orixe vexetal non están etiquetados ou o estean de maneira incorrecta, dificulta coñecer en detalle a súa composición química. Adicionalmente, como se pon de manifesto nesta tese, unha gran porcentaxe de mostras avaliadas pódense considerar fraudulentas, polo que é importante garantir a súa orixe para evitar potenciais fraudes ocultos.

Pola súa banda, o SCCS si avaliou a seguridade da henna e da lawsona, o seu principal ingrediente activo, en produtos para tinguir o cabelo [51]. As conclusións indican que a información dispoñible é suficiente para avaliar o uso seguro da henna con este fin en determinadas formulacións. Aínda así, outros tipos de extractos de henna que poden ter composicións diferentes non están contemplados nesta avaliación.

Ante a falta de control nos produtos comercializados, e como se mencionou antes, existe a posibilidade de que estes conteñan niveis significativos de metais pesados. Neste sentido, a lexislación de cosméticos europea [1] lista os metais permitidos ou prohibidos como ingredientes nos seus anexos, así como os niveis de metais tecnicamente inevitables como impurezas que proveñen principalmente de colorantes. En canto ás mostras destinadas unicamente a tinguiduras para o cabelo, a directriz da seguridade establecida polo SCCS [51] estipula niveis de impurezas para certos metais (como Pb, Cr e Ni) neste tipo de mostras.

Finalmente, como en todos os bens de consumo, as substancias químicas presentes tanto en cosméticos *extremos* como produtos *borderline* deben axustarse ás restricións establecidas no Regulamento REACH (Rexistro, Avaliación, Autorización e Restrición de substancias químicas) (CE 1907/2006) [52].

A seguridade destes produtos e o seu potencial para as reaccións cutáneas é moi cuestionable. Esta situación débese á súa recente aparición no mercado, á falta de regulación e á escasa investigación científica. Unha vez revisada a situación lexislativa, cabe mencionar a necesidade de crear directrices específicas na fabricación e regulacións concretas para garantir a seguridade dos consumidores, aínda máis dado que os nenos poden estar implicados.

2.5. ANTECEDENTES ANALÍTICOS

Dada a falta de regulación específica e a variedade de matrices cosméticas que se encadran como *extremas* e *borderline*, é imprescindible o desenvolvemento de metodoloxías analíticas que permitan achegarse á súa caracterización.

En relación ás formulacións *extremas*, van aparecendo certos estudos que as consideran, aínda que non todos incorporan métodos de análise propiamente ditos. Repórtanse traballos que tratan sobre dermatite alérxica de contacto causada polos acrilatos contidos en esmaltes de uñas de longa duración [53,54] ou que avalían o uso de antioxidantes diferentes (tocoferol, ácido ascórbico e derivados, entre outros) en cosméticos antienvellecemento [55]. Os cosméticos de cor de longa duración son unha das categorías de maquillaxe máis buscada polos consumidores [56] e procúranse novos materiais, como pigmentos [56], produtos de silicona [57] ou mesmo nanomateriais [58], para acadar efectos máis duradeiros. Dado que os ingredientes das formulacións cosméticas *extremas* son semellantes aos dos cosméticos xerais, nesta tese aplicáronse técnicas de tratamento de mostra similares para a análise duns ou outros.

Respecto aos produtos *borderline* a base de henna, os estudos que analizan os seus compoñentes así como aditivos e impurezas, son realmente escasos. Recóllese unha revisión de metodoloxía analítica aplicada a este tipo de mostras no *Review* do **Anexo II**. A maioría dos estudos empregan cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detectores de rede de diodos (DAD) [59,60] para determinar PPD e HNQ en produtos comerciais e outras preparacións de henna. En canto á preparación da mostra, o procedemento consistiu nunha dilución seguida de sonicación e filtración previa á análise [61]. E xa nestes primeiros traballos se demostrou que certos produtos eran vendidos á poboación como produtos de henna cando non o eran, xa que non contiñan o seu ingrediente activo. Este feito tamén se pon de manifesto nos traballos de henna incluídos nesta tese. Adicionalmente, a

bibliografía tamén recolle outros estudos puntuais que empregan cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [62] para determinar PPD en cosméticos. Neste caso, a preparación de mostra implicou unha secuencia de mestura en vórtex, axitación por ultrasóns (US), centrifugación e filtración antes da inxección no GC-MS. Tamén foi proposto un método alternativo colorimétrico [63] baseado en medidas espectrofotométricas para detectar a presenza de PPD. Desta maneira, ata este punto, as metodoloxías céntranse máis en aditivos como a PPD que na determinación do ingrediente principal da henna.

Ademais, outros estudos foron dirixidos para a determinación de certos metais pesados en mostras de henna. A pesar de que adoitan estar presentes en pequenas cantidades, os seus efectos acumulativos poden supoñer un importante risco para a saúde pública. En traballos anteriores, diferentes técnicas se utilizaron con este fin en mostras cosméticas de henna, como amosa o último traballo (3.4) do **Capítulo 3**. Con todo, a espectrometría de masas con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) resulta unha das máis recomendadas para analizar o contido metálico en mostras cosméticas [64] e algúns estudos examinaron mostras de henna [65-67]. É importante mencionar que a maioría destes traballos céntranse exclusivamente na determinación dos metais, sen intención de acadar unha caracterización dos produtos cosméticos. Pola súa parte, na bibliografía atópanse publicacións limitadas que empregan enfoques espectrométricos en mostras de henna, soamente estudos puntuais e incompletos, por exemplo, utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM) con análise de raios X por dispersión de enerxía (EDS) ou difracción de raios X en po (XRPD) [68].

Finalmente, para a jagua case non existen antecedentes analíticos. Ata o de agora, soamente un traballo reportara a presenza dos seus ingredientes principais, xenipina e xenipósido, mediante cromatografía líquida con detección ultravioleta (LC-UV) [39]. Aínda que se informou dalgúns outros métodos para a cuantificación de xenipósido

en traballos farmacocinéticos mediante HPLC, non se realizaron estudos sobre determinacións analíticas dos dous compoñentes en mostras cosméticas. En canto a aplicación de técnicas espectrométricas, non se atopan en ningún traballo publicado, polo que nesta tese é a primeira vez que se aplican estas metodoloxías ás mostras de jagua.

Desta maneira, é importante desenvolver enfoques metodolóxicos que permitan caracterizar estas mostras de tatuaxes e tinturas temporais de henna e jagua moi pouco exploradas, e así coñecer información sobre a súa composición química. Posibles aditivos, como a PPD e outros contaminantes metálicos tamén deben ser considerados para controlar a calidade e seguridade destes produtos, así como descubrir posibles fraudes naquelas formulacións vendidas como henna ou jagua natural.

3. Ingredientes naturais

3.1. INTRODUCCIÓN

Nos últimos anos incrementáronse as demandas sociais cara a tendencias máis sustentables [69], polo que moitos fabricantes están unindo ciencia e natureza mediante o emprego de ingredientes naturais e cada vez máis marcas ofertan os seus produtos libres de certas substancias sintéticas [70]. Creáronse certificados para distinguir estes produtos naturais fronte aos convencionais, tanto a nivel internacional coma nacional. Non obstante, actualmente non existe unha definición oficial de *cosmético natural* para aqueles nos que na súa formulación final predominan as substancias de orixe vexetal. É necesario salientarmos o feito de que, aínda que moitos produtos cosméticos empregan os reclamos “natural”, “orgánico” ou “ecolóxico” nas súas etiquetas, isto non implica a ausencia total de compostos sintéticos. Así mesmo, moitos produtos etiquetados como “libres de fragancias” poden contelas, xa sexa pola adición intencionada ou precisamente polo uso de substancias naturais [71]. Polo tanto, de cara ao consumidor, a presenza de ingredientes naturais considérase hoxe en día unha calidade positiva, pero “natural” non significa seguro [72]. Non cómpre esquecer que todas as formulacións cosméticas son mesturas complexas de múltiples compoñentes con diferentes orixes, natureza química e funcións.

Por outra banda, certas empresas están procurando fórmulas alternativas de autoconservación (*self-preservation*), as cales reduzan a necesidade de conservantes de síntese, tan cuestionados na actualidade. Algunhas destas estratexias involucran o uso de aditivos multifuncionais que, ademais de cumprir a función definida para a que

foron engadidos, contan simultaneamente con máis efectos beneficiosos para a formulación [73]. Exemplos destes aditivos son os aceites esenciais ou os extractos naturais, que se atopan en produtos cosméticos con frecuencia crecente. De igual maneira, as propiedades bioactivas de extractos naturais (englobando todo tipo de plantas e as súas partes) é outro campo que suscitou interese dende fai xa algúns anos. Xa eran utilizados nas formulacións tradicionais, pero foi medrando a evidencia científica que confirma a súa potencialidade como ingredientes multifuncionais en cosméticos [74].

3.2. TIPOS

Nos últimos anos, a presenza de ingredientes derivados da botánica como extractos naturais ou aceites esenciais en formulacións cosméticas está en aumento.

3.2.1. Aceites esenciais (AEs)

Os aceites esenciais (AEs) son mesturas complexas de compostos aromáticos volátiles sintetizados nas plantas como metabolitos secundarios. Preséntanse como líquidos hidrofóbicos con olores característicos e diferente coloración. Obtéñense principalmente por hidrodestilación, aínda que tamén se empregan outros mecanismos como extraccións ou maceracións. Segundo a especie, o momento de colleita, a orixe xeográfica e a parte da planta empregada para a extracción, a composición dos AEs varía substancialmente.

A pesar de non existir unha definición para AE na lexislación de cosméticos, a Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*, ISO) adoptou unha definición de AE na súa norma sobre materias primas naturais aromáticas [75]. Así, define AE como “Produto oloroso, xeralmente de

composición complexa, obtido a partir dunha materia prima vexetal definida botanicamente mediante destilación por vapor, destilación en seco ou un proceso mecánico adecuado sen quecemento”. E ademais, engade “Os aceites esenciais adoitan separarse da fase acuosa por un proceso físico que non afecta significativamente á súa composición”.

Dada as súas características odoríferas, foron empregados en perfumes e outros produtos cosméticos ou bens de consumo en xeral, para dotalos de olores agradables e atractivos. A AEMPS recolle información sobre os AEs en cosméticos nunha guía [76]. Os AEs posúen numerosas accións farmacolóxicas e hoxe en día, como se mencionou previamente, tamén se empregan como sistemas de conservación.

3.2.2. Extractos naturais (ENs)

Os extractos naturais (ENs) son mesturas complexas de compostos de distintas clases químicas con propiedades bioactivas. Estes conteñen metabolitos secundarios, derivan de toda a planta ou das distintas partes e extráense empregando disolventes (como auga, etanol, metanol,...), que se eliminan frecuentemente en etapas posteriores. Segundo o disolvente e as condicións experimentais empregadas, o rendemento e composición da extracción varía. O concepto de extracto natural é moi amplo.

Os consumidores recoñecen un alto valor engadido naquelas formulacións cosméticas que incorporan extractos naturais. Ademais, nos últimos anos, cada vez é máis frecuente a aproximación á economía circular. Neste sentido, xorden alternativas de extracción de principios activos como forma de reaproveitamento e valorización de residuos das industrias agroalimentaria ou forestal. Este concepto innovador involucra darlle un uso alternativo tanto a coprodutos como subprodutos xerados en explotacións comerciais, así como a plantas

previamente cultivadas con outros fins (por exemplo, para especias e infusións) ou incluso outras silvestres.

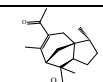
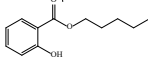
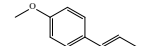
3.3. SUBSTANCIAS DE ESPECIAL INTERESE

3.3.1. Outras fragancias alerxénicas



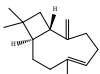


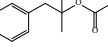

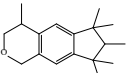
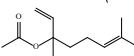


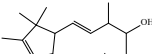



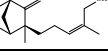
A pesar das 26 fragancias alerxénicas reguladas e incluídas na Táboa 1.5, incrementáronse as evidencias de alerxias ocasionadas por compoñentes de fragancias distintos aos desa lista. Isto impulsou ao SCCS a recomendar a ampliación da mesma, acadando un total de 82 substancias recoñecidas actualmente como “alérxenos de contacto nos seres humanos” [19]. Entre estes alérxenos que completan a lista, atópanse 28 substancias químicas individuais de natureza moi diversa, pero tamén 28 extractos naturais e aceites esenciais. Este feito é moi relevante, dado que os denominados cosméticos naturais que incorporen estes extractos e aceites son potenciais causantes de alerxias e deberán ser indicados na etiqueta.

A **Táboa 3.1** amosa as 28 restantes substancias químicas individuais consideradas como alérxenos de contacto en humanos polo SCCS, cos seus números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

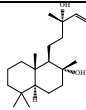
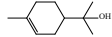

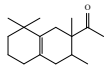
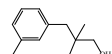
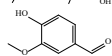
Táboa 3.1. Restantes substancias alerxénicas, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Alérxenos de contacto	Número CAS	MW	Estrutura química
Acetil cedreno	32388-55-9	246,4	
Salicilato de amilo	2050-08-0	208,3	
Trans-anetol	4180-23-8	148,2	

Táboa 3.1. (cont.) Restantes substancias alerxénicas, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Alérxenos de contacto	Número CAS	MW	Estrutura química
Benzaldehido	100-52-7	106,1	
Alcanfor	76-22-2	152,2	
B-cariofileno	87-44-5	204,4	
Carvona	99-49-0	150,2	
Damascenona (isómeros)	23696-85-7	190,3	
Acetato de dimetilbencilcarbanilo (DMBCA)	151-05-3	192,3	
Hexadecanolactona	109-29-5	254,4	
Hexametilindanopirano (Galaxolida)	1222-05-5	258,4	
Acetato de linalilo	115-95-7	196,3	
Mentol	2216-51-5	156,3	
Salicilato de metilo	119-36-8	152,2	
Ebanol	67801-20-1	208,3	
Propilidenoftalida	17369-59-4	174,2	
Salicilaldehido	90-02-8	122,1	
α-santalol	115-71-9	220,4	
B-santalol	77-42-9	220,4	

Táboa 3.1. (cont.) Restantes substancias alerxénicas, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Alérxenos de contacto	Número CAS	MW	Estrutura química
Esclareol	515-03-7	308,5	
Terpineol (isómeros)	8000-41-7	154,3	
Terpinoleno	586-62-9	136,2	
Tetrametil acetilhidronaftalenos	54464-57-2 54464-59-4	234,4	
Maxantol	103694-68-4	178,3	
Vanilina	121-33-5	152,2	

Pola súa parte, a **Táboa 3.2** recolle os 28 extractos naturais catalogados como alérxenos de contacto en humanos polo SCCS, cos seus números CAS.

Táboa 3.2. Extractos naturais considerados como alérxenos de contacto e número CAS.

Extractos naturais	Número CAS
<i>Cananga odorata</i> , Ylang Ylang	83863-30-3; 8006-81-3
<i>Cedrus atlantica</i> (codia)	92201-55-3; 8000-27-9
<i>Cinnamomum cassia</i> (folla), <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (codia)	8007-80-5; 84649-98-9
<i>Citrus aurantium amara</i> (flor/casca)	8016-38-4; 72968-50-4
<i>Citrus bergamia</i> (casca exprimida)	89957-91-5
<i>Citrus limonum</i> (casca exprimida)	84929-31-7
<i>Citrus sinensis/aurantium dulcis</i> (casca exprimida)	97766-30-8; 8028-48-6
<i>Cymbopogon citratus/schoenanthus</i>	89998-14-1; 8007-02-1; 89998-16-3

Táboa 3.2. (cont.) Extractos naturais considerados como alérxenos de contacto e número CAS.

Extractos naturais	Número CAS
<i>Eucalyptus spp.</i> (folla)	92502-70-0; 8000-48-4
<i>Eugenia caryophyllus</i> (folla, flor)	8000-34-8
<i>Evernia furfuracea</i> (extracto)	90028-67-4
<i>Evernia prunastri</i> (extracto)	90028-68-5
<i>Jasminum grandiflorum/officinale</i>	84776-64-7; 90045-94-6; 8022-96-6
<i>Juniperus virginiana</i>	8000-27-9; 85085-41-2
<i>Laurus nobilis</i>	8002-41-3; 8007-48-5; 84603-73-6
<i>Lavandula hybrida</i>	91722-69-9
<i>Lavandula officinalis</i>	84776-65-8
<i>Mentha piperita</i>	8006-90-4; 84082-70-2
<i>Mentha spicata</i>	84696-51-5
<i>Myroxylon pereirae</i>	8007-00-9
<i>Narcissus spp.</i>	diversos
<i>Pelargonium graveolens</i>	90082-51-2; 8000-46-2
<i>Pinus mugo/pumila</i>	90082-72-7 / 97676-05-6
<i>Pogostemon cablin</i>	8014-09-3; 84238-39-1
<i>Rose spp.</i> (flor)	diversos
<i>Santalum album</i>	84787-70-2; 8006-87-9
<i>Turpentine</i>	8006-64-2; 9005-90-7; 8052-14-0
<i>Verbena</i> (absoluto)	8024-12-2

3.3.2. Compostos polifenólicos

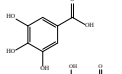

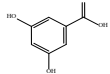

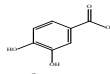
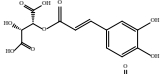
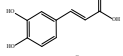
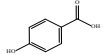
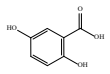
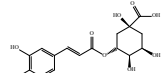
Os compostos polifenólicos constitúen unha clase de metabolitos secundarios biosintetizados no reino vexetal, contribuíndo á fisioloxía das plantas e á súa resistencia fronte microorganismos e insectos. Comprenden un amplo rango de substancias bioactivas que posúen un ou máis aneis aromáticos con, polo menos, un grupo hidroxilo (estrutura básica de fenol). Constitúen un grupo heteroxéneo de compostos con características e funcionalidades diversas, e atópanse presentes nunha gran variedade de extractos naturais.

Para clasificar esta extensa familia de compostos, existen numerosas acepcións. Unha delas é a clasificación [77] dos fenóis en

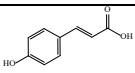
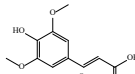
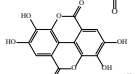
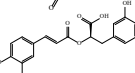
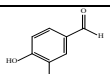
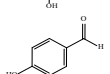
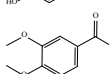
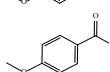
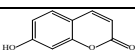
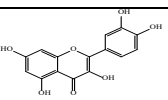
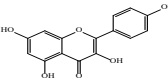
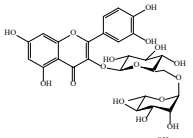
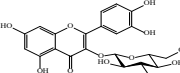
función do número de átomos de carbono da cadea alifática que se atopan substituindo o núcleo bencénico. Así, diferéncianse: ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzoico, fenilacético ou cinámico) e flavonoides (dous aneis aromáticos unidos por unha cadea alifática de tres carbonos), entre outros. Segundo o grao de oxidación dos flavonoides, distínguense flavonas, isoflavonas, flavonois, flavanois, flavanonas e antocianinas. Aínda que se poden atopar nas súas formas libres, son frecuentes as formas glicosiladas e polimerizadas.

A **Táboa 3.3** recolle as diversas clases de compostos fenólicos estudados, os seus números CAS, pesos moleculares (MW) e estruturas químicas. Os datos obtivéronse de ChemSpider e as estruturas químicas realizáronse con ChemDraw 20.1.1.

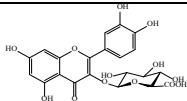
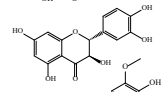
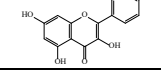
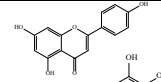
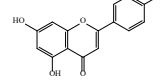
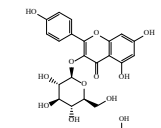
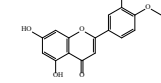
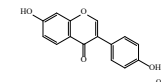
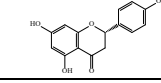
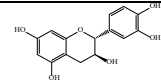
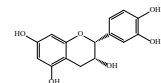
Táboa 3.3. Compostos fenólicos, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Compostos fenólicos	Número CAS	MW	Estrutura química
Ácidos fenólicos			
Ácido gálico	149-91-7	170,1	
Ácido floroglucínico	71989-93-0	188,1	
Ácido α-resorcílico	99-10-5	154,1	
Ácido γ-resorcílico	303-07-1	154,1	
Ácido protocatéquico	99-50-3	154,1	
Ácido caftárico	67879-58-7	312,2	
Ácido cafeico	331-39-5	180,2	
Ácido p-hidroxibenzoico	99-96-7	138,1	
Ácido xentísico	490-79-9	117,1	
Ácido cloroxénico	327-97-9	354,3	

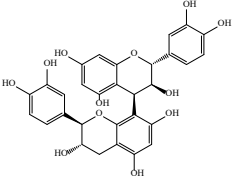
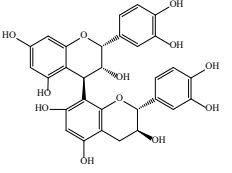
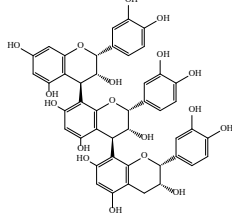
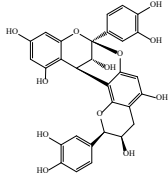
Táboa 3.3. (cont.) Compostos fenólicos, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Compostos fenólicos	Número CAS	MW	Estrutura química
Ácidos fenólicos			
Ácido p-cumárico	501-98-4	164,2	
Ácido sinápico	530-59-6	224,2	
Ácido eláxico	476-66-4	302,2	
Ácido rosmarínico	20283-92-5	360,3	
Aldehídos fenólicos			
3,4-dihidroxibenzaldehído	139-85-5	138,1	
4-hidroxibenzaldehído	123-08-0	122,1	
3,4-dimetoxibenzaldehído	120-14-9	166,2	
4-anisalaldehído	123-11-5	136,1	
Cumarinas			
7-hidroxicumarina	93-35-6	162,1	
Flavonoides			
Flavonois			
Quercetina	117-39-5	302,2	
Kaempferol	520-18-3	286,2	
Rutina	153-18-4	610,5	
Quercetina-3-glucósido	482-35-9	464,4	

Táboa 3.3. (cont.) Compostos fenólicos, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Compostos fenólicos	Número CAS	MW	Estrutura química
Flavonois			
Quercetina-3-glucurónido	22688-79-5	478,4	
Taxifolina	480-18-2	304,3	
Isorhamnetina	480-19-3	316,3	
Flavonas			
Apixenina	520-36-5	270,2	
Luteolina	491-70-3	286,2	
Astragalina	480-10-4	448,4	
Diosmetina	520-34-3	300,3	
Daidzeína	486-66-8	254,2	
Narinxenina	480-41-1	272,3	
Flavanois			
Catequina	18829-70-4	290,3	
Epicatequina	35323-91-2	290,3	

Táboa 3.3. (cont.) Compostos fenólicos, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química.

Compostos fenólicos	Número CAS	MW	Estrutura química
Procianidinas			
Procianidina B1	20315-25-7	578,5	
Procianidina B2	29106-49-8	578,5	
Procianidina C1	37064-30-5	866,8	
Procianidina A2	41743-41-3	576,5	

Entre as propiedades máis notables destes fitoquímicos atópanse a súa capacidade antioxidante [78], a intensa actividade antimicrobiana [79], e a existencia de evidencias doutras propiedades beneficiosas para a saúde, e concretamente para a pel [80,81]. Polo tanto, cada vez son máis considerados para o uso nas actuais formulacións cosméticas [82,83].

3.4. ASPECTOS REGULATORIOS

O uso crecente de ingredientes naturais nos produtos cosméticos e de coidado persoal entraña un desafío lexislativo.

O anexo V do Regulamento europeo de cosméticos [1] recolle a lista dos conservantes permitidos, a cal se atopa constantemente experimentando modificacións lexislativas, ao igual que o resto da regulación. Non obstante, os ingredientes antimicrobianos multifuncionais non están recollidos neste anexo, e polo tanto, non están regulados como ingredientes para cubrir esa función específica nos produtos cosméticos.

Por outra banda, os altos prezos de moitos AEs e ENs converten a adulteración nunha práctica frecuente [84], incluíndo outros compostos naturais que son máis baratos e máis fáciles de adquirir.

En canto ás fragancias alerxénicas, como se comenta no apartado 1.3.5, son 26 as recollidas no marco lexislativo vixente de cosméticos (EC 1223/2009 [1]). Deste xeito, os fabricantes de cosméticos están obrigados a etiquetar só a presenza destas 26 substancias no produto acabado, cando a súa concentración é maior ao 0,001% nos cosméticos de permanencia (*leave-on*) ou superior ao 0,01% naqueles produtos de aclarado (*rinse-off*). Por outro lado, a lista de 82 substancias recoñecidas como alérxenos de contacto polo SCCS [19] inclúe 28 extractos naturais e 54 compoñentes químicos individuais, que suxire indicar na etiqueta. Cando a proposta entre en vigor, será obrigatorio que este total de 82 substancias figuren na etiqueta dos produtos cosméticos finais, o que implicaría a necesidade de etiquetar 54 substancias máis das 26 que é preciso mencionar ata o de agora. É importante resaltar que o uso de ingredientes naturais, como algún destes 28 ENs, se deberá poñer de manifesto na etiqueta do produto pero tamén haberá que considerar os compostos individuais do extracto engadido xa que poden ser outros potenciais alérxenos. É dicir, os propios extractos naturais ou aceites esenciais empregados poden

incorporar involuntariamente novos alérxenos nas formulacións [85-87], incrementando o número ou a concentración das fragancias alerxénicas engadidas con algún outro fin concreto. Ademais, poden conter impurezas presentes nas materias primas orixinais ao carecer estas dun control exhaustivo. A formulación de produtos modernos, mesturando ingredientes naturais e sintéticos, require diversos procedementos precisos e sistemáticos para a súa correcta etiquetaxe [88].

Seguindo coa información das etiquetas, cada vez son máis habituais os reclamos publicitarios, como “natural”, “ecolóxico”, “orgánico”, “libre de”, e resultan, a miúdo, demasiado destacados. Porén, dende 2013 existen criterios comúns regulados para estas afirmacións adoptadas nos produtos cosméticos (Regulamento No 655/2013 [89]).

Finalmente, dado que se utilizan pesticidas para regular o crecemento das plantas utilizadas como materia prima destes ingredientes naturais, pódense detectar a niveis traza nos produtos cosméticos acabados. Actualmente, aínda non existe unha regulación dos niveis máximos de residuos (LMRs) para estes extractos derivados de plantas [90].

3.5. ANTECEDENTES ANALÍTICOS

Este aumento na adición de ingredientes naturais tamén supón un reto analítico ao tratárense de mostras complexas. É preciso desenvolver metodoloxías analíticas que permitan identificar os seus compoñentes individuais así como avaliar a presenza de posibles alérxenos. É necesario que os métodos consideren tanto as materias primas coma os produtos cosméticos finais.

Dada a gran complexidade das mesturas de fragancias utilizadas nos cosméticos, recoméndase a súa determinación mediante GC-MS

realizando un escaneo completo (*Full scan*, FS) [91,92]. A maioría dos estudos publicados céntrase na análise de todas ou parte das 26 fragancias alerxénicas reguladas en produtos cosméticos acabados [18], innovando nas técnicas de preparación da mostra e tornando cara tendencias miniaturizadas. Por outra banda, certas investigacións xiraron en torno á determinación destes alérxenos directamente nas materias primas, tanto en aceites esenciais [93-95] coma extractos botánicos [96,97].

Respecto aos polifenois, son varios os traballos que se enfocan na súa caracterización en extractos naturais [98-101]. E nos últimos anos, á par das liñas sustentables, tamén se busca o estudo do contido de polifenois en diferentes tipos de extractos obtidos de residuos agroalimentarios [102,103] ou forestais [104,105].

4. Técnicas de preparación de mostra

4.1. INTRODUCCIÓN

Tendo en conta a gran cantidade de compostos prohibidos ou non desexados, mesmo en forma de impurezas ou a niveis de traza, que poderían estar presentes tanto nos ingredientes coma nos produtos cosméticos finais, o sector cosmético e os organismos de inspección e vixilancia precisan de metodoloxías fiables para o seu control. A dificultade vén dada pola complexidade e diversidade das matrices cosméticas.

Deste xeito, a preparación da mostra axeitada antes da análise de calquera substancia é chave para conseguir resultados satisfactorios. Entre os obxectivos desta etapa áchanse: lograr a separación do analito ou analitos de interese dende a matriz da mostra, a cal pode conter outros interferentes; a preconcentración do analito; e a adaptación da forma química adecuada do analito e/ou mostra para a posterior análise instrumental. Este paso depende das propiedades fisicoquímicas como a solubilidade, polaridade ou volatilidade, entre outras, dos analitos e da matriz xunto cos seus compoñentes, así como das condicións medioambientais [106].

As técnicas de preparación de mostra foron evolucionando co paso dos anos. Os métodos convencionais consomen maiores tempos, implican certos pasos laboriosos e requiren grandes cantidades de disolventes. As novas tendencias tornan cara a miniaturización, reducindo a cantidade de mostra e disolventes necesaria así como menores tempos de extracción. Deste xeito, procedementos de preparación de mostra rápidos, sinxelos, de menor custo, amigables co

medio ambiente e que sigan os principios da *Química Verde* [107] atópanse en constante desenvolvemento [108].

Nesta tese doutoral empregáronse tres procedementos de preparación de mostra diferentes. A micro-dispersión da matriz en fase sólida (μ -MSPD) e a extracción asistida por ultrasóns (UAE) utilizáronse para a análise de diferentes ingredientes en cosméticos de natureza diversa. A modificación da UAE, *Sup-UAE*, foi utilizada para a investigación dos aplicadores de plástico que posuían certos produtos cosméticos. Ademais, a UAE tamén foi a técnica elixida para extraer os compostos polifenólicos dunha planta galega de cultivo ecolóxico. A microextracción en fase sólida (SPME) aplicouse para o estudo de aceites esenciais e extractos naturais comerciais.

4.2. DISPERSIÓN DA MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)

4.2.1. Introducción

A dispersión da matriz en fase sólida (*matrix solid-phase dispersion*, MSPD) foi introducida en 1989 por Baker e colaboradores [109]. Implica a mestura mecánica da mostra cun sólido dispersante para producir a disrupción da matriz e favorecer a extracción. Este procedemento pode aplicarse a matrices sólidas, semi-sólidas ou viscosas.

A MSPD presenta vantaxes sobre as técnicas clásicas de tratamento da mostra: unha significativa redución da manipulación e, polo tanto, do tempo de tratamento; lévase a cabo con materiais sinxelos e baratos, sen necesidade de instrumentación custosa; baixo unhas condicións de extracción suaves (temperatura ambiente e presión atmosférica); e diminúe o consumo de disolventes orgánicos [110]. Permite realizar simultaneamente a extracción e limpeza do extracto, o que reduce as posibilidades de contaminación da mostra durante o proceso e a posible perda de analitos.

Ademais, para reducir aínda máis as cantidades de mostra, axente dispersante e disolvente, foi proposta unha miniaturización da MSPD, baixo o nome de micro-MSPD (μ -MSPD) [111].

4.2.2. Procedemento experimental e factores da MSPD

O procedemento clásico da MSPD implica os pasos que se describen a continuación [112]:

1. O proceso lévase a cabo nun morteiro ou nun vial, no que se mestura a mostra cun axente dispersante para conseguir unha completa disrupción e dispersión da mostra. Ademais, para algunhas aplicacións, tamén é preciso engadir un axente de secado como o sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para obter un material finamente dividido e o suficientemente seco para a posterior extracción.
2. Unha vez completada a etapa de mestura, a mostra homoxeneizada introdúcese nunha columna baleira, que acostuma ser o corpo dunha xiringa, cunha frita na parte inferior. Adicionalmente, para lograr un maior grao de fraccionamento e un paso de limpeza *in situ*, pódese agregar unha pequena cantidade de florisil ou outro axente adsorbente entre a frita e a mostra. Unha vez empacuetada, colócase outra frita enriba da mostra e compáctase ben, pero tampouco en exceso para evitar a formación de canais e burbullas de aire.
3. A elución pode levarse a cabo de dúas maneiras segundo a retención na columna. A primeira delas fai referencia á retención dos analitos de interese na columna mentres os interferentes se elúen durante a etapa de lavado, e logo os compostos obxectivo elúense con outro disolvente distinto. A segunda opción implica a retención das interferencias da matriz na columna e son os analitos obxectivo os que se elúen directamente cun disolvente. Tamén é posible realizar elucións múltiples ou secuenciais. A maioría das elucións lévanse a cabo por gravidade, aínda que nalgúns casos é preciso aplicar presión na cabeza da columna para que se inicie o fluxo.

4. Finalmente, o extracto obtido pode analizarse directamente ou, se é necesario, pode efectuarse unha etapa de limpeza adicional.

Alén, o axente dispersante e o disolvente son factores críticos na técnica MSPD. De seguido, descríbense os factores que poden afectar á eficacia da extracción [110]:

- *Axente dispersante*: as aplicacións clásicas da MSPD empregan adsorbentes a base de sílice como axentes dispersantes. Como vantaxe adicional, estes materiais conteñen unha certa proporción de grupos silanol libres capaces de formar enlaces de hidróxeno con moléculas de auga, polo que actúan ao mesmo tempo como dispersantes e desecantes. Polo xeral, úsanse materiais de sílices enlazadas en fase reversa como octadecilsilano ou octilsilano (C18 ou C8) que permiten a retención selectiva de compoñentes con polaridade baixa ou media [113]. Tamén se usan outros materiais modificados para illar analitos máis polares, como a sílice enlazada a grupos polares (por exemplo, aminas) ou a óxidos inorgánicos non enlazados (sílice propiamente dita, alúmina ou florisil). Ademais, hai que ter en conta o diámetro das partículas para chegar a unha situación axeitada de superficie de contacto e velocidade de elución. A relación entre as cantidades de mostra e dispersante é un parámetro importante, onde a proporción depende da aplicación concreta pero, polo xeral, non se supera a relación 1:4.
- *Disolvente de elución*: a súa selección resulta chave para a extracción selectiva dos analitos, desorbéndose así os compostos de interese mentres que os compoñentes indesexables da matriz permanecen. Esta selectividade vén determinada pola natureza da matriz, a polaridade dos analitos, a estratexia de elución e o adsorbente seleccionado.
- *Modificación da matriz*: en ocasións, para asegurar que teñen lugar as interaccións co soporte sólido, é necesario modificar algúns parámetros da matriz, actuando sobre o pH, a adición de sales ou con axentes quelantes. Isto pode facerse durante a mestura da mostra e/ou modificando posteriormente a composición do

disolvente de elución.

4.2.3. Últimas tendencias e aplicacións

As tendencias actuais nos procedementos de preparación da mostra apuntan cara a miniaturización dos mesmos en concordancia cos principios da *Química Verde* [107] para a redución de reactivos e residuos [114]. Desta maneira, unha miniaturización da MSPD, coñecida como μ -MSPD [111], constitúe unha alternativa ás técnicas clásicas.

A principal vantaxe da μ -MSPD é que se require de tamaños de mostra aínda menores e moi baixo gasto de disolventes orgánicos. En canto ao procedemento experimental (véxase **Figura 4.1**), o cambio respecto ao comentado no apartado anterior é que se emprega unha pipeta Pasteur (de aproximadamente 150 mm de lonxitude) con lá de vidro tanto no fondo coma enriba da mostra. Desta maneira, os materiais usados son desbotables e de baixo custo.

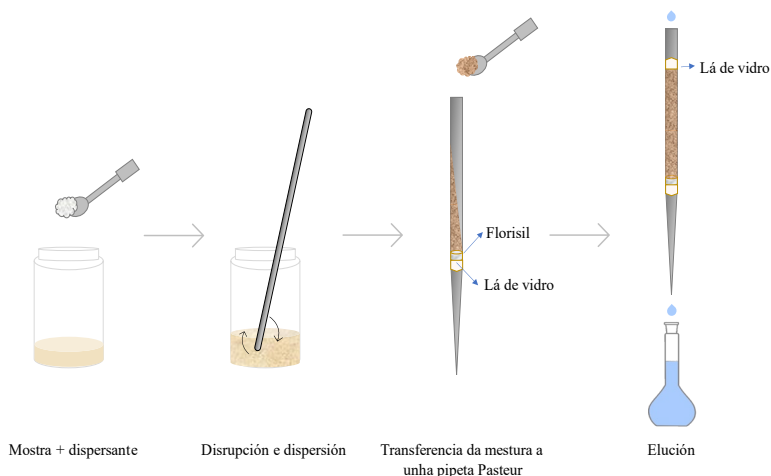


Figura 4.1. Procedemento esquemático da μ -MSPD.

Tanto a MSPD [115-118] como a alternativa miniaturizada [111,119-125] utilizáronse para a extracción dunha ampla variedade de compostos, incluíndo conservantes, colorantes e plastificantes, entre outros, en matrices cosméticas.

Na **Sección IV**, Capítulo 1, 1.1 e 1.2, desenvóléronse metodoloxías baseadas na μ -MSPD para determinar varias familias de ingredientes en formulacións cosméticas.

4.3. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASÓNS (UAE)

4.3.1. Introducción

A extracción asistida por ultrasóns (*ultrasound assisted extraction*, UAE) é unha técnica sinxela, rápida e de baixo custo. Está baseada nos ultrasóns, ondas sonoras con frecuencias maiores ao límite superior audible do oído humano e consiste en aplicar enerxía ultrasónica para extraer analitos en mostras líquidas ou sólidas. Debido a esta enerxía, fórmanse burbullas segundo o fenómeno chamado cavitación. A axitación continua do disolvente orgánico facilita os procesos de transferencia de masa entre as dúas fases a medida que o disolvente penetra máis nas diferentes matrices [126]. Deste xeito, a inclusión de enerxía de ultrasóns permite unha redución do tempo de extracción, obtendo un alto rendemento e é compatible con calquera disolvente.

4.3.2. Procedemento experimental e factores da UAE

En canto ao procedemento experimental, a UAE pode levarse a cabo empregando un baño ou unha sonda de ultrasóns. No primeiro caso, a mostra (líquida ou sólida) mestúrase cun disolvente nun vial e somérxese nun baño de ultrasóns aplicando unha frecuencia específica e constante (normalmente no rango de 20 a 100 kHz). O baño de ultrasóns é unha fonte de irradiación dispoñible e barata. Se se utiliza

unha sonda, pódese introducir na mostra e realizar extraccións máis enérxicas [127], útil para mostras moi complexas.

Ademais, varios parámetros poden afectar á eficacia da extracción [128]:

- *Disolvente*: o disolvente debe seleccionarse en función dos analitos de interese. O tipo, a cantidade, a viscosidade e a proporción co soluto, contribúen á transmisión da enerxía ultrasónica.
- *Tempo de extracción*: un tempo longo mellora os rendementos da extracción, pero tamén pode inducir cambios indesexables nos analitos extraídos, polo que o tempo de extracción condiciona a mesma.
- *Temperatura*: Ao aumentar a temperatura, diminúen a viscosidade e a tensión superficial pero induce un aumento da presión de vapor, polo que se potencia a cavitación. Para aqueles procesos de extracción con menor intensidade, as temperaturas máis altas poden incrementar o número de burbullas de cavitación. Así, fórmase unha maior área de contacto entre unha mostra sólida e o disolvente, aumenta a difusión deste e mellóranse a desorción e solubilidade dos compostos de interese. Polo tanto, a temperatura do disolvente debe ser controlada dentro dun rango axeitado, xa que hai que ter en conta a posible degradación dos analitos.

4.3.3. Aplicacións

A UAE foi aplicada como unha técnica sinxela e rápida de preparación de mostras no análise de cosméticos [129-133] e de mostras naturais [134-139].

Na **Sección IV**, Capítulo 1, 1.2 e Capítulo 2, 2.1, empregáronse procedementos de UAE para estudar glicóis e derivados ou diferentes ingredientes cosméticos, respectivamente, nun amplo abano de

formulacións cosméticas, abarcando algunhas típicas e outras con características máis particulares.

Nesta tese, ademais da UAE clásica, propúxose unha pequena modificación desta técnica (denominada UAE con soporte, *Sup-UAE*) para aplicar fundamentalmente a mostras cosméticas que contiñan aplicadores (Capítulo 2, 2.1). A variación consistiu en empregar un anaco de papel de filtro dunhas dimensións concretas no que se aplicou a mostra, e posteriormente ese papel é introducido nun vial para levar a cabo a extracción (véxase **Figura 4.2**). É dicir, a mostra non se introduce directamente no vial, senón que vai impregnada no papel e é posto en contacto co disolvente.

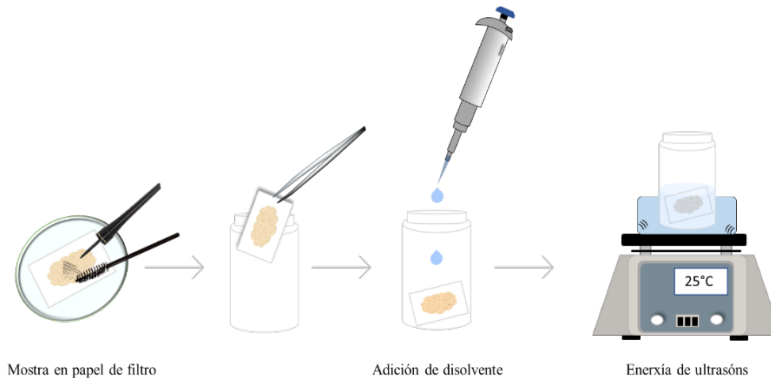


Figura 4.2. Procedemento esquemático da Sup-UAE.

No Capítulo 4, 4.2, tamén se empregou a UAE para obter diferentes extractos dunha planta cultivada en Galiza e logo investigar o seu contido en compostos fenólicos.

4.4. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

4.4.1. Introducción

A microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*,

SPME) foi descrita por primeira vez en 1990 por Pawliszyn e colaboradores [140], a cal podería ser usada non só no laboratorio senón tamén en traballos de campo. A SPME baséase nunha fibra fina de sílice fundida quimicamente inerte e estable mesmo a altas temperaturas, recuberta cunha capa polimérica dun ab/adsorbente como fase estacionaria. Para levar a cabo a extracción, esta fibra acomódase nun dispositivo que semella unha xiringa e expónse á mostra o tempo correspondente, logo retráese e pódese desorber directamente no inxector do sistema cromatográfico. Esta técnica pódese aplicar a mostras sólidas, líquidas ou gasosas.

A SPME permite nunha soa etapa a preconcentración e extracción, aumentando así a súa eficiencia. As principais vantaxes que presenta son: a súa sinxeleza ao tratarse dun dispositivo fácil de manexar, o uso de cantidades mínimas de disolventes orgánicos e inclusive a ausencia deles para certas aplicacións de cromatografía de gases (GC) e tamén a mínima xeración de residuos. Isto converte á SPME nunha aproximación de preparación de mostra verde e amigable co medio ambiente. A introdución directa do analito no instrumento de detección minimiza o risco de perda e ademais, é fácil de automatizar, o cal ofrece maior simplicidade, tempo de extracción curto e require unha supervisión mínima.

4.4.2. Procedemento experimental SPME

A técnica de SPME envolve dous procesos: extracción e desorción.

1. *Extracción*: a fibra expónse á mostra contida nun vial selado e prodúcese unha migración dos analitos dende a mostra ao recubrimento da fibra, completándose a extracción cando se acada o equilibrio de distribución.

A extracción pode levarse a cabo mediante dous modos diferentes de exposición da fibra (véxase **Figura 4.3**):

- *Extracción con inmersión directa (direct immersion-solid phase microextraction, DI-SPME)*: a fibra introdúcese directamente na mostra, permitindo a migración dos analitos á fibra. É o modo preferido normalmente para analitos lixeiramente volátiles e para matrices sinxelas.
- *Extracción en espazo de cabeza (headspace-solid phase microextraction, HS-SPME)*: a fibra expónse á fase gasosa do espazo de cabeza por enriba da mostra. Neste modo, os analitos pasan primeiro dende a mostra ao espazo de cabeza para seren posteriormente ad/absorbidos na fibra. Esta aproximación é indicada para a extracción de substancias volátiles e semivolátiles e utilízase amplamente en matrices complexas.

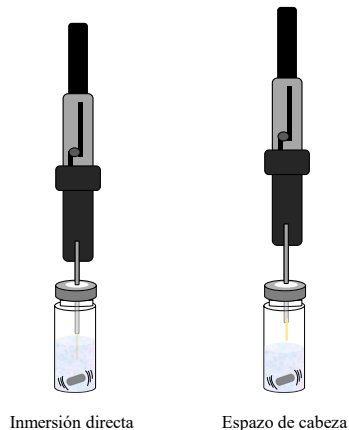


Figura 4.3. Modos de extracción na SPME.

2. *Desorción*: a fibra cos analitos retidos e concentrados pode desorberse termicamente de maneira directa nun instrumento analítico de GC ou indirectamente nun disolvente para a análise mediante cromatografía de líquidos (LC).

4.4.3. Factores que inflúen na eficiencia da extracción

A continuación lístanse varios factores que poden afectar á SPME [141,142]:

- *Recubrimento da fibra*: existe unha ampla gama de fases poliméricas con diferentes grosos e polaridades. As propiedades químicas do analito determinarán o tipo de recubrimento a utilizar, xeralmente en función da similitude na súa polaridade.
- *Tempo de extracción*: ao tratarse dunha técnica de equilibrio, a maior extracción conséguese no tempo necesario para lograr dito equilibrio. Con todo, pódense seleccionar tempos de extracción máis curtos se se controla o tempo do proceso para garantir unha boa reproducibilidade.
- *Temperatura de extracción*: a difusión dos analitos cara a fibra acostuma verse favorecida por temperaturas máis altas e no caso concreto de HS-SPME, o incremento da temperatura axuda ás transferencias dos analitos ao espazo de cabeza. Non obstante, dado que a absorción é un proceso exotérmico, este aumento da temperatura reduce a constante de distribución fibra/mostra.
- *Efecto salino (salting-out)*: a adición de sales, como KCl ou NaCl nunha solución acuosa, induce o incremento da forza iónica. Deste xeito, favorécese a diminución da solubilidade do analito na auga e facilítase a súa transferencia a outras fases do sistema, como o espazo de cabeza ou a fibra.
- *pH da mostra*: o pH pode afectar ao equilibrio de disociación dos analitos. Para obter unha alta eficiencia de extracción, débese axustar o pH dúas unidades por debaixo do pK_a para os compostos ácidos e dúas unidades por arriba para aquelas substancias básicas.
- *Volume do espazo de cabeza*: se este volume é moi grande, os compostos volátiles dilúense nel, diminuindo así a súa concentración final na fibra. Por outro lado, canto menor é o tamaño do espazo de cabeza, máis rápida é a cinética do proceso de extracción.
- *Axitación da mostra*: a difusión dos analitos á fibra pode ser

facilitada mediante axitación, acelerando o tempo de extracción.

- *Adición de disolvente:* mentres que a adición de disolventes en solucións acuosas acostuma diminuír a eficacia de extracción, a adición de disolventes orgánicos ou de auga, no caso de mostras sólidas, pode favorecer a difusión dos analitos dende a matriz á fibra.

4.4.4. Aplicacións

A SPME é unha técnica de preparación da mostra proposta para multitude de aplicacións. Entre elas, empregouse para a determinación dunha ampla variedade de analitos en produtos de coidado persoal e cosméticos [143-145], incluíndo o estudo de fragancias alerxénicas [146,147]. Ademais, tamén se utilizou para a análise de materiais vexetais [148-150] e aceites esenciais [151-154].

Na **Sección IV**, Capítulo 4, 4.1, aplicouse unha metodoloxía baseada en SPME para o estudo de mostras comerciais de aceites esenciais e extractos naturais.

4.5. DIXESTIÓN ÁCIDA

A dixestión ácida é un tratamento realizado tanto a mostras sólidas coma líquidas, cuxo obxectivo principal é liberar os elementos a analizar mediante a destrución da materia orgánica presente na matriz, reducindo así interferencias e facilitando a análise nos instrumentos de medición. Este mecanismo lévase a cabo pola axuda de calor e a adición de reactivos químicos, xeralmente en medio ácido. Os ácidos máis empregados son os ácidos nítrico (HNO_3) e clorhídrico (HCl), dado que disolven varios metais. Non obstante, cando é preciso disolver materia inorgánica ou mineral, utilízase auga rexia ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$ 1:3) ou outros ácidos como sulfúrico (H_2SO_4) ou fluorhídrico (HF), máis perigosos e que se intentar evitar. Empregando altas temperaturas de reacción, as

mostras poden ser dixeridas rapidamente para a posterior análise, por exemplo mediante espectrometría de masas con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

A dixestión ácida aplicouse en estudos previos na preparación de mostras cosméticas [155] así como de henna, asistida mediante o uso de microondas [66,67] ou levada a cabo nunha placa térmica [65]. Na **Sección IV**, Capítulo 3, 3.4, para o pretratamento das mostras de henna e jagua, aplícanse dous procedementos de dixestión ácida segundo o estado físico das mesmas, empregando unha placa térmica.

4.6. TENDENCIA Á MÍNIMA PREPARACIÓN DE MOSTRA

A preparación da mostra é unha parte do proceso analítico que resulta a miúdo laboriosa, consome moito tempo e inflúe na calidade dos resultados obtidos. Ademais das tendencias á miniaturización das técnicas, procúranse métodos eficientes pero, á súa vez, máis sinxelos. Esta idea apunta cara ao concepto de mínima preparación da mostra naqueles casos nos que a matriz así o permita. O obxectivo principal é manter a manipulación da mostra como unha etapa case imperceptible, preto do estado natural de uso. A dilución simple nun disolvente adecuado é un dos procedementos máis empregados cando esta minimización do tratamento da mostra é unha opción axeitada.

Na **Sección IV**, Capítulo 3, 3.1 e 3.2, seguiuase a tendencia á mínima preparación de mostra, aplicando dilucións simples (axudadas nalgúns casos por axitación ultrasónica para asegurar a solubilidade total das mostras). Desta maneira, as mostras son analizadas próximas ao seu estado de comercialización ou uso. Adicionalmente, na **Sección IV**, Capítulo 3, 3.3, non se require preparación de mostra para o enfoque multianalítico empregado.

5. Técnicas de análise

5.1. INTRODUCCIÓN

A correcta identificación e cuantificación dos analitos estudados é esencial para realizar a súa análise. Para levar a cabo esta tarefa, empregáronse diversas técnicas cromatográficas combinadas, na maioría dos casos, con detectores selectivos como a espectrometría de masas (MS). Usouse a cromatografía de gases (GC) seguida de MS, de maneira xeral, para as aplicacións que envolvían ingredientes cosméticos. Naqueles casos que a natureza dos compostos así o requiría, aplicouse tamén cromatografía de líquidos (LC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Ademais, LC-MS/MS foi a técnica elixida para analizar os polifenóis presentes en extractos de plantas.

Por outra banda, a cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con detector de rede de diodos (DAD) foi usada na determinación dos ingredientes activos de tatuaxes temporais con base vexetal. Adicionalmente, seleccionáronse enfoques dunha potente ferramenta como é a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), empregando agora un cuadrupolo e un tempo de voo (QTOF), tanto para análises dirixidas coma non dirixidas. Finalmente, para completar a caracterización destas mostras pouco coñecidas, outras técnicas espectrométricas alternativas foron consideradas.

Ademais, determinouse o contido fenólico total (TPC) e a actividade antioxidante (AA) nos extractos de plantas, mediante protocolos de medida de absorbancia con espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis).

Algunhas características destas técnicas analíticas son descritas nos seguintes apartados.

5.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

5.2.1. Introducción

O principio da técnica de separación de cromatografía de gases (GC) é a distribución dos analitos dunha mestura entre un gas portador (fase móbil, FM, gasosa) e unha columna cromatográfica (fase estacionaria, FE), que adoita ser un líquido non volátil inmovilizado na superficie dun sólido. A GC acostuma elixirse para a análise de compostos volátiles ou semivolátiles que son termicamente estables e non susceptibles á adsorción ou descomposición no soporte sólido da columna. Para analizar outros compostos polares e/ou termosensibles, é necesario un paso previo adicional denominado derivatización. Este proceso consiste na modificación dun certo grupo funcional da molécula, obtendo unha especie menos polar ou máis volátil [156]. A derivatización mellora a resolución cromatográfica e aumenta a resposta dos analitos no sistema de detección [157].

Tras a separación dos diferentes compoñentes que forman parte dunha mostra, dispónse dos seus tempos de retención (correspondentes aos picos cromatográficos). Con todo, esta información resulta insuficiente para unha identificación inequívoca, polo que son precisos detectores selectivos que si a permitan.

5.2.2. Espectrometría de masas

A espectrometría de masas (MS) é unha ferramenta analítica moi potente que proporciona ambos tipos de información (cualitativa, composición elemental ou estrutura química, e cuantitativa) das moléculas estudadas despois da súa transformación en ións. A MS

presenta vantaxes numerosas, como alta selectividade, especificidade e sensibilidade. Un espectrómetro de masas componse de tres elementos fundamentais: fonte de ionización (as especies neutras transfórmanse en ións), analizador de masas (actúa coma un filtro de masas) e detector.

Así, o acoplamento GC-MS combina todo isto e é probablemente unha das técnicas híbridas preferidas [158], usada de forma rutineira en laboratorios de control e investigación. A hibridación entre a GC e a MS é doada, dado que ambas metodoloxías operan en fase gasosa e a cantidade de mostra necesitada para a análise é moi pequena. A mostra introdúcese directamente dende o sistema cromatográfico ata o espectrómetro de masas a través dunha interface quentada que comeza na saída da columna, situada no interior do cromatógrafo de gases, e esténdese ata a fonte de ións do espectrómetro. A continuación, ten lugar a ionización dos analitos da mostra.

Con respecto ás fontes de ionización, a ionización electrónica (EI) é unha das máis empregadas. Neste caso, trátase dunha fonte dura, na cal as moléculas son bombardeadas cun feixe de electróns dende un filamento altamente cargado a unha enerxía específica. Este exceso de enerxía, provoca a emisión dun electrón e a formación de ións moleculares positivos (M^+) así como ións fragmento. De seguido, os ións son enviados ao analizador e en función da súa relación masa-carga (m/z), alcanzan o detector, xerándose así o espectro de masas da substancia [158].

Existen diferentes tipos de analizadores de masa como cuadrupolos, trampa de ións, tempo de voo, entre outros. Na presente tese empregouse un cuadrupolo simple acoplado a cromatografía de gases. Este consiste en catro barras cilíndricas e paralelas que serven de eléctrodos e están electricamente conectadas en pares opostos sobre os que se aplica un potencial de radiofrecuencia variable. Estes analizadores actúan como filtros de masa, xa que permiten que os ións cunha determinada relación m/z pasen ao detector. Aqueles ións que non teñen as relacións m/z recoñecidas polo cuadrupolo, chegan aos

cilindros e convértense en moléculas neutras. Este tipo de instrumentos son os analizadores de masa máis compactos, potentes e baratos [159]. Existen tamén diferentes modos de monitorización de ións:

- Barrido completo (*Full Scan*, FS): rexistro continuo de todas as masas comprendidas nun rango especificado, sen seguir criterios de filtración de m/z .
- Monitorización de ións seleccionados (*Selected Ion Monitoring*, SIM): filtración soamente de ións cunha relación m/z específica, reducindo as interferencias e aumentando a selectividade.

A GC acoplada á MS en modo SIM aplicouse para a análise de diferentes ingredientes cosméticos en formulacións típicas (**Sección IV**, Capítulo 1) así coma noutras máis novidasas como cosméticos *extremos* ou *borderline* (**Sección IV**, Capítulo 2). Tamén se utilizou GC-MS traballando en FS para a caracterización de aceites esenciais e extractos naturais comerciais (**Sección IV**, Capítulo 4, 4.1).

5.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

5.3.1. Introducción

A cromatografía de líquidos (LC) baséase na distribución dos analitos entre unha FM líquida e unha FE sólida (columna cromatográfica). Existen diferentes tipos de cromatografía líquida como a de adsorción, intercambio iónico ou exclusión molecular, pero a máis utilizada é a cromatografía de partición (utilizada nesta tese doutoral). A FE consiste nunha columna empaquetada chea de partículas de sílice porosas e recubertas dunha película orgánica (octadecilo, neste caso concreto) unida por enlaces químicos. A LC constitúe unha técnica de separación moi empregada en termos xerais debido á súa versatilidade e sensibilidade e, a miúdo, selecciónase para a determinación de compostos non volátiles, polares e/ou termicamente

inestables [158] nunha ampla gama de campos. O instrumento de LC consiste nun inxector, unha bomba, unha columna e un detector.

A cromatografía de alta eficacia (HPLC) pode ser clasificada segundo a natureza da FE utilizada: normal (FE estacionaria polar e unha FM moito menos polar) e de fase inversa (FM relativamente polar e FE non polar). A selección da FE depende das características dos analitos. A cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC) permite o uso de columnas con partículas de pequeno diámetro, as cales xeran maiores presións no sistema durante a análise cromatográfica. As vantaxes que ofrece a UHPLC son o menor tempo de análise, alta resolución de picos e unha excelente forma dos mesmos así como un aumento da sensibilidade [160].

Tanto a LC como a UHPLC poden emparellarse á espectrometría de masas como a outro tipo de detectores como de rede de diodos (DAD). Cando se desenvolve unha metodoloxía que implica análise mediante calquera técnica de LC, varios factores teñen que ser optimizados para conseguir unha separación óptima dos analitos, dende a selección da FE axeitada, a composición da FM ata a temperatura da columna cromatográfica.

5.3.2. Detector de diodos (DAD)

O detector de rede ou matriz de diodos (DAD) permite a adquisición de espectros UV-Vis nun amplo rango de mostras, cuxos analitos deben conter un grupo cromóforo. Debido á súa rapidez, é capaz de rexistrar a totalidade do espectro, proporcionando un cromatograma que amosa a absorbancia en función da lonxitude de onda no intervalo de tempo seleccionado. Desta maneira, pódese elixir a lonxitude de onda segundo o máximo de absorción de cada substancia.

Así, a metodoloxía HPLC-DAD é unha técnica que permite a separación, identificación (por comparación con patróns ou bibliotecas de espectros UV-Vis) e cuantificación de distintas especies químicas

nunha disolución. Nesta tese, a combinación HPLC-DAD foi empregada para a identificación e cuantificación dos ingredientes activos de pigmentos naturais (**Sección IV**, Capítulo 3, 3.1).

5.3.3. Espectrometría de masas (MS)

Nesta tese, a LC empregouse seguida de espectrometría de masas (MS) en tándem, usando tanto MS de triplo cuadrupolo de baixa resolución como MS de alta resolución (HRMS) utilizando un analizador de cuadrupolo acoplado a un de tempo de voo (QTOF). No caso do acoplamento LC-MS, como as mostras líquidas non poden introducirse directamente no espectrómetro de masas, a fonte de ionización debe vaporizalas transformando as moléculas da disolución en ións en fase gasosa. A continuación, os ións son filtrados segundo as súas relacións m/z no analizador e alcanzan o detector [158,161].

Existen diversas fontes de ionización para xerar ións en fase gasosa a partir da fase líquida e conectar a LC coa MS. As máis comúns son a ionización química a presión atmosférica (APCI) e a ionización por electrospray (ESI), sendo ambas fontes de ións suaves. A ESI emprega enerxía eléctrica para facilitar a transferencia de ións dende a disolución á fase gasosa. O proceso implica tres pasos: (1) condución dun pequeno fluxo da disolución da mostra mediante un capilar no que se nebuliza, formando gotas cargadas cando se aplica unha alta voltaxe; (2) as gotas redúcense por evaporación do disolvente e desintégranse; (3) produción ou emisión de ións a partir das gotas altamente cargadas (explosión culómbica) [158,162]. A ESI foi empregada durante esta tese, así como a ionización por electrospray con temperatura (*heated electrospray ionization*, HESI). Esta, a diferenza da ESI, utiliza un gas auxiliar quente que proporciona unha mellor desolvatación e sensibilidade.

Con relación aos analizadores de masa, varios espectrómetros de masas poden acoplarse en serie para aumentar a selectividade e

sensibilidade, resultando en espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

5.3.3.1. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

A espectrometría de masas en tándem (MS/MS) é unha técnica que permite obter o espectro de masa dos ións preseleccionados e fragmentados. O espectrómetro de masas en tándem máis común é o de triplo cuadrupolo (QqQ), que consiste na combinación de dous cuadrupolos e unha cela de colisión para lograr a filtración dos ións cunha relación m/z específica e a súa posterior fragmentación. Nos espectrómetros QqQ, a mostra é introducida primeiro na fonte de ionización e os ións xerados son acelerados no cuadrupolo 1 (Q1), o cal actúa como filtro de masa, considerando a relación m/z dos ións. Os ións acelerados pasan ao cuadrupolo 2 (q2), o cal consiste nunha cela de colisión onde ten lugar a fragmentación dos ións seleccionados no Q1 pola acción do gas de colisión (un gas inerte como o argon ou o nitróxeno). Finalmente, o cuadrupolo 3 (Q3) permite a análise de masas dos ións produto formados na cela de colisión [158].

Este instrumento pode traballar en diferentes modos de monitorización de ións. Ademais dos comentados anteriormente para un cuadrupolo simple, FS e SIM, tamén en monitorización de reaccións seleccionadas (*Selected Reaction Monitoring*, SRM). En SRM, Q1 e Q3 traballan en modo SIM, filtrando relacións m/z específicas dos ións precursores e produtos, respectivamente. Este xeito de traballar minimiza ou incluso evita interferencias, proporcionando unha ferramenta sensible e selectiva que dá como resultado cromatogramas con ruído moi baixo. A **Figura 5.1** describe a configuración dun espectrómetro de masas de triplo cuadrupolo que traballa en modo SRM.

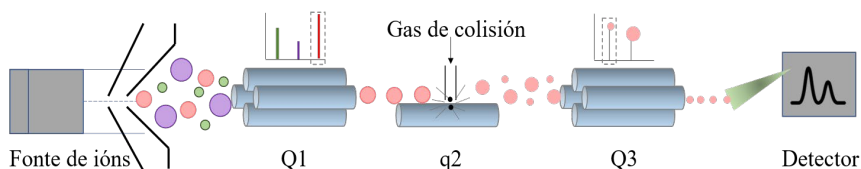


Figura 5.1. Configuración dun espectrómetro de masas de triplo cuadrupolo (modo SRM).

A LC seguida de MS/MS operando en modo SRM foi a configuración elixida para a determinación de aquilfenóis (APs) e etoxilatos de alquifenol (APEOs) en cosméticos na **Sección IV**, Capítulo 1, 1.1. Tamén foi empregada para investigar a composición polifenólica en extractos obtidos a partir de plantas de cultivo ecolóxico galego (**Sección IV**, Capítulo 4, 4.2).

5.3.3.2. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

A espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) proporciona espectros MS/MS e medicións de masa monoisotópica precisas. Esta configuración é moi valiosa para a confirmación de compostos obxectivo pero tamén para a identificación doutros descoñecidos. Ademais do tempo de retención e a relación de fragmentos de ións, tamén proporciona outros parámetros de confirmación adicional como a masa exacta, o perfil isotópico e a posibilidade de comparación espectral con bibliotecas.

Durante esta tese, utilizáronse dous enfoques de HRMS empregando un detector de masas cuadrupolar e de tempo de voo (QTOF). A **Figura 5.2** inclúe o esquema dun espectrómetro QTOF. Operou nun modo baseado na disociación inducida por colisión de banda ancha (bbCID), o que permite o rexistro exhaustivo de todos os ións precursores e produtos detectables independentemente da intensidade do precursor. Funciona en ciclos rápidos e continuos de baixa e alta enerxía de colisión, proporcionando simultaneamente espectros MS e MS/MS e aportando información sobre os ións

precursores e os patróns de fragmentación nunha soa análise. Naquelas aplicacións nas que a aproximación é non dirixida, compostos descoñecidos poden ser identificados cos mesmos datos sen necesidade de repetir a adquisición. Así, a LC acoplada a HRMS preséntase como unha potente ferramenta que é aplicada en proteómica e metabolómica [163] así como noutras determinacións.

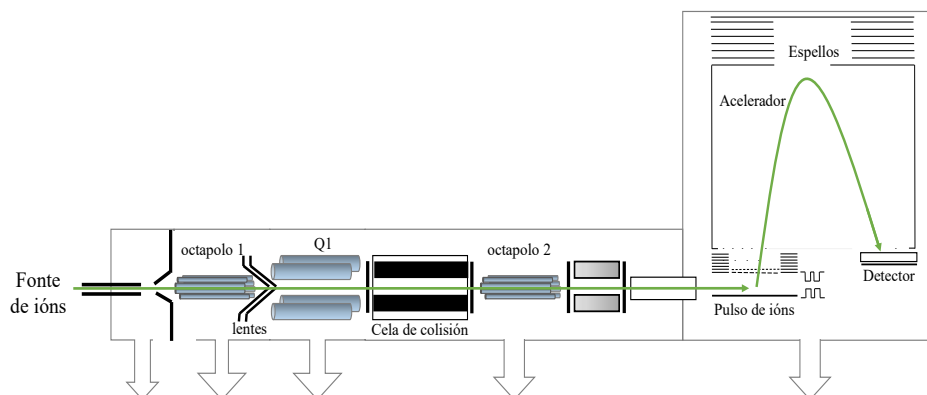


Figura 5.2. Esquema dun espectrómetro QTOF.

A HRMS aplicouse tanto para a análise diana dos ingredientes activos de produtos temporais a base de henna e jagua, coma para enfoques non dirixidos para a caracterización dos mesmos (**Sección IV**, Capítulo 3, 3.2).

5.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VIS

A espectroscopia é unha ciencia que estuda a interacción da radiación coa materia. A espectroscopia de absorción molecular UV-Vis baséase na medición da transmitancia ou da absorbancia. Para levar a cabo a medida, faise pasar un feixe de luz a unha determinada lonxitude de onda (λ , nm) a través dunha disolución contida nunha cubeta ou cela transparente que, dependendo do rango espectral da

medida, é de plástico, vidro ou cuarzo, e rexístrase a cantidade de luz absorbida pola disolución [159].

5.4.1. Contido Fenólico Total (TPC)

Adicionalmente, a composición química de extractos naturais pode ser estudada en termos de contido fenólico total (TPC) sen necesidade de seleccionar compostos polifenólicos obxectivo. Pode determinarse seguindo o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi [164], realizando a medición a 760 nm nun espectrofotómetro UV-Vis. Este método baséase na capacidade dos fenóis para reaccionar con axentes oxidantes. Así, o reactivo de Folin-Ciocalteu (cor amarela) redúcese ante calquera tipo de fenol en medio básico, o que lle confire unha cor azul intensa, proporcional ao número de grupos hidroxilo da molécula.

5.4.2. Actividade Antioxidante (AA)

Un antioxidante pode ser definido como calquera molécula capaz de previr ou retardar a oxidación (perda dun ou máis electróns) de outras moléculas, xeralmente substratos biolóxicos. A súa oxidación podería ser iniciada por dous tipos de especies reactivas: os radicais libres ou outras especies que son o suficientemente reactivas para inducir a oxidación de substratos. A actividade antioxidante (AA) está fortemente correlacionada co contido fenólico total e varía moito segundo a orixe botánica e a cor. Poden aplicarse varios enfoques diferentes para determinar AA en extractos naturais. Nesta tese, a AA avalíase empregando o protocolo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) mediante un método modificado por Brand-Williams [165] (absorbancia medida a 515 nm). O método baséase na desaparición deste radical (cor violeta) en presenza de substancias polifenólicas antioxidantes que o reducen, ocasionando así un descenso proporcional na intensidade da cor.

Ambos índices espectrofotométricos son aplicados de xeito habitual no estudo de extractos naturais [166-168] e incluso residuos derivados [169-172]. Polo tanto, utilizouse un espectrofotómetro UV-Vis para determinar os índices TPC e AA dos extractos obtidos a partir de plantas (**Sección IV**, Capítulo 4, 4.2).

5.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP-MS)

A espectrometría de masas con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é unha técnica de análise multielemental, que permite determinar de maneira cuantitativa case todos os elementos da táboa periódica, ata en niveis traza, en diferentes tipos de mostra [173]. Baséase no acoplamento de dous métodos, un para xerar ións (plasma acoplado indutivamente) e outro para separalos e detectalos actuando coma un filtro de masas (espectrometría de masas). É altamente sensible e ofrece información sobre a composición elemental de mostras así como da relación isotópica de determinados elementos. Unha das vantaxes que ofrece é que permite medir simultaneamente nunha soa análise un conxunto de elementos seleccionados [174].

A mostra, líquida ou en disolución, é transportada ata o sistema nebulizador, onde é transformada nun aerosol debido á acción do gas argon. Posteriormente, dito aerosol é conducido ata a zona de ionización, a cal consiste nun plasma xerado ao someter o fluxo de gas a un campo magnético inducido por corrente de alta frecuencia. Nestas condicións, evapórase o solvente da mostra e os compostos descompóñense en átomos, que finalmente son ionizados. Os ións, a través dunha interface de baleiro, pasan ao filtro cuadrupolar, onde son separados segundo a súa relación m/z e finalmente alcanzan o detector. A concentración dos elementos é proporcional ao número de ións detectados.

Existen diferentes analizadores de masa: un único cuadrupolo (*single quadrupole*) ou triplo cuadrupolo. Neste último, a tecnoloxía baséase na configuración de masas en tándem, que permite operar en modo MS/MS para eliminar interferencias. Ao igual que se comentou no apartado de LC, aquí acontece algo similar: o triplo cuadrupolo consiste en dous cuadrupolos que actúan como filtros de masas, no medio dos cales se atopa, neste caso, un maxipolo (cuadrupolo, hexapolo ou octapolo) que se denomina cela de colisión e reacción (CRC). Os distintos modos de análise dependen por norma xeral da masa atómica dos elementos e das potenciais interferencias. Nos instrumentos clásicos dun só cuadrupolo, non se pode levar a cabo ese filtro de masa no Q1 coma nos de triplo. Nesta tese, empregouse un triplo cuadrupolo, cuxo esquema xeral é plasmado na **Figura 5.3**.

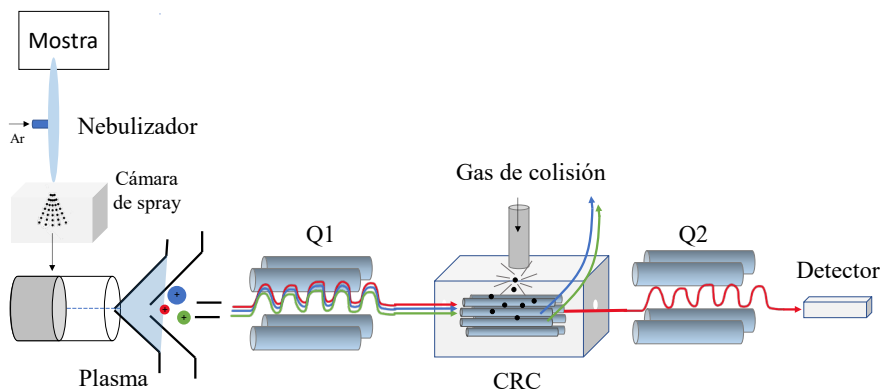


Figura 5.3. Esquema xeral dun ICP-MS de triplo cuadrupolo.

Para a determinación do contido metálico das mostras de henna e jagua empregouse ICP-MS (**Sección IV**, Capítulo 3, 3.4).

5.6. OUTRAS TÉCNICAS

Ao longo dun traballo incluído na presente tese aplicouse un enfoque multianalítico para afondar na caracterización das mostras de

tatuaxes e tinturas temporais con base vexetal (**Sección IV**, Capítulo 3, 3.3), comprendendo as técnicas complementarias que se detallan de seguido.

5.6.1. Fluorescencia de raios X (XRF)

A fluorescencia de raios X (*X-Ray Fluorescence*, XRF) é unha técnica analítica que se utiliza para determinar a composición química dunha grande variedade de mostras, entre as que se atopan sólidos, líquidos ou pos. A XRF permite identificar (información cualitativa) e tamén cuantificar ou obter información semicuantitativa dos elementos químicos (dende o Be ao U) presentes nunha mostra de maneira rápida e sen precisar practicamente pretratamentos. O valor obtido refírese ao contido total, sen ter en conta o estado químico (oxidación, enlaces e cristalinidade).

A XRF é un método de emisión atómica, na cal a irradiación incidente dun feixe de raios X primario provoca a excitación do material e a consecuente emisión de raios X secundarios ou fluorescentes con enerxías discretas características dos elementos presentes nesa mostra [175]. Este fenómeno é moi empregado para análise elemental e química, particularmente na investigación de metais, vidros, materiais cerámicos e toda clase de pigmentos [176].

5.6.2. Difracción de raios X (XRD)

A difracción de raios X (*X-Ray diffraction*, XRD) está baseada nas interferencias ópticas que se producen cando unha radiación monocromática de raios X, dispersados en ángulos específicos, atravesada unha brecha de espesor comparable á lonxitude de onda da radiación. Neste caso, as lonxitudes de onda dos raios X son da mesma orde que as distancias interatómicas dos compoñentes das redes cristalinas. Os picos de XRD xerados presentan unha intensidade que vén determinada

pola distribución dos elementos dentro da mostra. Adicionalmente, o patrón de XRD é a pegada dixital das disposicións atómicas nun determinado material.

Trátase dun método non destrutivo para a análise dunha ampla gama de materiais, cuxa aplicación directa é a identificación cualitativa da composición mineralóxica dunha mostra cristalina. Ademais, proporciona información estrutural, forma e tamaño das fases e orientacións cristalinas así como outros parámetros relacionados [177].

Nesta tese, empregáronse dúas modalidades diferentes desta técnica: a difracción de raios X en po (*X-ray powder diffraction*, XRPD) e a microdifracción de raios X (*micro-X-ray diffraction*, μ -XRD). A XRPD utilizouse para as mostras sólidas de henna e jagua, mentres que a μ -XRD se usou con aquelas mostras de tipo pasta. A principal diferenza entre elas parte do uso dun feixe moi estreito de raios X na variante de microdifracción, para efectuar medicións altamente focalizadas nunha área moi pequena. A técnica de μ -XRD emprégase xeralmente con mostras pequenas ou non homoxéneas que presentan diferentes composicións.

5.6.3. Microscopia electrónica de barrido acoplada a espectrometría de raios X de dispersión de enerxía (SEM-EDS)

A microscopia electrónica de barrido (*scanning electron microscopy*, SEM) acoplada a espectrometría de raios X de dispersión de enerxía (*energy dispersive X-ray spectrometry*, EDS) é unha técnica que permite proporcionar información cualitativa e cuantitativa sobre a composición superficial dunha mostra (identificación dos elementos e peso dos mesmos, respectivamente). O sistema SEM baséase na espectroscopia de radiación de raios X emitida cando un feixe de electróns de alta intensidade incide sobre a superficie dos materiais que se están analizando. Pola súa parte, o sistema EDS permite a

identificación cuantitativa e a xeración dun espectro de picos único para cada mostra.

Esta técnica emprégase para a análise elemental e caracterización química. Así pois, tamén permite caracterizar microscopicamente unha mostra co fin de obter coñecemento sobre a súa morfoloxía (tamaño e distribución de partículas, existencia de agregados ou grao de homoxeneidade). A SEM-EDS tamén foi empregada na análise de diversos pigmentos [178]. Adicionalmente, pode complementar a información obtida mediante XRF.

Referencias

- [1] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, Eur. Off. J. L342 (2009) 59–209.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=OJ:L:2009:342:FULL&from=EN> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [2] M. Pauwels, V. Rogiers, Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: a legally imposed challenge to science. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243(2) (2010) 260-274.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.007>.
- [3] C.L. Lemieux, A.S. Long, I.B. Lambert, S. Lundstedt, M. Tysklind, P.A. White, Cancer risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils determined using bioassay-derived levels of benzo [a] pyrene equivalents, *E Environ. Sci. Technol.* 49(3) (2015) 1797-1805. <https://doi.org/10.1021/es504466b>.
- [4] C.E. Boström, P. Gerde, A. Hanberg, B. Jernström, C. Johansson, T. Kyrklund, A. Rannug, M. Törnqvist, K. Victorin, R. Westerholm, Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air, *Environ. Health Persp.* 110 (2002) 451-488. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197>.
- [5] J.P. Amberg-Müller, U. Hauri, U. Schlegel, C. Hohl, B.J. Brüschweiler, Migration of phthalates from soft PVC packaging into shower and bath gels and assessment of consumer risk, *J. Consum. Prot. Food Saf.* 5 (2010) 429–442.
<https://doi.org/10.1007/s00003-010-0620-0>.

- [6] M.A. Kamrin, Phthalate risks, phthalate regulation, and public health: a review, *J. Toxicol. Env. Health. Part B.* 12(2) (2009) 157-174. <https://doi.org/10.1080/10937400902729226>.
- [7] M. De Falco, M. Forte, V. Laforgia, Estrogenic and anti-androgenic endocrine disrupting chemicals and their impact on the male reproductive system, *Front. Environ. Sci.* 3 (2015) 3. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00003>.
- [8] European Commission, Pesticides, (2022). https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides_en (acceso 10 Outubro, 2022).
- [9] A. Karci, I. Arslan-Alaton, M. Bekbolet, Advanced oxidation of a commercially important nonionic surfactant: Investigation of degradation products and toxicity, *J. Hazard. Mater.* 263 (2013) 275–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.052>.
- [10] P.M. Nagarnaik, B. Boulanger, Advanced oxidation of alkylphenol ethoxylates in aqueous systems, *Chemosphere.* 85 (2011) 854–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.105>.
- [11] A. Chisvert, P. Miralles, A. Salvador, Hair dyes in Cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods, in: *Anal. Cosmet. Prod.*, 2nd ed., Elsevier, 2018: pp. 159-173. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63508-2.00008-4>.
- [12] E. Guerra, M. Llompart, C. Garcia-Jares, Analysis of dyes in cosmetics: Challenges and recent developments, *Cosmetics.* 5 (3) (2018) 47. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5030047>.
- [13] P. De Ketttenis, The historic and current use of glycol ethers: A picture of change, *Toxicol. Lett.* 156 (2005) 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.076>.
- [14] R.J. Boatman, International industry initiatives to improve the glycol ether health effects knowledge base, *Toxicol. Lett.* 156 (2005) 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.08.011>.

- [15] G. Johanson, Toxicity review of ethylene glycol monomethyl ether and its acetate ester, *Crit. Rev. Toxicol.* 30 (2000) 307–345. <https://doi.org/10.1080/10408440091159220>.
- [16] R.S. Wang, K. Ohtani, M. Suda, K. Kitagawa, K. Nakayama, T. Kawamoto, T. Nakajima, Reproductive toxicity of ethylene glycol monoethyl ether in Aldh2 knockout mice, *Ind. Health.* 45 (2007) 574–578. <https://doi.org/10.2486/indhealth.45.574>.
- [17] M. Venier, G. Adami, F. Larese, G. Maina, N. Renzi, Percutaneous absorption of 5 glycol ethers through human skin in vitro, *Toxicol. In Vitro.* 18 (2004) 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.03.004>.
- [18] B. Desmedt, M. Canfyn, M. Pype, S. Baudewyns, V. Hanot, P. Courselle, J.O. De Beer, V. Rogiers, K. De Paepe, E. Deconinck, HS–GC–MS method for the analysis of fragrance allergens in complex cosmetic matrices, *Talanta.* 131 (2015) 444–451. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2014.08.006>.
- [19] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), European Commission, Opinion on Fragrance allergens in cosmetic products, 2012. <https://doi.org/10.2772/77628>.
- [20] J.D. Johansen, Fragrance contact allergy: a clinical review, *Am. J. Clin. Dermatol.* 4(11) (2003) 789–798. <https://doi.org/10.2165/00128071-200304110-00006>.
- [21] A. Chisvert, M. López-Nogueroles, P. Miralles, A. Salvador, Perfumes in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods, in: *Anal. Cosmet. Prod.*, 2nd ed., Elsevier, 2018: pp. 225–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63508-2.00010-2>.
- [22] S. Sousa, D. Pestana, G. Faria, F. Vasconcelos, C. Delerue-Matos, C. Calhau, V.F. Domingues, Method development for the determination of synthetic musks and organophosphorus pesticides

- in human adipose tissue, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 191 (2020) 113598. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113598>.
- [23] M.D. Lundov, L. Moesby, C. Zachariae, J.D. Johansen, Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy, *Contact Dermatitis*. 60 (2009) 70-78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01501.x>.
- [24] G. Alvarez-Rivera, M. Llompарт, M. Lores, C. Garcia-Jares, Preservatives in Cosmetics, in: *Anal. Cosmet. Prod.*, 2nd ed., Elsevier, 2018: pp. 175–224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63508-2.00009-6>.
- [25] J.F. Schwensen, I.R. White, J.P. Thyssen, T. Menné, J.D. Johansen, Failures in risk assessment and risk management for cosmetic preservatives in Europe and the impact on public health, *Contact Dermatitis*. 73 (2015) 133–141. <https://doi.org/10.1111/COD.12446>.
- [26] A. Pop, C. Berce, P. Bolfa, A. Nagy, C. Catoi, I.B. Dumitrescu, L. Silaghi-Dumitrescu, F. Loghin, Evaluation of the possible endocrine disruptive effect of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propyl gallate in immature female rats, *Farmacia*. 61(1) (2013) 202-211.
- [27] The European Parliament and the Council of the European Union. Commission Implementing Decision of 25 November 2013 on Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on Cosmetic Products (Text with EEA relevance). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013D0674> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [28] G. Mildau, General review of official methods of analysis of cosmetics, in: *Anal. Cosmet. Prod.*, 2nd ed., Elsevier, 2018: pp. 67-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63508-2.00004-7>.

- [29] Manual of the working group on cosmetic products (sub-group on borderline products) on the scope of application of the cosmetics Regulation (EC) No 1223/2009 (art. 2(1)(a)) Version 5.2 (2020). https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosmetic-products-specific-topics/borderline-products_en (acceso 10 Outubro, 2022).
- [30] P. Kapoor, Herbal cosmetic for skin and hair care, *Nat. Prod. Radiance*. 4 (2005) 306–312.
- [31] J. Kazandjieva, L. Grozdev, N. Tsankov, Temporary henna tattoos, *Clin. Dermatol.* 25 (2007) 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.05.013>.
- [32] C.J. Le Coz, C. Lefebvre, F. Keller, E. Grosshans, Allergic contact dermatitis caused by skin painting pseudotattooing with black henna, a mixture of henna and p-phenylenediamine and its derivatives, *Arch. Dermatol.* 136 (2000) 1515-1517. <https://doi.org/10.1001/archderm.136.12.1515>.
- [33] A.C. De Groot, Side-effects of henna and semi-permanent ‘black henna’ tattoos: A full review, *Contact Dermatitis*. 69 (2013) 1–25. <https://doi.org/10.1111/cod.12074>.
- [34] D. Marcoux, P.M. Couture-Trudel, G. Riboulet-Delmas, D. Sasseville, Sensitization para-phenylenediamine from a streetside temporary tattoo, *Pediatr. Dermatol.* 19 (2002) 498-502. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1470.2002.00218.x>.
- [35] Axencia Española do Medicamento e produtos sanitarios. <https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/cosmeticoshigiene/2021-cosmeticoshigiene/recomendaciones-de-la-aemps-sobre-los-riesgos-asociados-a-los-tatuajes-de-henna-negra/> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [36] J. Yang, K. Sakamoto, R.Y. Lochhead, H.I. Maibach, Y. Yamashita, Hair Care Cosmetics, in: *Cosmetic Science and Technology*, 1st ed., Elsevier, 2017: pp. 601-615.

- [37] J. Waton, F. Brault, E. Laveine, A putative case of allergic contact dermatitis caused by a jagua tattoo, *Contact Dermatitis*. 76 (2017) 296–321. <https://doi.org/10.1111/cod.12767>.
- [38] M. Maarouf, C. Saberian, R.J. Segal, V.Y. Shi, A new era for tattoos, with new potential complications. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 12 (2019) 37–38.
- [39] A.J. Bircher, R. Sigg, K.S. Hofmeier, U. Schlegel, U. Hauri, Allergic contact dermatitis caused by a new temporary blue-black tattoo dye- sensitization to genipin from jagua (*Genipa Americana* L.) fruit extract, *Contact Dermatitis*. 77 (2017) 374–378. <https://doi.org/10.1111/cod.12844>.
- [40] I. Vágó, Z. Győri, J. Loch, Comparison of chromium and nickel uptake of plants grown in different soils, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (5) (1996) 714–717. <https://doi.org/10.1007/s0021663540714>.
- [41] V. Kos, B. Budič, V. Hudnik, F. Lobnik, M. Zupan, Determination of heavy metal concentrations in plants exposed to different degrees of pollution using ICP-AES, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354(5) (1996) 648–52. <https://doi.org/10.1007/s0021663540648>.
- [42] F. Gosetti, B. Bolfi, E. Marengo, Identification of sulforhodamine B photodegradation products present in nonpermanent tattoos by micro liquid chromatography coupled with tandem high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (16) (2015) 4649–4659. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8667-5>.
- [43] N. Lekouch, A. Sedki, A. Nejmeddine, S. Gamon, Lead and traditional Moroccan pharmacopeia, *Sci. Total. Environ.* 280 (2001) 39-43. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00801-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00801-4).
- [44] O. Al-Dayel, J. Hefne, T. Al-Ajyan, Human exposure to heavy metals from cosmetics, *Orient. J. Chem.* 27(1) (2011) 1-11.
- [45] S. Safavi, R. Najarian, M. Rasouli-Azad, S. Masoumzadeh, A. Ghaderi, R. Eghtesadi, A narrative review of heavy metals in

- cosmetics; health risks, *Int. J. Pharm. Res.* 11(4) (2019) 182-190. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2019.11.04.031>.
- [46] Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001. On the Community Code relating to medicinal products for human use. *Eur. Off. J.* L311 (2001) 67–128. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:311:0067:0128:en:PDF> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [47] Guidance document on the demarcation between the Cosmetic Products Directive 76/768 and the Medicinal Products Directive 2001/83 as agreed between the Commission Services and the competent authorities of Member States. *Ref. Ares* 4239765 (2015). <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/13032/?locale=es> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [48] Annex XVII of the Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) and establishing a European Chemicals Agency. *Eur. Off. J.* L396 (2014) 218–520. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1907-20140410> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [49] Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, *Eur. Off. J.* L167 (2012) 1–123. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0528> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [50] The European Parliament and The Council of The European Union. Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009. On the safety of toys. *Eur. Off. J.* L170 (2009) 1–37. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/>

- HTML/?uri=CELEX:32009L0048&from=EN (acceso 10 Outubro, 2022).
- [51] Scientific Committee on Consumer Safety_Opinion on *Lawsonia inermis* (Henna) COLIPA nº C169, 19 September (2013) SCCS/1511/ 13.
https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_140.pdf (acceso 10 Outubro, 2022).
- [52] Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) and establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Eur. Off. J. L396 (2014) 218–520. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1907-20140410> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [53] M.E. Gatica-Ortega, M.A. Pastor-Nieto, J.F. Silvestre-Salvador, Allergic contact dermatitis caused by acrylates in long-lasting nail polish, *Actas Dermosifiliogr. (English Edition)* 109(6) (2018) 508-514. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2018.05.008>.
- [54] M.E. Gatica-Ortega, M.A. Pastor-Nieto, R. Gil-Redondo, E.R. Martínez-Lorenzo, C. Schöendorff-Ortega, Non-occupational allergic contact dermatitis caused by long-lasting nail polish kits for home use: ‘the tip of the iceberg’, *Contact Dermatitis*. 78(4) (2018) 261-265. <https://doi.org/10.1111/cod.12948>.
- [55] S. Silva, M. Ferreira, A.S. Oliveira, C. Magalhães, M.E. Sousa, M. Pinto, J.M. Sousa Lobo, I.F. Almeida, Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics, *Int. J. Cosmet. Sci.* 41(4) (2019) 378-386. <https://doi.org/10.1111/ics.12551>.

- [56] H. Lam, Factors enhancing adhesion of color cosmetic products to skin: The role of pigments and fillers, in: *Surface Science and Adhesion in Cosmetics*, 1st ed., Wiley, 2021: pp. 487-541. <https://doi.org/10.1002/9781119654926.ch15>.
- [57] A.B. Pawar, B. Falk, Use of advanced silicone materials in long-lasting cosmetics, in: *Surface Science and Adhesion in Cosmetics*, 1st ed., Wiley, 2021: pp.151-182. <https://doi.org/10.1002/9781119654926.ch5>.
- [58] G. Fytianos, A. Rahdar, G.Z. Kyzas, Nanomaterials in cosmetics: Recent updates, *Nanomaterials*. 10(5) (2020) 979. <https://doi.org/10.3390/nano10050979>.
- [59] R.R. Brancaccio, L.H. Brown, Y.T. Chang, J.P. Fogelman, E.A. Mafong, D.E. Cohen, Identification and quantification of para phenylenediamine in a temporary black henna tattoo, *Am. J. Contact Dermatitis*. 13 (2002) 15-18. <https://doi.org/10.1053/ajcd.2002.30466>.
- [60] P.J. Almeida, L. Borrego, E. Pulido-Melian, O. Gonzalez-Diaz, Quantification of p-phenylenediamine and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone in henna tattoos, *Contact Dermatitis*. 66 (2012) 33-37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.01992.x>.
- [61] P. Babula, R. Mikelova, D. Potesil, V. Adamb, R. Kizekb, L. Haveld, Z. Sladký, Simultaneous determination of 1,4-naftoquinone, lawsone, juglone and plumbagin by liquid chromatography with UV detection, *Biomed. Pap.* 149 (2005) 25-28. <https://doi.org/10.1002/pca.1216>.
- [62] P.G. Wang, A.J. Krynitsky, Rapid determination of para-phenylenediamine by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring in henna-containing cosmetic products, *J. Chromatogr. B*. 879 (2011) 1795-1801. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.04.030>.

- [63] C.T. Krueger, D.W. Lachenmeier, E. Kratz, G. Mildau, Rapid colorimetric analysis of para-phenylenediamine in henna-based, non-permanent tattoo color mixtures, *Cosmet. Toilet.* 126 (2011) 496-501.
- [64] M.F. Mesko, D.L.R. Novo, V.C. Costa, A.S. Henn, E.M.M. Flores, Toxic and potentially toxic elements determination in cosmetics used for make-up: A critical review, *Anal. Chim. Acta.* 1098 (2020) 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.046>.
- [65] A. Aktas Sukuroglu, D. Battal, S. Burgaz, Monitoring of lawsone, p-phenylenediamine and heavy metals in commercial temporary black henna tattoos sold in Turkey, *Contact. Dermatitis.* 76 (2017) 89–95. <https://doi.org/10.1111/cod.12702>.
- [66] S.Y. Ibrahim, M.M. Fawzi, M.G. Saad, S.M.A. Rahman, Determination of heavy metals and other toxic ingredients in henna (*Lawsonia inermis*), *J. Environ. Anal. Toxicol.* 6 (2016) 364. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000364>.
- [67] S. Kilic, M. Kilic, M. Soylak, The determination of toxic metals in some traditional cosmetic products and health risk assessment, *Biol. Trace Elem. Res.* 199 (2021) 2272–2277. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02357-8>.
- [68] K.N. Jallad, C. Espada-Jallad, Lead exposure from the use of *Lawsonia inermis* (Henna) in temporary paint-on-tattooing and hair dying, *Sci. Total Environ.* 397 (2008) 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.055>.
- [69] J. Beerling, Green formulations and ingredients, in: *Sustainability: How the cosmetics industry is greening up*, 1st ed., Wiley, 2013: pp. 197-215. <https://doi.org/10.1002/9781118676516.ch9>.
- [70] U. Klaschka, Natural personal care products-analysis of ingredient lists and legal situation, *Environ. Sci. Eur.* 28 (1) (2016) 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0076-7>.

- [71] S.W.P. Wijnhoven, J. Ezendam, A.G. Schuur, H. Van Loveren, J.G.M. Van Engelen, Allergens in consumer products, RIVM report 320025001 (2008).
<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320025001.pdf> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [72] E. Antignac, G.J. Nohynek, T. Re, J. Clouzeau, H. Toutain, Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics, *Food Chem. Toxicol.* 49(2) (2011) 324-341.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.022>.
- [73] N. Halla, I.P. Fernandes, S.A. Heleno, P. Costa, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, A.E. Rodrigues, F.R. Ferreira, M.F. Barreiro, Cosmetics preservation: a review on present strategies, *Molecules.* 23(7) (2018) 1571. <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>.
- [74] S.K. Mahesh, J. Fathima, V.G. Veena, Cosmetic Potential of Natural Products: Industrial Applications, in: *Natural Bio-Active Compounds*, Springer, 2019: pp. 215–250.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-7205-6_10.
- [75] ISO 9235:2021(en) Aromatic natural raw materials — Vocabulary.
<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en:sec:3.1> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [76] Axencia Española do Medicamento e produtos sanitarios: Guía sobre aceites esenciales en productos cosméticos.
https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/docs/Guia_Aceites_Esenciales.pdf (acceso 10 Outubro, 2022).
- [77] S. Prabhu, A. Molath, H. Choksi, S. Kumar, R. Mehra, Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases, *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ.* 6(1) (2021) 293-301.
<https://doi.org/10.22271/journalofsport.2021.v6.i1e.2236>.
- [78] D.J. de Lima Cherubim, C.V. Buzanello Martins, L. Oliveira Fariña, R.A. da Silva de Lucca, Polyphenols as natural antioxidants in

- cosmetics applications, *J. Cosmet. Dermatol.* 19(1) (2020) 33-37.
<https://doi.org/10.1111/jocd.13093>.
- [79] E. Coppo, A. Marchese, Antibacterial activity of polyphenols, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15(4) (2014) 380-390.
<https://doi.org/10.2174/138920101504140825121142>.
- [80] W. Zhu, J. Gao, The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders, *JIDSP.* 13 (2008) 20-24.
<https://doi.org/10.1038/jidsymp.2008.8>.
- [81] F. Mena, A. Mena, J. Tréton, Polyphenols against skin aging, in: *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press, 2014: pp. 819-830. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00063-3>.
- [82] AdamskaSzewczyk, G. Zgórk, Plant polyphenols in cosmetics—a review, *EJMT.* 3 (24) (2019) 1-10.
- [83] O.V. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner, M. Kerscher, Polyphenols as active ingredients for cosmetic products, *Int. J. Cosmet. Sci.* 37(5) (2015) 455-464.
<https://doi.org/10.1111/ics.12218>.
- [84] T.K.T. Do, F. Hadji-Minaglou, S. Antoniotti, X. Fernandez, Authenticity of essential oils, *TrAC Trends Anal. Chem.* 66 (2015) 146-157. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.007>.
- [85] J.B. Sharmeen, F.M. Mahomoodally, G. Zengin, F. Maggi, Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals, *Molecules.* 26(3) (2021) 666.
<https://doi.org/10.3390/molecules26030666>.
- [86] A. Sarkic, I. Stappen, Essential oils and their single compounds in cosmetics—A critical review, *Cosmetics.* 5(1) (2018) 11.
<https://doi.org/10.3390/cosmetics5010011>.

- [87] A.R. Jack, P.L. Norris, F.J. Storrs, Allergic contact dermatitis to plant extracts in cosmetics, *Semin. Cutan. Med. Surg.* 32(3) (2013) 140-146. <https://doi.org/10.12788/j.sder.0019>.
- [88] N. Lionetti, L. Rigano, Labeling of cosmetic products, *Cosmetics*. 5(1) (2018) 22. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010022>.
- [89] Commission Regulation (EU) No 655/2013 of 10 July 2013 Laying Down Common Criteria for the Justification of Claims Used in Relation to Cosmetic Products, *Eur. Off. J.* (2013) 31. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0655> (acceso 10 Outubro, 2022).
- [90] O. Tascone, C. Roy, J.-J. Filippi, U.J. Meierhenrich, Use, analysis, and regulation of pesticides in natural extracts, essential oils, concretes, and absolutes, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2013) 971–980. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7102-z>.
- [91] H. Leijds, J. Broekmans, L. van Pelt, C. Mussinan, Quantitative analysis of the 26 allergens for cosmetic labeling in fragrance raw materials and perfume oils, *J. Agric. Food Chem.* 53(14) (2005) 5487-5491. <https://doi.org/10.1021/jf048081w>.
- [92] M. Bassereau, A. Chaintreau, S. Duperrex, D. Joulain, H. Leijds, G. Loesing, N. Owen, A. Sherlock, C. Schippa, P.-J. Thorel, M. Vey, GC-MS quantification of suspected volatile allergens in fragrances. 2. Data treatment strategies and method performances, *J. Agric. Food Chem.* 55(1) (2007) 25-31. <https://doi.org/10.1021/jf062028l>.
- [93] N. Dornic, A.S. Ficheux, A.C. Roudot, Qualitative and quantitative composition of essential oils: A literature-based database on contact allergens used for safety assessment, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 80 (2016) 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.06.016>.
- [94] L.H. Wang, H.J. Liu, Determination of fragrance allergens in essential oils and evaluation of their in vitro permeation from

- essential oil formulations through cultured skin, *J. Anal. Chem.* 67(1) (2012) 64-71. <https://doi.org/10.1134/S1061934812010182>.
- [95] B. Dharmagunawardena, A. Takwale, K.J. Sanders, S. Cannan, A. Rodger, A. Ilchyshyn, Gas chromatography: an investigative tool in multiple allergies to essential oils, *Contact Dermatitis.* 47(5) (2002) 288-292. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2002.470506.x>.
- [96] J. Kaloustian, C. Mikail, E.M. Tarek, L. Abou, H. Portugal, GC-MS analysis of allergens in plant oils meant to cosmetics, *OCL.* 14(2) (2007) 110-115. <https://doi.org/10.1051/ocl.2007.0103>.
- [97] M.A. Bruusgaard-Mouritsen, J.D. Johansen, C. Zachariae, C.S. Kirkeby, L.H. Garvey, Natural ingredients in cosmetic products— A suggestion for a screening series for skin allergy, *Contact Dermatitis.* 83(4) (2020) 251-270. <https://doi.org/10.1111/cod.13550>.
- [98] M.K. Khan, L. Paniwnyk, S. Hassan, Polyphenols as natural antioxidants: sources, extraction and applications in food, cosmetics and drugs, in: *Plant Based “Green Chemistry 2.0”*, Springer, 2019: pp. 197-235.
- [99] G. Domínguez-Rodríguez, M.L. Marina, M. Plaza, Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants, *J. Chromatogr. A.* 1514 (2017) 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.066>.
- [100] I. Ranatunge, S. Adikary, P. Dasanayake, C.D. Fernando, P. Soysa, Development of a rapid and simple method to remove polyphenols from plant extracts, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2017 (2017) 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/7230145>.
- [101] O. López-Fernández, R. Domínguez, M. Pateiro, P.E.S. Munekata, G. Rocchetti, J.M. Lorenzo, Determination of polyphenols using liquid chromatography–tandem mass spectrometry technique (LC–

- MS/MS): A review, *Antioxidants*. 9(6) (2020) 479.
<https://doi.org/10.3390/antiox9060479>.
- [102] I. Pagano, L. Campone, R. Celano, A.L. Piccinelli, L. Rastrelli, Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review, *J. Chromatogr. A*. 1651 (2021) 462295.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462295>.
- [103] P. Tapia-Quirós, M.F. Montenegro-Landívar, M. Reig, X. Vecino, J.L. Cortina, J. Saurina, M. Granados, Recovery of polyphenols from agri-food by-products: The olive oil and winery industries cases, *Foods*. 11(3) (2022) 362.
<https://doi.org/10.3390/foods11030362>.
- [104] M.M. Moreira, M.F. Barroso, A. Boeykens, H. Withouck, S. Morais, C. Delerue-Matos, Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction, *Ind. Crops. Prod.* 104 (2017) 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.038>.
- [105] M. Celeiro, J.P. Lamas, R. Arcas, M. Lores, Antioxidants profiling of by-products from Eucalyptus greenboards manufacture, *Antioxidants*. 8(8) (2019) 263.
<https://doi.org/10.3390/antiox8080263>.
- [106] E. Boyaci, Á. Rodríguez-Lafuente, K. Gorynski, F. Mirnaghi, É.A. Souza-Silva, D. Hein, J. Pawliszyn, Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases, *Anal. Chim. Acta.* 873 (2015) 14–30. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2014.12.051>.
- [107] P. Anastas, N. Eghbali, Green chemistry: principles and practice, *Chem. Soc. Rev.* 39(1) (2010) 301–312.
<https://doi.org/10.1039/B918763B>.
- [108] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A*. 1221 (2012) 84–98.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.11.011>.

- [109] S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short, Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *J. Chromatogr. A.* 475 (1989) 353–361. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89689-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89689-8).
- [110] S.A. Barker, Matrix solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 115–127. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00249-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00249-1).
- [111] M. Celeiro, E. Guerra, J.P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products, *J. Chromatogr. A.* 1344 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.03.070>.
- [112] E.M. Kristenson, L. Ramos, U.A.T. Brinkman, Recent advances in matrix solid-phase dispersion, *TrAC Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96–111. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2005.05.011>.
- [113] L. Ramos, E. Ibáñez, A. Cifuentes, Matrix Solid Phase Dispersion, in: *Green Extraction Techniques Principles, Advances and Applications (Comprehensive Analytical Chemistry)*, 1st ed., Elsevier, 2017: pp. 375-402.
- [114] M. Celeiro, C. Garcia-Jares, M. Llompart, M. Lores, Recent advances in sample preparation for cosmetics in personal care products analysis, *Molecules.* 26 (2021) 4900. <https://doi.org/10.3390/molecules26164900>.
- [115] L. Sanchez-Prado, J.P. Lamas, G. Alvarez-Rivera, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Determination of suspected fragrance allergens in cosmetics by matrix solid-phase dispersion gas chromatography–mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5055–5062. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.06.013>.
- [116] M. Llompart, M. Celeiro, J.P. Lamas, L. Sanchez-Prado, M. Lores, C. Garcia-Jares, Analysis of plasticizers and synthetic musks in cosmetic and personal care products by matrix solid phase

- dispersion gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1293 (2013) 10-19.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.067>.
- [117] Y.-F. Liu, J.-L. Zhang, X.-F. Nie, P. Zhang, X.-Q. Yan, K.-F. Fu, Simultaneous determination of 11 preservatives in cosmetics and pharmaceuticals by matrix solid-phase dispersion coupled with gas chromatography, *Acta Chromatogr.* 32 (2020) 203–209.
<https://doi.org/10.1556/1326.2019.00700>.
- [118] L. Sanchez-Prado, G. Alvarez-Rivera, J.P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Analysis of multi-class preservatives in leave-on and rinse-off cosmetics by matrix solid-phase dispersion, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 3293–3304.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5412-6>.
- [119] M. Celeiro, J.P. Lamas, M. Llompart, C. Garcia-Jares, In-vial micro-matrix-solid phase dispersion for the analysis of fragrance allergens, preservatives, plasticizers, and musks in cosmetics, *Cosmetics.* 1 (2014) 171-201.
<https://doi.org/10.3390/cosmetics1030171>.
- [120] E. Guerra, M. Celeiro, J.P. Lamas, M. Llompart, C. Garcia-Jares, Determination of dyes in cosmetic products by micro-matrix solid phase dispersion and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1415 (2015) 27–37.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.08.054>.
- [121] G. Alvarez-Rivera, M. Llompart, C. Garcia-Jares, M. Lores, Identification of unwanted photoproducts of cosmetic preservatives in personal care products under ultraviolet-light using solid-phase microextraction and micro-matrix solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A.* 1390 (2015) 1–12.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.02.056>.
- [122] E. Guerra, M. Llompart, C. Garcia-Jares, Miniaturized matrix solid-phase dispersion followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of synthetic dyes in cosmetics

- and foodstuffs used or consumed by children, *J. Chromatogr. A*, 1529 (2017) 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.063>.
- [123] M. Celeiro, L. Vazquez, J.P. Lamas, M. Vila, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Miniaturized matrix solid-phase dispersion for the analysis of ultraviolet filters and other cosmetic ingredients in personal care products, *Separations*. 6 (2019) 30. <https://doi.org/10.3390/separations6020030>.
- [124] M. Chen, H. Bai, J. Zhai, X. Meng, X. Guo, C. Wang, P. Wang, H. Lei, Z. Niu, Q. Ma, Comprehensive screening of 63 coloring agents in cosmetics using matrix solid-phase dispersion and ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1590 (2019) 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.003>.
- [125] E. Yildiz, H. Cabuk, Miniaturized matrix solid-phase dispersion coupled with supramolecular solvent-based microextraction for the determination of paraben preservatives in cream samples, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 2750–2758. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800235>.
- [126] M.D. Luque de Castro, F. Priego Capote, *Analytical applications of ultrasound*, 1st ed., Elsevier, 2007.
- [127] Y. Picó, Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 84–99. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2012.12.005>.
- [128] C. Wen, J. Zhang, H. Zhang, C.S. Dzah, M. Zandile, Y. Duan, H. Ma, X. Luo, Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review, *Ultrason. Sonochem.* 48 (2018) 538–549. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.07.018>.
- [129] M. Li, S. Luo, X. Di, Y. Cui, Ultrasound-assisted extraction coupling to high performance liquid chromatography for enantiomerically quantitative analysis of two preservatives in

- cosmetics and the potentially cytotoxic study, *Microchem. J.* 172 (2022) 106937. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106937>.
- [130] X. Meng, Q. Ma, H. Bai, Z. Wang, C. Han, C. Wang, Simultaneous separation and determination of 15 organic UV filters in sunscreen cosmetics by HPLC-ESI-MS/MS, *Int. J. Cosmet. Sci.* 39 (2017) 386–392. <https://doi.org/10.1111/ics.12387>.
- [131] P. Miralles, J.L. Benedé, A. Mata-Martín, A. Chisvert, A. Salvador, A green and rapid analytical method for the determination of hydroxyethoxyphenyl butanone in cosmetic products by liquid chromatography, *Cosmetics*. 5 (2018) 44. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5030044>.
- [132] E.A. Myers, T.H. Pritchett, T.A. Brettell, Determination of preservatives in cosmetics and personal care products by LC-MS-MS, *LcGc N. Am.* 33 (2015) 16–22.
- [133] I. Baranowska, I. Wojciechowska, The determination of preservatives in cosmetics and environmental waters by HPLC, *Pol. J. Environ. Stud.* 22(6) (2013) 1609–1625.
- [134] S. Both, F. Chemat, J. Strube, Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2013.11.005>.
- [135] F. Chemat, N. Rombaut, A.G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrason. Sonochem.* 34 (2017) 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.
- [136] M.D. Esclapez, J.V. García-Pérez, A. Mulet, J.A. Cárcel, Ultrasound-assisted extraction of natural products, *Food Eng. Rev.* 3(2) (2011) 108-120. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>.

- [137] N. Medina-Torres, T. Ayora-Talavera, H. Espinosa-Andrews, A. Sánchez-Contreras, N. Pacheco, Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources, *Agronomy*. 7(3) (2017) 47.
<https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>.
- [138] I.M. Yusoff, Z.M. Taher, Z. Rahmat, L.S. Chua, A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins, *Food Res. Int.* 157 (2022) 111268.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>.
- [139] P.C. Frohlich, K.A. Santos, S.D.M. Hasan, E. da Silva, Evaluation of the ethanolic ultrasound-assisted extraction from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves and chemical characterization of the extracts, *Food Chem.* 373 (2022) 131351.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131351>.
- [140] C.L. Arthur, J. Pawliszy, Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [141] H. Prosen, L. Zupančič-Kralj, Solid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 272–282.
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00109-5).
- [142] J. Pawliszyn, Theory of Solid-Phase Microextraction, in: *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Elsevier, 2012: pp. 13–59.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00002-4>.
- [143] M. Vila, M. Celeiro, J.P. Lamas, C. Garcia-Jares, T. Dagnac, M. Llompart, Simultaneous in-vial acetylation solid-phase microextraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of multiclass organic UV filters in water, *J. Hazard. Mater.* 323 (2017) 45–55.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.06.056>.

- [144] M. Llompart, M. Celeiro, C. García-Jares, T. Dagnac, Environmental applications of solid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 1–12.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.12.020>.
- [145] G. Alvarez-Rivera, M. Vila, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Development of a multi-preservative method based on solid-phase microextraction–gas chromatography–tandem mass spectrometry for cosmetic analysis, *J. Chromatogr. A.* 1339 (2014) 13–25. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.02.075>.
- [146] R. Divisova, E. Vitova, P. Divis, J. Zemanova, J. Omelkova, Validation of SPME-GC-FID method for determination of fragrance allergens in selected cosmetic products, *Acta Chromatogr.* 27 (2015) 509–523.
<https://doi.org/10.1556/achrom.27.2015.3.8>.
- [147] X. Hou, L. Wang, X. Tang, C. Xiong, Y. Guo, X. Liu, Application of a beta-cyclodextrin/graphene oxide-modified fiber for solid-phase microextraction of six fragrance allergens in personal products, *Analyst.* 140 (2015) 6727–6735.
<https://doi.org/10.1039/C5AN01030F>.
- [148] G. Romanik, E. Gilgenast, A. Przyjazny, M. Kamiński, Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70(2) (2017) 253–261.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.09.012>.
- [149] J. Czerwiński, B. Zygmunt, J. Namieśnik, Head-space solid phase microextraction for the GC-MS analysis of terpenoids in herb based formulations, *Fresenius J. Anal. Chem.* 356(1) (1996) 80–83.
<https://doi.org/10.1007/s0021663560080>.
- [150] S. Mildner-Szkudlarz, H.H. Jeleń, R. Zawirska-Wojtasiak, E. Wąsowicz, Application of headspace—solid phase microextraction and multivariate analysis for plant oils differentiation, *Food Chem.* 83(4) (2003) 515–522.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00147-X).

- [151] J. Richter, I. Schellenberg, Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 387(6) (2007) 2207-2217. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1045-6>.
- [152] A.L. Dawidowicz, J. Szewczyk, M.P. Dybowski, Modified application of HS-SPME for quality evaluation of essential oil plant materials, *Talanta*. 146 (2016) 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.043>.
- [153] W.M. Coleman III, B.M. Lawrence, A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil. *Flavour Fragr. J.* 12(1) (1998) 1-8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199701\)12:1<1::AID-FFJ603>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199701)12:1<1::AID-FFJ603>3.0.CO;2-L).
- [154] J. Fu, J. Zhao, Y. Zhu, J. Tang, Rapid analysis of the essential oil components in dried lavender by magnetic microsphere-assisted microwave distillation coupled with HS-SPME followed by GC-MS, *Food Anal. Methods*. 10(7) (2017) 2373-2382. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0790-1>.
- [155] A. Papadopoulos, N. Assimomytis, A. Varvaresou, Sample preparation of cosmetic products for the determination of heavy metals, *Cosmetics*. 9(1) (2022) 21. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9010021>.
- [156] M. Sajid, J. Płotka-Wasyłka, “Green” nature of the process of derivatization in analytical sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 16–31. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.01.005>.
- [157] F. Orata, Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, in: *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, InTech, 2012, pp. 83-108.

- [158] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th ed., Cengage Learning, 2014.
- [159] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 7th ed., Cengage Learning, 2018.
- [160] L. Nováková, D. Solichová, P. Solich, Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2433–2443. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200600147>.
- [161] G. Giorgi, Mass Spectrometry and High Resolution Mass Spectrometry: An Overview, in: J.H. Banoub, R.M. Caprioli (Eds.), *Mol. Technol. Detect. Chem. Biol. Agents*, NATO Scien, Springer, 2016: pp. 31–34. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1113-3>.
- [162] H.P. Nguyen, K.A. Schug, The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1465–1480. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200700630>.
- [163] G. Alvarez-Rivera, D. Ballesteros-Vivas, F. Parada-Alfonso, E. Ibañez, A. Cifuentes, Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products, *Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.002>.
- [164] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965).
- [165] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [166] Bajalan, M. Mohammadi, M. Alaei, A.G. Pirbalouti, Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of extracts from

- different populations of lavandin, *Ind. Crops Prod.* 87 (2016) 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.059>.
- [167] N. Koczka, É. Stefanovits-Bányai, A. Ombódi, Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some *Rosa* species, *Medicines*. 5(3) (2018) 84. <https://doi.org/10.3390/medicines5030084>.
- [168] S. Sabanoglu, A. Gökblut, M. Altun, Characterization of phenolic compounds, total phenolic content and antioxidant activity of three *Achillea* species, *J. Res. Pharm.* 23(3) (2019). <https://doi.org/10.12991/jrp.2019.164>.
- [169] M. Castrica, R. Rebucci, C. Giromini, M. Tretola, D. Cattaneo, A. Baldi, Total phenolic content and antioxidant capacity of agri-food waste and by-products, *Ital. J. Anim. Sci.* 18(1) (2019) 336-341. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1529544>.
- [170] N. Babbar, H.S. Oberoi, D.S. Uppal, R.T. Patil, Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues, *Food Res. Int.* 44(1) (2011) 391-396. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.001>.
- [171] S. Vijayalaxmi, S.K. Jayalakshmi, K. Sreeramulu, Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties, *J. Food Sci. Technol.* 52(5) (2015) 2761-2769. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1295-9>.
- [172] B. Matthäus, Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds, *J. Agric. Food Chem.* 50(12) (2002) 3444-3452. <https://doi.org/10.1021/jf011440s>.
- [173] R. Thomas, *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*, 2nd ed., CRC press, 2008. <https://doi.org/10.1201/9781420067873>.
- [174] S.C. Wilschefski, M.R. Baxter, Inductively coupled plasma mass spectrometry: introduction to analytical aspects, *Clin. Biochem.*

- Rev. 40(3) (2019) 115-133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>.
- [175] B. Beckhoff, B. Kanngießer, N. Langhoff, R. Wedell, H. Wolff, *Handbook of practical X-ray fluorescence analysis*, Springer, 2007.
- [176] B. Hochleitner, V. Desnica, M. Mantler, M. Schreiner, Historical pigments: a collection analyzed with X-ray diffraction analysis and X-ray fluorescence analysis in order to create a database, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 58(4) (2003) 641-649. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00280-X).
- [177] A.A. Bunaciu, E.G. UdrişTioiu, H.Y. Aboul-Enein, X-ray diffraction: instrumentation and applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 45(4) (2015) 289-299. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>.
- [178] J. Pérez-Arantegui, Not only wall paintings—pigments for cosmetics, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 13(11) (2021) 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12520-021-01399-w>.

III. METODOLOXÍA

As metodoloxías utilizadas ao longo desta tese para a etapa de preparación da mostra baseáronse en procedementos que fosen, na medida do posible, sinxelos, rápidos, de baixo custo, miniaturizados, amigables co medio ambiente e con posibilidade de aplicar en calquera laboratorio.

Algunhas técnicas seguiron a tendencia da mínima preparación de mostra recorrendo a dilucións simples, axudadas por vórtex ou ultrasóns, para garantir así a completa disolución das mostras.

Para a determinación de ingredientes en produtos cosméticos xerais utilizouse a extracción asistida por ultrasóns (UAE) e a microdispersión da matriz en fase sólida (μ -MSPD). En canto ás aplicacións de cosméticos considerados *extremos* ou fronteirizos, ademais da UAE tamén se empregou a súa variante con soporte (*sup*-UAE) para os aplicadores destes. A microextracción en fase sólida (SPME) foi usada para a caracterización de aceites esenciais e extractos naturais, e a UAE para a investigación do perfil polifenólico de extractos obtidos a partir da especie *Filipendula vulgaris* cultivada en Galiza.

Por outra banda, naqueles casos nos que a análise o requiría, empregouse a dixestión ácida como pretratamento da mostra.

De maneira xeral, a determinación instrumental foi levada a cabo empregando cromatografía acoplada a espectrometría de masas (MS). Utilizouse cromatografía de gases (GC) seguida de MS e cromatografía de líquidos (LC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Tamén se requiriu o uso de LC de alta eficacia (HPLC) con detector de rede de diodos (DAD) para o estudo de compoñentes activos; ou LC de ultra alta eficacia (UHPLC) seguida de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) empregando un cuadrupolo-tempo de voo (QTOF) para realizar análises tanto obxectivo (*target*) coma non dirixidas (*non-target*).

Respecto á parte de tatuaxes e tinturas temporais con base natural empregouse MS con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) para determinar o contido metálico. E para a caracterización química e mineralóxica destas mostras tamén se elixiron técnicas como difracción de raios X (XRD), englobando as variantes de microdifracción (μ -XRD) ou en po (XRPD), fluorescencia de raios X (XRF) ou microscopia electrónica de barrido acoplada a espectrometría por dispersión de enerxía de raios X (SEM-EDS).

Ademais, o contido fenólico total (TPC) e a actividade antioxidante (AA) dos extractos naturais foron medidos empregando un espectrofotómetro de absorbancia ultravioleta-visible (UV-Vis) cun lector de microplacas.

IV. RESULTADOS E DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE INGREDIENTES EN COSMÉTICOS

A ampla gama e complexidade das formulacións cosméticas dispoñibles actualmente no mercado, así como a potencial presenza de impurezas procedentes das materias primas ou do proceso de fabricación, supoñen grandes retos desde o punto de vista analítico. Ademais, para certos compostos o seu contido máximo permitido depende do tipo de cosmético e da zona de aplicación. A análise e control destes produtos é obrigatoria para garantir a súa calidade e tamén a seguridade e saúde dos consumidores.

Neste capítulo recompílanse dous traballos diferentes relativos á análise de ingredientes en formulacións cosméticas.

No primeiro estudo, validouse unha estratexia multi-obxectivo baseada na preparación de mostra mediante μ -MSPD seguida da determinación analítica empregando GC-MS ou LC-MS/MS. Estudouse un gran número de familias de compostos non desexados nos cosméticos de permanencia (*leave-on*) ou de aclarado (*rinse-off*).

En canto ao segundo traballo presentado, desenvólvense dúas metodoloxías verdes baseadas en UAE e μ -MSPD seguidas de análise por GC-MS para a determinación simultánea de 17 glicois e os seus éteres e acetatos en cosméticos, de novo, tanto de permanencia como de aclarado.

A continuación, amósanse os traballos publicados.

1.1.

Multi-target strategy to uncover unexpected compounds in rinse-off and leave-on cosmetics

Maria Celeiro, Laura Rubio, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

Molecules, 26(9) (2021), 2504

ISSN: 1420-3049, MDPI

DOI: 10.3390/molecules26092504



1.2.

Miniaturized sample preparation methods to simultaneously determine the levels of glycols, glycol ethers and their acetates in cosmetics

Maria Celeiro, Laura Rubio, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

Cosmetics, 8(4) (2021), 102

ISSN: 2079-9284, MDPI

DOI: 10.3390/cosmetics8040102



CAPÍTULO 2. ANÁLISE DE COSMÉTICOS *EXTREMOS* E PRODUTOS *BORDERLINE*

Outro dos grandes retos asociados ao control regulador dos produtos cosméticos ten que ver cos cosméticos de novo formato e con aqueles considerados produtos fronteirizos ou *borderline*. Ante a demanda de cosméticos de novo formato, xorden produtos innovadores con características que poden ser consideradas extremas (longa duración, resistentes á auga, funcións prolongadoras ou rizadoras etc.). Ademais, os produtos contan con dispositivos de aplicación que poden cederlle ao cosmético substancias non desexadas. Como se comenta ao longo do apartado 2.4 da **Sección II**, moitas destas formulacións comerciais carecen dunha etiquetaxe correcta pero deben ser seguras de acordo coa normativa vixente no marco da UE. Desta maneira, aproximacións analíticas diferentes son precisas tanto para coñecer a súa composición como para avaliar o grao de cumprimento coa lexislación.

No estudo presentado de seguido, propónse unha metodoloxía para o control analítico simultáneo de 70 ingredientes en formulacións cosméticas que responden a características extremas ou outras consideradas *borderline*. Para este fin, optimizáronse estratexias rápidas e sinxelas de UAE así como unha alternativa (*Sup-UAE*) para estudar a posible transferencia de compoñentes dos aplicadores de plástico aos propios cosméticos. En ambos casos a análise cromatográfica levouse a cabo mediante GC-MS.

2.1.

Extreme cosmetics and borderline products: an analytical-based survey of European regulation compliance

Marta Lores, Maria Celeiro, Laura Rubio, Maria Llompart, Carmen Garcia-Jares

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410 (2018), 7085

ISSN: 1618-2642, Springer

DOI: 10.1007/s00216-018-1312-3



CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE TATUAXES E TINTURAS CAPILARES TEMPORAIS

As tatuaxes e tinturas capilares temporais con base natural, como os típicos produtos de henna ou as recentes tatuaxes de jagua, inclúense no grupo de produtos *borderline*. O uso crecente destas alternativas, a dispoñibilidade de compra en liña, a falta de información sobre a composición na etiquetaxe así como dunha regulación específica, fan que a súa seguridade sexa moi cuestionable e máis aínda se os nenos poden ser usuarios destes produtos. Desta maneira, resulta relevante a caracterización destas mostras inexploradas para proporcionar coñecemento, controlar os seus ingredientes e contribuír ao posible desenvolvemento de estándares de seguridade na fabricación e na regulación.

Catro traballos diferentes relacionados coa caracterización de tinturas e tatuaxes temporais e naturais de jagua e henna inclúense neste capítulo.

Na primeira publicación, tras a dilución axeitada, empregouse HPLC-DAD para monitorizar os ingredientes activos de henna e jagua en mostras de tatuaxes temporais e verificar así a súa orixe natural. Ademais, a presenza do alérxeno PPD foi testada mediante UHPLC-QTOF-HRMS.

No segundo traballo realizáronse análises obxectivo e non dirixida (*target* e *non-target*) mediante UHPLC-QTOF-HRMS para coñecer a composición de produtos temporais de tatuaxes de henna e jagua e tinturas capilares de henna. A manipulación e o tratamento das mostras foron mínimos para analizar os pigmentos naturais de xeito similar a como se comercializan, mantendo a integridade das mostras na medida do posible.

Os últimos dous traballos están relacionados co obxectivo de ir un paso máis aló na procura dunha caracterización global das mostras temporais consideradas na segunda publicación. Mentres o primeiro envolve un enfoque multianalítico para obter información da

composición mineralóxica mediante as técnicas h-XRF, XRD e SEM-EDS; no segundo traballo aplícase unha metodoloxía ICP-MS para avaliar o contido metálico. Ademais, tamén se discuten os resultados obtidos en función da vixente regulación europea de cosméticos.

Os tres primeiros estudos foron publicados mentres que o traballo de ICP-MS atópase baixo revisión. Todos eles se presentan a continuación.

3.1.

Monitoring of natural pigments in henna and jagua tattoos for fake detection

Laura Rubio, Marta Lores, Carmen Garcia-Jares

Cosmetics, 7(4) (2020), 74

ISSN: 2079-9284, MDPI

DOI: 10.3390/cosmetics7040074



3.2.

High-resolution mass spectrometry for the comprehensive characterization of plant pigment-based tattoos and dyes formulations

Laura Rubio, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

Cosmetics, 8(2) (2021), 55

ISSN: 2079-9284, MDPI

DOI: 10.3390/cosmetics8020055



3.3.

Understanding the chemical and mineralogical composition of commercial henna and jagua tattoos and dyes – a multi-analytical approach

Laura Rubio, Mafalda Costa, Pedro Barrulas, Marta Lores, Carmen Garcia-Jares, Cristina Barrocas Dias

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 414 (2022), 6233-6246

ISSN: 1618-2642, Springer

DOI: 10.1007/s00216-022-04194-1



3.4.

The chemistry behind the body art: Unveiling the elemental profile and heavy metal content of natural tattoos and dyes by ICP-MS

Laura Rubio, Pedro Barrulas, Mafalda Costa, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores, Cristina Barrocas Dias

RSC Advances

Under review

The chemistry behind the body art: Unveiling the elemental profile and heavy metal content of natural tattoos and dyes by ICP-MS

L. Rubio^{1,2}, P. Barrulas³, M. Costa³, C. Garcia-Jares^{1,2}, M. Lores², C. Barrocas-Dias³

¹CRETUS, ²Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions (LIDSA), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain.

³HERCULES Laboratory, University of Évora, Palácio do Vimioso, Largo Marquês de Marialva 8, 7000-809 Évora, Portugal.

⁴Chemistry and Biochemistry Department, School of Sciences and Technology, Rua Romão Ramalho, 59, 7000-671 Évora, Portugal.

ABSTRACT

Temporary tattoos and dyes are increasing popularity as an alternative to permanent ones. However, knowledge on its elementary composition is scarce and, this scientific gap can potentially make them a source of heavy metal exposure on humans. The present research aimed to explore the possibility of using the inorganic chemical signature to characterize natural pigments-based products and to evaluate the heavy metal content in jagua temporary tattoos and henna temporary hair dyes and tattoos. Thirty-four different samples of commercial products were analyzed for the presence and quantity of eleven trace elements (Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Ba, and Pb) by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The overall mean concentrations varied between 0.02 and 973.53 $\mu\text{g g}^{-1}$ in solid samples or 0.01-1878.37 $\mu\text{g g}^{-1}$ for paste ones, wherein potential fake products were uncovered. None of the 34 samples considered comply with the current European Cosmetics Regulation. Samples were differentiated according to their Cr, Zn, Ba, and Pb content. The overall results revealed highly variable levels in the investigated samples, which leads us to suggest detailed quality controls of these materials, due the fact that their continued use can origin potential threat to human health.

Keywords: heavy metals, trace elemental analysis, henna, jagua, temporary tattoos, hair dye, cosmetics, ICP-MS, multi-element analysis.

1. Introduction

Personal care products and facial cosmetics are one of the main pillars of daily consumption, involving a high degree of exposure among the population. Direct application of cosmetics on human hair or skin makes the society vulnerable to a wide variety of chemical compounds. Despite the protecting function of the skin, these substances may produce local effects such as irritation, sensitization, or allergy. Among the hazardous substances contained in cosmetics, such as allergenic fragrances, aromatic amines, or phthalates, heavy metals are widespread in color makeup products [1,2].

Henna is a typical example of a traditional cosmetic used in different parts of the world since ancient times. In the recent decades, its use as temporary tattoos or hair dyes has become popular as well as other natural dyes that have emerged such as jagua. Henna is a natural pigment derived from dried and crushed leaves of the *Lawsonia inermis* plant (from *Lythraceae* family), that contains lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) as the bioactive compound, which is responsible for the typical red-brown coloration [3]. Jagua is a natural colorant extracted from *Genipa americana* L. plant (from *Rubiaceae* family) and contains geniposide and genipin as active ingredients [4].

The safety of henna and its main active ingredient has been evaluated in specific hair dye formulations [5] but no similar assessment has been performed for henna temporary tattoos. Simultaneously, although their allergenic potential has been demonstrated [3,6], the regulatory consideration of jagua temporary tattoos has not yet been approached. Both types of temporary tattoos can be considered as new-format cosmetics or *borderline* products from the point of view of European regulations [7]. According to the guidelines of the Borderline Products Manual, they should simultaneously comply with the Cosmetics Regulation [8] and the Toys Directive [9]. However, the reality is quite

different: the chemical composition of these body-decorating products is diverse, most of them are not correctly or fully labelled, do not have proper regulations, strict specific legislation, implemented procedures, or any legal market control [10,11].

The final chemical composition of these natural pigments can be severely impacted by natural and anthropogenic factors but also through plants post-processing. Plants used to produce henna and jagua pigments may be grown in contaminated areas, and the derived products can be mixed with other plant extracts or materials. Additional chemicals such as synthetic dyes, solvents, or metallic salts may also be added to alter the color and make it more intense. Consequently, marketed products can contain relatively significant amounts of heavy metals [12] present in the ingredients or unintentionally introduced during the different steps of preparation. In this sense, the European cosmetics legislation [8] lists the metals allowed or prohibited as ingredients throughout its annexes, as well as the technically unavoidable metal impurity levels that come primarily from colorants. To accurately evaluate the heavy metal content in henna products, electrothermal or flame atomic absorption spectrometry (ETAAS or FAAS, [12-18]) and inductively coupled plasma optical or atomic emission spectroscopy (ICP-OES or ICP-AES, [19-22]) have been used in previous studies. It is important to mention that most of these works are exclusively focused on Pb or trace amounts of Cd, Ni, or Co in order to evaluate possible contaminations of these metals without the intention to characterize the cosmetic products.

However, among the various techniques suggested for heavy metal analysis in cosmetic products, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is strongly recommended [23-26] because it is a highly accurate, precise, and sensitive analytical technique, allowing the measurement of multi-elemental composition at trace levels in a single analysis [27, 28]. There are some studies using ICP-MS approach to analyze trace metal contaminations in cosmetics, including henna samples [29-34]. Their results will be compared with those obtained in our study. However, given the lack of information on these decorative cosmetic products, the purpose is to go further than an analysis of

certain metals, trying to go as far as characterization. In addition, innovative jagua products have not yet been included in any published work, therefore here we present and describe the first paper where ICP-MS have been applied to this type of samples.

Keeping in mind the increasing use of natural pigments and their possible side effects and health impacts, the present research aims to investigate the metal composition of hair dye and temporary tattoo samples, estimate the levels of some trace metals, and explore the possibility of using the elemental composition to characterize this kind of samples. The present study will contribute to the existing knowledge by providing an informative overview of the heavy metal contents in this type of products, as well as a discussion based on the literature of the potential risks associated with their exposure and potential health impacts to ensure consumer safety. Acid digestion followed by ICP-MS was the methodology approach used for the analysis of 11 trace elements in 34 henna and jagua commercial samples included in this study.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were used as received. Nitric acid (HNO₃, Suprapur® grade 65% (w/v), Merck®) was used both for digestion and for standard solution preparation. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 30% (w/v) OPTIMA grade, Fluka Chemicals) and hydrochloric acid (HCl, 37% (w/v) OPTIMA grade, Fluka Chemicals) were also used on the digestion procedures. For sample dilution, ultrapure water (18.2 MΩ.cm quality) obtained from a Milli-Q Integral 3 system (Millipore, Merck, Darmstadt, Germany) was used. ICP-MS tuning solution was obtained by Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) and it was employed for ICP-MS instrument optimization. Three calibration standards supplied by High-Purity Standards® (Charleston, SC, USA) were used for standard addition calibration: two standard solutions (solution A and B, ICP-MS-68B-A and ICP-MS-68B-B, respectively) were employed. A third solution (ICP-MS-68B-C) containing Ru, Rh,

and Ir, was used as internal standard solution for drift monitoring during analysis.

To avoid sample contamination by any traces of metal, the digestion teflon beakers used were first soaked overnight in 5% (v/v) HNO₃ and then soaked in distilled water for another 24 hours. They were then rinsed thoroughly with ultrapure water, completely dried in the oven at 50 °C and stored until use.

2.2. Samples

A total of 34 samples were acquired comprising henna tattoos (17, HT), jagua tattoos (6, JT), henna hair dyeing samples (7, HD) and henna samples for both purposes (3, HTD). One plant-based tattoo (HPT) sample of unknown origin and composition was also included and analyzed as another jagua. Henna samples were purchased at through a well-known site available to anyone on the Internet (Amazon, September 2020-February 2021) from different sellers and at a very inexpensive price, with the reception of two that were obtained from a local store in Morocco (HT-13 and HT-14). Jagua samples, all those that were conveniently available at the time of acquisition were also purchased online. Table 1 details the characteristics of the samples included in this study.

Samples were divided into two groups according to their physical state: solid (11) and paste (23) and were correlatively named. Paste samples included 17 hennas, five jagua and HPT; solid samples included 10 hennas and one jagua. Regarding the color of the samples, the paste hennas presented a greater range of tonalities from more common colors to more vivid hues. However, all other hennas were greenish powders. Finally, all the jaguas and the HPT sample were black. Most samples were not labelled, as happened with paste hennas or HPT, being marketed without information labels indicating their composition. Some samples report on their labels the presence of natural extracts as well as other ingredients allowed in cosmetics as

Table 1. Details of the analyzed samples: type, color, composition information, and other remarkable comments on the labels. HT: Henna Tattoo; HD: Henna Dye; HTD: Henna Tattoo-Dye; JT: Jagua Tattoo; HPT: Herbaceous Plant Tattoo.

Physical state	Sample code	Color	Labeled content	Other additional comments
Solid	HD-1		Henna plant powder (<i>Lawsonia inermis</i>), <i>Juglans regia</i> , <i>Cassia obovata</i>	
	HD-2		<i>Indigofera tinctoria</i> , <i>Lawsonia inermis</i>	
	HD-3		<i>Indigofera tinctoria</i> , ferrous sulfate, <i>Haematoxylon campechianum</i> , <i>Cassia obovata</i>	Green product, free of metal salts
	HD-4		<i>Cassia obovata</i> , <i>Lawsonia inermis</i> , sodium picramate	
	HD-5		<i>Lawsonia inermis</i>	
	HD-6	Greenish	<i>Cassia obovata</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Chamomilla recutita</i>	
	HD-7		<i>Lawsonia inermis</i> (henna) leaf powder, Indian gooseberry (Amla), Soapnut (Ritha), <i>Acacia concina</i> (Shikakai), <i>Bacopa monnieri</i> (Brahmi), False daisy (Bhringraj)	100% natural and pure, no dyes, does not contain heavy metals and other harmful compounds, Indian origin
	HTD-1		<i>Lawsonia inermis</i>	100% natural and pure, no added dyes, Marrakech origin
	HTD-2		Fresh henna leaves	100 % pure and natural
	HTD-3		Henna and Indigo	Non-permanent, 100% natural
	JT-4	Black	<i>Genipa americana</i> , sugar, xanthan gum	
	HT-1	Black		
	HT-2	Red		
	HT-3	White		
HT-4	Orange			
HT-5	Pink			
HT-6	Reddish			
HT-7	Green			
HT-8	Blue			
HT-9	Violet			
HT-10	Black			
HT-11	Brown			
HT-12	Red			
HT-13	Black			
HT-14	Red			
HT-15	Black			
HT-16	Brown			
HT-17	Blue			
JT-1	Black		<i>Genipa americana</i> fruit juice, xanthan gum, potassium sorbate, <i>Lavandula angustifolia</i> flower oil	
JT-2	Black		<i>Genipa americana</i> , xanthan gum, potassium sorbate	
JT-3	Black		<i>Genipa americana</i> fruit extract, xanthan, <i>Lavandula angustifolia</i> herb oil, potassium sorbate	100% Natural
JT-5	Dark blue/black		<i>Genipa</i> juice, hazelnut extract, pure green plant extract	
JT-6	Dark blue/black		Inorganic plan toner (28%)	Safe and natural, without toxic chemicals
HPT	Black		None	Vegetable dye

preservatives, such as potassium sorbate, or state that they do not contain metallic salts or heavy metals.

All samples were stored at room temperature under non-moisture conditions and kept in their original containers protected from light until the analysis.

2.3. Sample preparation

Prior to the complete sample digestion procedure, samples were submitted to a pre-digestion step due to their high organic content. Two independent sample preparation and digestion procedures (A for solid samples and B for paste ones) were established in this work, in order to determine the concentrations of 11 trace elements (Ba, Pb, Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, and As). Figure 1 provides a general picture of the complete digestion process while Figure 2 shows the different digestion procedures according to the sample type.

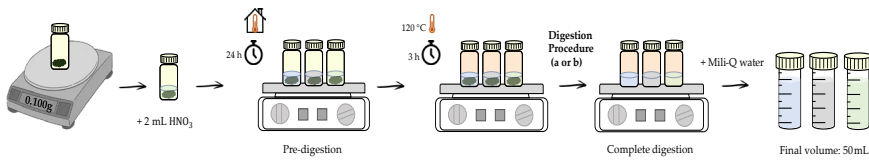


Figure 1. General digestion process.

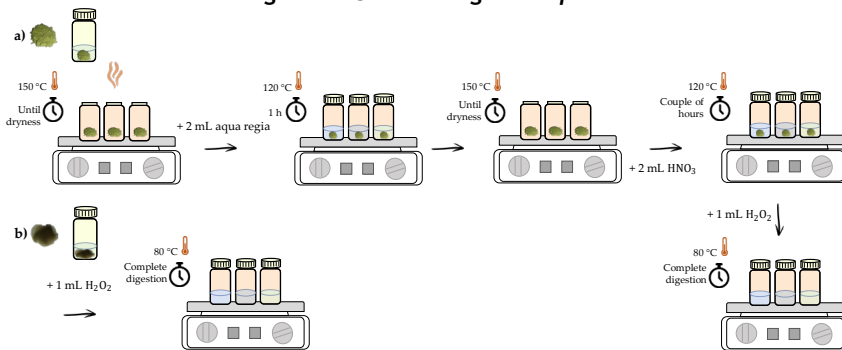


Figure 2. Schematic digestion procedures according to the type of sample. a) Solid samples. b) Paste samples.

Briefly, in both procedures, approximately 0.1 g of each sample were accurately weighted in dry and clean PFA (perfluoroalkoxy) Savillex® beakers and exposed to a pre-digestion step with 2 mL of concentrated HNO₃ at room temperature for 24 h. After the pre-digestion period, samples were digested in closed beakers over a hotplate at 120 °C for 3 h (during this time the digestion could be monitored through the formation of an orange atmosphere). Subsequently, for the digestion method A, all samples were evaporated until dryness over a hotplate at 150 °C, followed by cooling and addition of 2 mL of aqua regia freshly prepared (HNO₃: HCl, 1:3 v/v). The second digestion step took place over a hotplate at 120 °C for 1 h. Samples were evaporated again and 2 mL of concentrated HNO₃ were added. The third digestion step was then started by heating up the samples at 120 °C for a couple of hours. This step was completed through addition, at room temperature, of 1 mL of H₂O₂. However, for the method B only 1 mL of H₂O₂ was added to all samples at room temperature. In both cases, they are then placed on the hotplate at 80 °C. According to safety rules in chemical laboratory, this procedure was carried out in a fume hood. When digestion was complete (colorless samples), samples were cooled, transferred to PFA volumetric flasks, and fulfilled with Milli-Q water up to 50 mL, yielding a final matrix of 2% HNO₃ for analysis. Two blank control solutions were prepared and analyzed following the same digestions procedures for solid and paste samples, respectively. Digested samples and blanks were stored and kept at 4 °C until the analysis.

2.4. ICP-MS analysis

Multi-elemental quantification was performed using an Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS instrument (Agilent Technologies, Japan), equipped with a MicroMist nebulizer and a quartz spray chamber. Parameters and operational conditions are provided in Table 2.

In accordance with the analytes of interest, the collision/reaction cell was in “He mode”, “O₂ mode” and “no-gas mode”. Prior to the analysis,

the equipment was calibrated with a tuning solution containing 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ each of Ce, Co, Li, Tl, and Y in a matrix of 2% HNO_3 , the sensitivity and resolution were optimized, and the doubly charged ions and oxides species ($< 1.04\%$) were minimized. Along ICP-MS analysis, a solution containing 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ of the three internal standards (^{101}Ru , ^{103}Rh , ^{193}Ir) was added online to correct the data for possible instrumental drifts and matrix effects.

Table 2. ICP-MS operating conditions and instrument parameters.

ICP-MS 8800 QQQ Agilent Technologies		
Scan type		MS/MS
Plasma parameters	RF power	1550 W
	RF matching	1.70 V
	Carrier gas	1.20 L min^{-1}
	Nebulizer pump	0.10 rps
Collision reaction cell	He	4.0 mL min^{-1}
(CRC) gases	O ₂	0.50 mL min^{-1}
Acq parameters		Spectrum Mode
Spectrum mode option	Q2 peak pattern	1 point
	Replicates	3
	Sweeps/replicate	10
Isotope /CRC gas mode	He	^{27}Al , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{95}Mo
	O ₂	^{75}As
	No gas	^{55}Mn , ^{107}Ag , ^{111}Cd , ^{137}Ba , ^{208}Pb , ^{209}Bi

Standard addition calibration method was carried out for the quantification. One sample of each type was used for the calibration, HTD-2 and HT-4 for powders and pastes, respectively, fortified at 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800, and 1600 $\mu\text{g L}^{-1}$ for each element. Quality controls were done analyzing a standard solution of known concentration (400 $\mu\text{g L}^{-1}$) every 10 samples. Method precision was evaluated running each sample (HD-1 for powders and HT-1 for pastes) ten times and reporting the relative standard deviation (RSD). Due to the unavailability of certified reference material for metal analysis in jagua and henna, the method was validated in terms of accuracy by performing analyte recovery studies at six concentrations (2, 5, 10, 20,

50, and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$), using sample HD-2 as representative for powder group and sample HT-15 as representative for pastes.

The instrumental detection limits (LOD) were experimentally obtained before the quantification of the samples. Quantification limits (LOQ) were calculated as three times the detection limit values.

2.5. Statistical analysis

Thirty-four henna and jagua samples were quantitatively analyzed by ICP-MS and characterized by eleven descriptors (elemental concentrations) measured. The final matrix data obtained contained 34 rows and 11 columns. For subsequent chemometric processing, all samples belonging to the different types were assigned numerical codes: 1 (HD), 2 (HTD), 3 (HT), 4 (JT) and 5 (HPT) and solid samples were assigned to code 0 and pastes, 6. The basic chemometric characterization of the investigated samples was performed by cluster analysis (CLU) which is used as a feature to group the key variables that explain the principal data dimensionality.

STATGRAPHICS Centurion software ver. 18 (2017) was used for statistical treatment of the ICP-MS measurement results.

3. Results and discussion

3.1. Analytical method performance

Linearity coefficients of determination (R^2), ranged from 0.9941-0.9998 and 0.9986-1.0000 for solid and paste samples, respectively, and the overall mean value was higher than 0.9986 (see Supplementary Table S1). Results of the method accuracy and precision evaluation are summarized in Table 3, showing excellent to good recoveries (87-118% for paste-type samples and from 97% to 116% for solid-type samples) and RSD values (6% for pastes and 5% for solid samples). The LODs and LOQs for the elements analyzed are depicted in Table S1 and Table 3, respectively.

Table 3. Quality parameters of the method: precision, accuracy, and limits of quantification (LOQ).

Element	Solid samples			Paste samples		
	Precision (RSD, %)	Recovery (%)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Precision (RSD, %)	Recovery (%)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	6.8	102 \pm 9	48.45	3.9	118 \pm 6	5.37
Cr	4.7	101 \pm 6	5.81	6.3	87 \pm 2	0.147
Mn	6.3	99 \pm 4	19.95	5.8	108 \pm 3	0.14
Co	6.3	112 \pm 10	0.29	9.1	95 \pm 2	0.040
Ni	5.7	111 \pm 12	1.82	8.8	110 \pm 2	0.26
Cu	6.2	102 \pm 9	1.06	3.5	97 \pm 2	0.27
Zn	6.2	116 \pm 8	1.89	2.1	103 \pm 14	1.53
As	1.2	99 \pm 3	0.060	9.9	91 \pm 2	0.025
Cd	5.9	113 \pm 7	0.012	7.7	90 \pm 8	0.0058
Ba	4.5	97 \pm 5	0.88	2.5	103 \pm 11	0.13
Pb	3.2	101 \pm 11	0.15	4.1	95 \pm 11	0.028

LODs ranged between 0.004-16.15 $\mu\text{g g}^{-1}$ for solids and 0.002-1.79 $\mu\text{g g}^{-1}$ for paste samples. LOQs for the solid samples ranged from 0.012 to 5.81 $\mu\text{g g}^{-1}$, although they slightly increase for Mn (19.95 $\mu\text{g g}^{-1}$) and especially for Al (48.85 $\mu\text{g g}^{-1}$). For paste samples, LOQs ranged from 0.0058 to 1.53 $\mu\text{g g}^{-1}$, being higher for Al (5.37 $\mu\text{g g}^{-1}$).

3.2. Heavy metal content in henna and jagua samples

The division of the purchased samples into two main groups according to their physical state: solids and pastes, has been kept for the results evaluation. It is mandatory to carefully chose the elements according to their importance and their relationship with toxicity and health. Therefore, Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Ba, and Pb were selected to be analyzed by ICP-MS. Affinities and differences between the samples were explored according to the typology considered.

A first look at the obtained data (see Table 4), revealed that the physical state of the natural tattoos and dyes studied can be easily discriminated according to their chemical composition. Both groups contained considerable amounts of heavy metals and showed a wide variation among the samples. Since solid samples revealed more information than the pastes and generally with higher concentrations, this approach

may be used to chemically distinguish between pastes and solids, providing an analytical tool with the evident application on potential fraud control on the global market. A closer look shows that the elements Ba and Pb can be used to discriminate among the pastes group samples. In the case of the solid samples, a similar situation occurs, but the two discriminating elements are now Al and Zn. It is relevant to mention at this point that other three elements that we initially considered (Mo, Ag, and Bi) were discarded since their presence was not detected using the methodology adopted in this work.

Based on the showed overall mean concentrations, the heavy metal levels in the solid-type products were in the following decreasing order: Al>Mn>Cr>Ba>Zn>Cu>Ni>Co> Pb>As>Cd. However, it is important to note that the solid JT-4 jagua data was not considered to calculate the Zn mean, because it distorted the value upwards. In fact, the Zn concentration of the JT-4 is almost $700 \mu\text{g g}^{-1}$, enabling this element to be used to discriminate henna from jaguas within the solid sample group as seen in Figure 3.

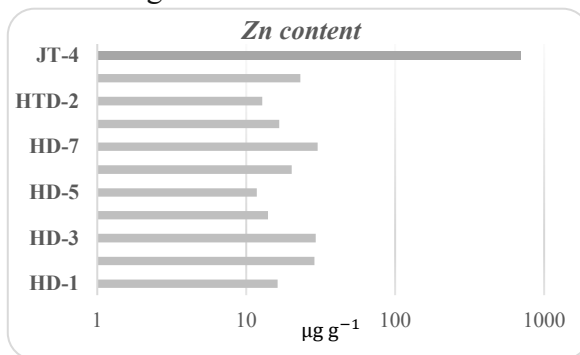


Figure 3. Zn contents in solid samples (in logarithmic scale).

A careful inspection of the data also revealed that Al differentiates samples HD-1, HD-7, HTD-1, and HTD-2 from the remaining solid samples displaying concentrations higher than $500 \mu\text{g g}^{-1}$. All other elements were present in similar concentrations in all solid samples, with Cd being present in the lowest concentration.

Table 4. Results of the trace elements ($\mu\text{g g}^{-1}$) in all the investigated samples ($n=34$). HT: Henna Tattoo; HD: Henna Dye; HTD: Henna Tattoo-Dye; JT: Jagua tattoo; HPT: Herbaceous Plant.

		Al	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Ba	Pb	
Solid samples	HD-1	718.33	37.21	79.57	0.68	5.43	10.89	16.26	0.22	0.04	19.52	0.90	
	HD-2	217.70	20.05	116.54	0.50	6.33	8.98	28.68	0.09	0.04	77.75	0.28	
	HD-3	192.81	49.67	112.82	0.80	13.36	10.52	29.29	<0.060	0.018	87.51	0.35	
	HD-4	413.99	43.73	101.42	0.60	6.57	8.86	13.99	0.14	0.06	15.24	0.72	
	HD-5	419.81	22.81	118.02	0.59	4.86	8.69	11.79	0.14	0.08	15.23	0.40	
	HD-6	457.27	39.73	90.92	0.56	5.68	9.72	20.24	0.13	0.04	16.36	0.56	
	HD-7	710.76	56.61	99.00	0.98	8.93	8.37	30.11	0.21	0.05	11.81	0.49	
	HTD-1	973.53	<5.81	75.35	0.90	<1.82	7.82	16.65	0.53	0.05	22.57	0.39	
	HTD-2	849.69	56.63	140.66	1.00	8.11	11.60	12.81	0.37	0.09	15.50	0.62	
	HTD-3	318.15	23.30	131.40	0.55	4.65	8.49	23.09	0.13	0.07	66.32	0.42	
	JT-4	51.09	<5.81	<19.95	<0.29	<1.82	3.83	698.90	0.074	<0.012	<0.88	0.33	
	Paste samples	HT-1	25.36	3.30	0.38	<0.040	<0.26	0.56	6.70	0.05	0.0093	0.32	0.08
		HT-2	8.43	1.41	0.28	<0.040	<0.26	<0.27	<1.53	0.033	0.0105	1.71	0.09
HT-3		184.51	0.17	0.53	<0.040	<0.26	<0.27	4.41	0.11	0.0083	1878.37	0.06	
HT-4		7.77	129.76	1.09	<0.040	<0.26	0.51	3.68	<0.025	0.0098	0.56	0.11	
HT-5		<5.37	<0.147	0.15	0.042	<0.26	<0.27	1.97	<0.025	0.0099	0.21	0.038	
HT-6		<5.37	0.29	1.11	<0.040	<0.26	<0.27	3.06	<0.025	0.0075	0.55	0.33	
HT-7		7.09	0.25	1.34	<0.040	<0.26	<0.27	5.68	0.026	0.0094	0.30	0.06	
HT-8		8.88	0.16	0.36	<0.040	<0.26	<0.27	5.50	0.026	0.0100	0.19	3.11	
HT-9		<5.37	0.63	1.35	<0.040	<0.26	<0.27	2.59	<0.025	0.0090	0.24	0.41	
HT-10		9.71	0.87	0.35	0.049	<0.26	0.40	3.05	0.026	0.0093	1.78	0.05	
HT-11		260.31	13.93	39.09	0.37	5.17	2.37	3.58	0.09	0.0244	4.00	0.27	
HT-12		8.77	0.95	0.28	<0.040	<0.26	<0.27	<1.53	0.029	0.0098	0.20	0.06	
HT-13		<5.37	0.23	0.16	<0.040	<0.26	<0.27	6.35	<0.025	0.0081	<0.13	0.05	
HT-14		<5.37	0.16	<0.14	<0.040	<0.26	<0.27	1.61	<0.025	0.0061	<0.13	0.044	
HT-15		<5.37	<0.147	0.22	<0.040	<0.26	<0.27	2.76	<0.025	0.0060	0.23	0.035	
HT-16		235.37	11.22	60.20	0.24	1.70	3.26	7.57	0.10	0.0342	7.19	0.27	
HT-17		9.64	0.16	0.53	<0.040	<0.26	<0.27	4.24	<0.025	0.0082	<0.13	4.51	
JT-1	<5.37	0.152	1.84	<0.040	<0.26	0.75	2.25	0.026	0.0106	0.48	0.039		
JT-2	<5.37	<0.147	0.24	<0.040	<0.26	<0.27	2.32	<0.025	0.0060	<0.13	0.032		
JT-3	8.00	<0.147	0.21	<0.040	<0.26	<0.27	2.95	<0.025	<0.0058	<0.13	0.039		
JT-5	<5.37	0.150	<0.14	<0.040	<0.26	<0.27	<1.53	<0.025	<0.0058	<0.13	0.032		
JT-6	<5.37	0.51	<0.14	<0.040	3.25	7.11	11.60	<0.025	0.0078	0.17	0.41		
HPT	5.99	273.57	<0.14	<0.040	<0.26	<0.27	17.31	<0.025	<0.0058	<0.13	0.029		

For the paste-type samples, the decreasing order of concentrations was as follows: Al> Cr>Mn>Zn>Ni>Cu>Ba>Pb>Co>As>Cd. As in the case of Zn in the solid samples group, sample HT-3 was not considered here for the calculation of the mean Ba concentration. For the HPT sample, Cr and Zn were detected in the highest concentrations among the group, with Cr reaching $300 \mu\text{g g}^{-1}$. The high Ba concentration in the white sample HT-3 stands out, so Ba differentiates this sample from the other ones. Certain samples are notable for their high content of a

particular element such as the orange HT-4 with Cr, JT-6 with Cu or Zn higher than $10 \mu\text{g g}^{-1}$ for JT-6 and HPT. Two brown hennas, HT-11 and HT-16, showed higher concentrations of Mn, Ni, or Co.

A comparison within the two sample types, hennas and jaguas, is discussed below. Despite the commercial differences of the selected henna powder samples, they do not chemically differ from each other regarding the proportion of the elements, as shown in Figure 4. Manganese, Zn, and Pb were the elements that appeared in the most henna samples in general, while Ni and Co were the least frequent. The metal content values do not differ if we compare the two henna claims: hair dyes (HTD) or temporary tattoos (HT) beyond the previously commented differences between solid and paste samples. Some observations can be made by looking at the color of the henna pastes. The red HT-14 is the sample, according with the chosen elements, with lower elemental content, which can indicate that its color maybe due to organic nature. Since Pb discriminated blue samples HT-8 and HT-17 and considering its organic components, it is likely that Pb present in the mixture is part of the chromophore responsible for the sample color. HT-3 is widely noted for its high Ba concentration and has a white color. This can be explained by the use of Ba-based white pigments, such as barium sulfate, which is widely used in cosmetic products [35] and probably used in the preparation of this henna paste. Finally, samples HT-11 and HT-16 are very different when compared to the other pastes, as their concentrations were relatively higher for all the 11 elements detected. Therefore, these two products are more similar to the solid hennas in terms of their metal content proportion (Figure 4), which probably indicates the same type of recipe in the preparation of these dyes. A possible reason for this is that these two samples have been reported as real hennas, while others studied may be frauds considering their active components [36, 37]. Regarding all jaguas, Co was not detected in any of them. Some trace metals appeared in groups of two samples such as Cr in JT-6 and HPT, or high amount of Pb for JT-4 and JT-6, or Al for JT-3 and HPT, but there were also other

elements that were detected in only one sample such as Ni for JT-6 and As for JT-1. Only two elements were found for sample JT-5 and the concentration of Cr in HPT was remarkable. Zinc was detected in most of the samples, with the high concentration in the unique solid jagua distinguishing it from the others.

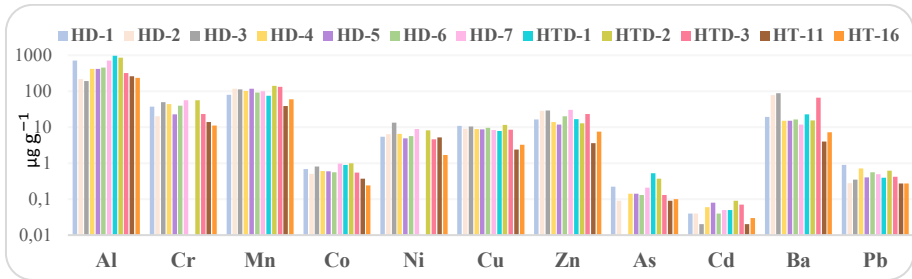


Figure 4. Similar element distribution in the different henna samples: solid ones and two brown paste samples (in logarithmic scale).

The results obtained in this work were compared with those available in the few works published to date. In fact, there are very few references that study the metallic composition of this type of samples, and in the case of jagua products there is no previous literature on their analysis by ICP-MS. Therefore, in the case of henna products such as those considered in this work, most of the articles focused on a limited number of elements, with the inclusion of Pb among them being common. In henna powder, concentrations of $Pb > Cd > As$ were found [29], while in the solid samples we found $Pb > As > Cd$, coinciding in that Pb appeared in all the samples studied and in the highest concentration. The presence of elements common to those found in HTD samples was reported in the analysis of 7 samples of henna powder for tattooing [30]. Ba, Pb, Al, Ni, Cu, and Zn were also found in a sample of hair dye henna [31]. In black henna-based temporary tattoo products, Pb levels were similar [32, 33]. The analysis of two henna analyzed among different cosmetics showed a frequency distribution of $Cr > Ni > Cu > Pb$ [34] identical to that found in the henna paste samples in the present work. A possible explanation for the disparity of data in the literature

on heavy metal content between henna samples is the difference in the way the product is manufactured (different chemical additives such as dyes or other natural extracts) and the origin of the product, which varies depending on climatic conditions and soil.

The comparison of the obtained results with regulated values and the EU legislation is of utmost importance [8, 38]. The metals analyzed in this study are not listed as ingredients on any of the products, and some labels even declare the absence of heavy metals. Chromium, Ni, As, Cd, Co, and Pb are the six out of the 11 studied elements in this work that are banned in cosmetic products. As shown in Table 4, Ni, Co, and As were present in 12, 14, or 20 of the 34 samples, respectively; Cr were absent in six of them while Cd in four, with the lowest concentrations of As and Cd. In other words, approximately 35 to 60% of the samples contain Ni, Co, or As while more than 80% contain Cr and Cd while Pb was detected in 100% of the samples. In contrast, the regulation lists other substances allowed with specific uses, such as coloring agents as Al (Color Index number, CI, 77000) and Cu (CI 77400) as white and brown dyes, respectively.

Finally, from the perspective of public health, positive reactions to Co and Ni have already been observed in a patient with allergic contact dermatitis caused by henna dye used for tattooing [14]. So, analyzing and controlling heavy metals in commercial henna or similar mixtures is important because these substances may still be present in cosmetics as metallic contaminants.

3.3. Sample grouping by cluster analysis (CLU)

Cluster analysis is a multivariate technique that shows the similarity of objects by classifying them into clusters, such that they are very similar within a class, but significantly different from those in other classes with respect to the predetermined selection criterion [39, 40]. Agglomerative hierarchical clustering is the most common approach [41], which is usually illustrated with a dendrogram. The individual samples were classified into clusters based on the standardized squared

Euclidian distance. The next step was the choice of a clustering algorithm. In this step, one of the agglomerative hierarchical clustering algorithms was applied to the monitored data: the centroid method, i.e., to gather in a cluster those variables in which the distance between two clusters is the distance between the centroids of each cluster.

The results of elements comprised in the studied samples clustering are shown in Figure 5.

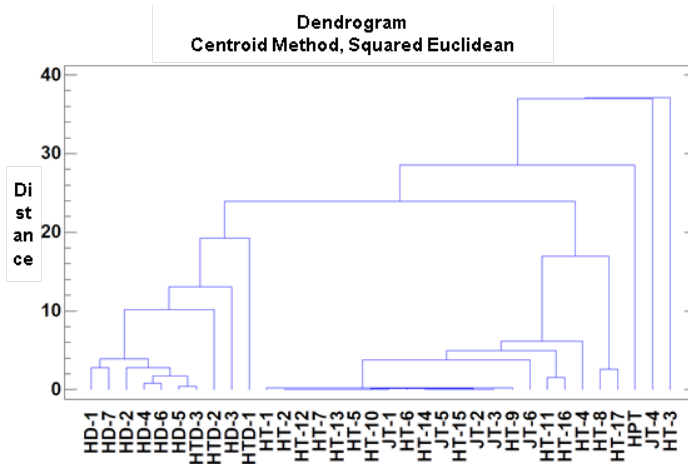


Figure 5. Dendrogram of 11 variables (element concentrations) including 34 samples and clustering technique (squared Euclidean) for cluster analysis.

The dendrogram shows that the samples can be grouped into two main groups. Cluster I is formed by the hair dye samples (HD) or those of the two claims (HTD). Cluster II consists of tattoo samples, both hennas (HT) and jaguas (JT). In addition, 3 outliers were isolated due to their high content of certain elements: HPT for Cr, JT-4 for Zn and HT-3 for Ba. Remarks can be made about other pairs of samples such as HT-11 and HT-16, which are the only real hennas pasta, brown in color and similar in content to the solid hennas, or HT-8 and HT-17, which are blue hennas pasta with higher Pb content. The elementary characterization groups the tattoos, both jaguas and hennas, being all of them of paste type. In this group, there are jaguas whose metallic

contents are robustly low, and also the rest of the hennas, all of them being fake, since the two real ones are perfectly separated.

3.4. Heavy metals in cosmetics: associated risks and impact on human health

Heavy metal toxicity to human is well documented [42]. Metal contents have been reported in different cosmetic products but the association with potential health risks is challenging to interpret. When tattoos or hair dyes are used, they come into direct contact with human skin, scalp, or hair. There are many complications associated with the use of metals and metal salts in these cosmetics, with local inflammation, infection, and allergic reactions [43] being the most common adverse effects and the main safety concern. Since the pigments used in the studied products are complex mixtures with a variable metallic composition, allergic reactions to these substances are potentially frequent. Local exposure and accumulation [44] can induce various long term health disorders that may include headaches, loss of hair, respiratory diseases, cardiovascular problems, organ dysfunction and mental retardation [45].

Chromium, Ni, As, Cd, Co, and Pb are banned as intentional ingredients in cosmetics as mentioned above. However, due to the lack of worldwide uniform legislation on the presence of toxic metals in cosmetics and the technically unavoidable levels that come mainly from permitted pigments, they are in some cases present as accidental contaminants or impurities in trace amounts. Lead, Cd, and As are extremely toxic with a wide variety of chronic human health long-term effects [46, 47], while Cr, Ni, and Co are well known skin sensitizers [48]. Some metals are used as dyes, such as Cr, but chromium is also corrosive, and its toxicity can cause skin reactions, ulcerations, kidney, and liver damage or respiratory diseases. Nickel allergy is quite common and can cause severe contact dermatitis and also result in skin irritation and hypersensitivity. Despite the generally low As concentrations in the studied samples, As has a high affinity for skin

and keratin, present in hair and nails, and its harmful effects include skin lesions, nail striation, and alopecia [49]. Cadmium is used in cosmetic products due to its color property and has been used as a pigment in many industries [50]. Although Cd concentrations in natural tattoo and dye samples were minimal, even at very low levels of exposure and taking into account its bioaccumulation, Cd can cause kidney and bone damages. Cobalt and its salts are widely used as coloring agents in make-up and light brown hair dyes [51]. However, different researchers point to the capacity of Co to cause skin sensitization [14]. Finally, Pb is highly toxic for the fetuses, babies, and children whose nervous systems are still developing [52].

While Al and Cu can be present in dyes according to the European Cosmetic Regulations, Al can induce granulomatous reactions and although the application of Cu to the skin may initially provide beneficial effects, its high potential to induce skin irritation reactions is often underestimated [53, 54]. In contrast, some metals such as Mn or Zn are essential trace minerals with various functions in the human body.

Regarding the samples intended only as hair dyes, the safety assessment guideline of *L. inermis* (henna) as a hair dye by the SCCS [5] established impurity levels of heavy metals such as Pb, Cr, and Ni at 1.04, 9.4 and 8.06 ppm, respectively. As such, given the results obtained in this study for these three elements (Table 4), only Pb fulfils the SCCS requirements for all HD samples. In the case of Ni, one of the samples (HD-3) shows a higher concentration than specified and nine of the ten henna dye samples exceed the mentioned Cr concentration.

Although some concentrations of the elements analyzed were relatively low, it is important to consider that they remain on the skin for a certain period of time because they are products for temporary use, and it is difficult to completely exclude the possibility that they induce adverse effects. Moreover, some of them are also toxic even at low concentrations. Thus, the prolonged use of these plant-based cosmetics

can increase the absorption of heavy metals into the human body and act as health hazards. Based on this background, the metallic ingredients of temporary tattoos and dyes should be analyzed, and a systematic risk assessment should be carried out to ensure their safety and to reduce unnecessary exposure to toxic metals.

4. Conclusions

Natural pigment-based temporary tattoo and dye products are highly prevalent and available to anyone, even through Internet sources. Characterization of henna and jagua temporary tattoos and hair dyes according to their elemental content have been achieved by ICP-MS. Differences between the two groups of samples (solid and pastes) as well as between the henna and the jagua samples have been studied, together with hypothetical impact on public and human health.

Both groups contained considerable amounts of the selected heavy metals showing a wide variability among the samples, with solids containing higher concentrations than the pastes. The low method LOQs allowed characterization and differentiation between both groups, finding all the studied elements in ten samples.

The heavy metal variation in the results points to the fact that these products lack any quality control during the material sourcing and manufacturing and may be produced from impure and low quality substances. It is significant that, according to the measured concentrations of Cr, Ni, As, Cd, Co, or Pb, none of the 34 samples analyzed comply with the current European Cosmetics Regulation. Some of the products containing the highest levels of these elements do not provide label information about their presence, with some labels indicating the absence of heavy metals.

A declaration of additives, synthetic dyes and metallic contaminants with appropriate labelling is needed. The cumulative effects of prolonged exposure to metals and their potential toxicity may be of concern. The widespread use of these products, especially when

children are involved, may constitute a public health risk. Therefore, extensive quality measures would be recommended for products designed to come into direct contact with the skin or hair when regulations are unclear. Thus, the proposed ICP-MS analytical methodology could contribute to develop a useful tool in monitoring this type of beauty products.

Author contributions

Conceptualization, P.B., M.C. and C.B.D.; methodology, L.R. and P.B.; software, P.B.; validation, L.R. and P.B.; formal analysis, L.R. and P.B.; investigation, L.R.; resources, P.B., M.C. and C.B.D.; data curation, L.R. and P.B.; writing—original draft preparation, L.R.; writing—review and editing, P.B., M.C., C.G.-J., M.L. and C.B.D.; visualization, P.B.; supervision, P.B.; project administration, C.G.-J., M.L. and C.B.D.; funding acquisition, C.G.-J. and M.L.

Funding

This research was supported by project *ED431B 2020/06* (Galician Competitive Research Groups, Xunta de Galicia, Spain). The authors L. Rubio and C. Garcia-Jares belong to the CRETUS Strategic Partnership (*ED431E 2018/01*). All these programs are co-funded by FEDER (EU). L. Rubio acknowledges Xunta de Galicia for her predoctoral contract (*ED481A-2018/227*) and Erasmus + program for her mobility grant. This work has also been financially supported by the *UIDB/04449/2020* and *UIDP/04449/2020* projects, funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) and by the European Regional Development Fund.

References

- [1] O. Al-Dayel, J. Hefne, T. Al-Ajyan, Human exposure to heavy metals from cosmetics, *Orient. J. Chem.* 27(1) (2011) 1.
- [2] S. Safavi, R. Najarian, M. Rasouli-Azad, S. Masoumzadeh, A. Ghaderi, R. Eghtesadi, A narrative review of heavy metals in

- cosmetics; health risks, *Int. J. Pharm. Res.* 11(4) (2019) 182-190. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2019.11.04.031>.
- [3] J. Kazandjieva, L. Grozdev, N. Tsankov, Temporary henna tattoos, *Clin. Dermatol.* 25 (2007) 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.05.013>.
- [4] M. Maarouf, C. Saberian, R.J. Segal, V.Y. Shi, A new era for tattoos, with new potential complications, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 12 (2019) 37–38.
- [5] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) Opinion on *Lawsonia Inermis* (Henna) COLIPA n_ C169, 19 September 2013 SCCS/1511/13. Available online: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_140.pdf (accessed on 28 September, 2022).
- [6] J. Waton, F. Brault, E. Laveine, A putative case of allergic contact dermatitis caused by a jagua tattoo, *Contact Dermat.* 76 (2017) 296–321. <https://doi.org/10.1111/cod.12767>.
- [7] Manual of the Working Group on Cosmetic Products (Sub-Group on Borderline Products) on the Scope of Application of the Cosmetics Regulation (EC) No 1223/2009 (Art. 2(1)(A)) Version 3.1. 2017. Available online: <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/29002> (accessed on 28 September, 2022).
- [8] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (Recast), *Off. J. Eur. Union L 342* (2009) 59. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32009R1223> (accessed on 28 September, 2022).
- [9] Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the Safety of Toys, *Off. J. Eur. Union L 170* (2009) 1–37. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52020SC0287&rid=6> (accessed on 28 September, 2022).

- [10] M. Lores, M. Celeiro, L. Rubio, M. Llompart, C. Garcia-Jares, Extreme cosmetics and borderline products: An analytical-based survey of European regulation compliance, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7085–7102. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1312-3>.
- [11] L. Rubio, E. Guerra, C. Garcia-Jares, M. Lores, Body-decorating products: Ingredients of permanent and temporary tattoos from analytical and european regulatory perspectives, *Anal. Chim. Acta* 1079 (2019) 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.052>.
- [12] N. Lekouch, A. Sedki, A. Nejmeddine, S. Gamon, Lead and traditional Moroccan pharmacopeia, *Sci. Total. Environ.* 280 (2001) 39–43. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00801-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00801-4).
- [13] M. A. Nouioui, S. Mahjoubi, A. Ghorbe, M.B.Y. Yahia, D. Amira, H. Ghorbel, A. Hedhili, Health Risk Assessment of Heavy Metals in Traditional Cosmetics Sold in Tunisian Local Markets, *Int. Sch. Res. Notices* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/6296458>.
- [14] I.-K. Kang, M.-H. Lee, Quantification of para-phenylenediamine and heavy metals in henna dye, *Contact Dermatitis* 55 (2006) 26–29. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2006.00845.x>.
- [15] I. A. Al-Saleh, L. Coate, Lead exposure in Saudi Arabia from the use of traditional cosmetics and medical remedies, *Environ. Geochem. Health* 17 (1995) 29–31. <https://doi.org/10.1007/BF00188629>.
- [16] A. Y. Ahmed, A. Asada, I. A. A. Hamza, Cobalt and lead concentrations in cosmetic products sold at local markets in Saudi Arabia, *Toxicol. Rep.* 8 (2021) 1693–1698. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.09.004>.
- [17] M. Yahya, S. Kesekler, I. Durukan, C. Arpa, Determination of prohibited lead and cadmium traces in hair dyes and henna samples using ultrasound assisted-deep eutectic solvent-based liquid phase microextraction followed by microsampling-flame atomic

- absorption spectrometry, *Anal. Methods* 13 (2021) 1058-1068.
<https://doi.org/10.1039/D0AY02235G>.
- [18] N. Ozbek, S. Akman, Determination of lead, cadmium and nickel in hennas and other hair dyes sold in Turkey, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 79 (2016) 49-53.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.013>.
- [19] K.N. Jallad, C. Espada-Jallad, Lead exposure from the use of *Lawsonia inermis* (Henna) in temporary paint-on-tattooing and hair dyeing, *Sci. Total. Environ.* 397 (2008) 244-250.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.055>.
- [20] A. Ait Sidi Mou, M. Daoudi, M. E. A. Ghanjaoui, B. Elgamany, R. Slimani, Principal component analysis applied to compare the quality of trace elements in Moroccan and Indian henna, *JASAB* 2 (2020) 32-37.
<https://doi.org/10.48402/IMIST.PRSM/jasab-v2i1.19558>.
- [21] M. E. Ghanjaoui, M. Cervera, M. El Rhazi, M. de la Guardia, Assessment of trace elements in traditional Moroccan cosmetics by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, *IJSTR* 3(10) (2014) 104-112.
- [22] N. Ozbek, Elemental analysis of henna samples by MP AES, *JOTCSA* 5 (2018) 857–868.
<https://doi.org/10.18596/jotcsa.423820>.
- [23] A. K. Salama, Assessment of metals in cosmetics commonly used in Saudi Arabia, *Environ. Monit. Assess.* 188 (2016) 553.
<https://doi.org/10.1007/s10661-016-5550-6>.
- [24] M. G. Volpe, M. Nazzaro, R. Coppola, F. Rapuano, R. P. Aquino, Determination and assessments of selected heavy metals in eye shadow cosmetics from China, Italy, and USA, *Microchem J.* 101 (2012) 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.10.008>.
- [25] M. F. Mesko, D. L. R. Novo, V. C. Costa, A. S. Henn, E. M. M. Flores, Toxic and potentially toxic elements determination in

- cosmetics used for make-up: A critical review, *Anal. Chim. Acta* 1098 (2020) 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.046>.
- [26] N. M. Hepp, W. R. Mindak, J. Cheng, Determination of total lead in lipstick: development and validation of a microwave-assisted digestion, inductively coupled plasma–mass spectrometric method, *J. Cosmet. Sci.* 60 (2009) 405–414. PMID: 19691936.
- [27] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, third ed., CRC Press, Boca Raton, 2013.
- [28] L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke, Inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): a powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – a tutorial review, *Anal. Chim. Acta* 894 (2015) 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.053>.
- [29] A. M. Bobaker, I. Alakili, S. B. Sarmani, N. Al-Ansari, Z. M. Yaseen, Determination and Assessment of the Toxic Heavy Metal Elements Abstracted from the Traditional Plant Cosmetics and Medical Remedies: Case Study of Libya, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16 (2019) 1957. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111957>.
- [30] S. Y. Ibrahim, R. A. Maguid, Evaluation of Metals Content among Different Cosmetic Products in the Arabian Market, *J. Pharmacol. Clin. Toxicol.* 4 (2016) 1062. <https://doi.org/10.14419/ijpt.v4i1.5942>.
- [31] M. A. Al-Qutob, H. M. Alatrash, S. Abol-Ola, Determination of different heavy metals concentrations in cosmetics purchased from the Palestinian markets by ICP/MS, *AES Bioflux* 5 (2013) 287-293.
- [32] A. Aktas Sukuroglu, D. Battal, S. Burgaz, Monitoring of lawsone, p-phenylenediamine and heavy metals in commercial temporary black henna tattoos sold in Turkey, *Contact. Dermat.* 76 (2017) 89–95. <https://doi.org/10.1111/cod.12702>.
- [33] S. Y. Ibrahim, M. M. Fawzi, M. G. Saad, S. M. A. Rahman, Determination of Heavy Metals and Other Toxic Ingredients in

- Henna (*Lawsonia inermis*), *J. Environ. Anal. Toxicol.* 6 (2016) 364. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000364>.
- [34] S. Kilic, M. Kilic, M. Soylak, The Determination of Toxic Metals in some Traditional Cosmetic Products and Health Risk Assessment, *Biol. Trace Elem. Res.* 199 (2021) 2272–2277. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02357-8>.
- [35] W. Johnson Jr, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks Jr, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, L. J. Gill, B. Heldreth, Safety Assessment of Barium Sulfate as Used in Cosmetics, *Int. J. Toxicol.* 37 (2018) 5S-11S. <https://doi.org/10.1177/1091581818799346>.
- [36] L. Rubio, M. Lores, C. Garcia-Jares, Monitoring of natural pigments in henna and jagua tattoos for fake detection, *Cosmetics* 7 (2020) 74. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040074>.
- [37] L. Rubio, C. Garcia-Jares, M. Lores, High-resolution mass spectrometry for the comprehensive characterization of plant-pigment-based tattoos and dyes formulations, *Cosmetics* 8 (2021) 55. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020055>.
- [38] Commission Regulation (EU) 2021/850 of 26 May 2021 amending and correcting Annex II and amending Annexes III, IV and VI to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32021R0850> (accessed on 28 September, 2022).
- [39] R.A. Johnson, D.W. Wichern, *Applied Multivariate Statistical Analysis*, third ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1992.
- [40] M.J. Adams, The principles of multivariate data analysis, in: P.R. Ashurst, M.J. Dennis (Eds.), *Analytical Methods of Food Authentication*, Blackie Academic & Professional, London, UK, 1998, p. 350.
- [41] J.E. McKenna Jr., An enhanced cluster analysis program with bootstrap significance testing for ecological community analysis,

- Environ. Modell. Software 18 (2003) 205-220.
[https://doi.org/10.1016/S1364-8152\(02\)00094-4](https://doi.org/10.1016/S1364-8152(02)00094-4).
- [42] G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg, Handbook of the Toxicology of Metals, 3rd ed., Academic Press, London, UK, 2007.
- [43] G. J. Nohynek, E. Antignac, T. Re, H. Toutain, Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients, Toxicol. Appl. Pharmacol. 243 (2010) 239–259.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.001>.
- [44] S. Borowska, M. M. Brzóška, Metals in cosmetics: implications for human health, J. Appl. Toxicol. 35 (2015) 551–572.
<https://doi.org/10.1002/jat.3129>.
- [45] B. Bocca, A. Pino, A. Alimonti, G. Forte, Toxic metals contained in cosmetics: a status report, Regul. Toxicol. Pharmacol. 68 (2014) 447-467. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.003>.
- [46] G. Forte, F. Petrucci, B. Bocca, Metal allergens of growing significance: epidemiology, immunotoxicology, strategies for testing and prevention, Inflamm. Allergy Drug Targets 7 (2008) 145–162. <https://doi.org/10.2174/187152808785748146>.
- [47] J. P. Thyssen, T. Menné, Metal allergy – a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications, Chem. Res. Toxicol. 23 (2010) 309–318.
<https://doi.org/10.1021/tx9002726>.
- [48] L. Kanerva, R. Jolanki, T. Estlander, K. Alanko, A. Savela, Incidence rates of occupational allergic contact dermatitis caused by metals, Am. J. Contact Dermat. 3 (2000) 155–160.
<https://doi.org/10.1053/ajcd.2000.7186>.
- [49] R. Guy, J. J. Hostynek, R. S. Hinz, C. R. Lorence, Metals and the Skin: Topical Effects and Systemic Absorption, third ed., CRC Press, New York, 1999.
- [50] J. Godt, F. Scheidig, C. Grosse-Siestrup, V. Esche, P. Brandenburg, A. Reich, D. A. Gronenberg, The toxicity of cadmium and resulting

- hazards for human health, *J. Occup. Med. Toxicol.* 1 (2006) 1–6. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>.
- [51] A. Fischer, B. Brodziak-Dopierała, K. Loska, J. Stojko, The Assessment of Toxic Metals in Plants Used in Cosmetics and Cosmetology, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14(10) (2017) 1280. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101280>.
- [52] T. Sanders, Y. Liu, V. Buchner, P. B. Tchounwou, Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review, *Rev. Environ. Health* 24 (2009) 15–45. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2009.24.1.15>.
- [53] J. G. Ayenimo, A. M. Yusuf, A. S. Adekunle, O. W. Makinde, Heavy metal exposure from personal care products, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84 (2010) 8–14. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9867-5>.
- [54] H. Li, P. Z. Toh, J. Y. Tan, M. T. Zin, C. Y. Lee, B. Li, M. Leolukman, H. Bao, L. Kang, Selected Biomarkers Revealed Potential Skin Toxicity Caused by Certain Copper Compounds, *Sci. Rep.* 6 (2016) 37664. <https://doi.org/10.1038/srep37664>.

Supplementary material

Table S1. Coefficient of determination (R^2) and instrumental detection limits (LOD) obtained for the different elements.

<i>Element</i>	<i>Solid samples</i>		<i>Paste samples</i>	
	R^2	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>Al</i>	0.9941	16.15	0.9997	1.79
<i>Cr</i>	0.9989	1.94	0.9986	0.05
<i>Mn</i>	0.9997	6.65	0.9999	0.05
<i>Co</i>	0.9998	0.10	0.9992	0.01
<i>Ni</i>	0.9997	0.61	1.0000	0.09
<i>Cu</i>	0.9995	0.35	0.9993	0.09
<i>Zn</i>	0.9997	0.63	0.9999	0.51
<i>As</i>	0.9997	0.02	0.9999	0.01
<i>Cd</i>	0.9996	0.004	0.9997	0.002
<i>Ba</i>	0.9996	0.29	0.9998	0.04
<i>Pb</i>	0.9998	0.05	0.9999	0.01

CAPÍTULO 4. INGREDIENTES NATURAIS EN FORMULACIÓNS COSMÉTICAS

A demanda de produtos cada vez máis sustentables conduce á evolución do mercado cosmético coa elaboración de formulacións que inclúen aceites esenciais e extractos naturais, algúns mesmo obtidos a partir de residuos agroforestais, plantas previamente cultivadas ou outras silvestres. Debido ás súas recoñecidas propiedades antimicrobianas e antioxidantes, a adición destes extractos evita ou minimiza a necesidade de conservantes sintéticos adicionais, respondendo así ás esixencias actuais da sociedade. Así e todo, o uso crecente de ingredientes naturais supón un desafío analítico e lexislativo ao tratárense de mostras complexas. É preciso desenvolver metodoloxías analíticas que permitan identificar os seus compoñentes individuais así como avaliar a presenza de alérxenos.

Este capítulo engloba dous traballos para a análise de ingredientes naturais con potencial aplicabilidade en cosméticos.

O obxectivo do primeiro estudo foi levar a cabo a caracterización de 17 mostras de aceites esenciais e extractos naturais, poñendo o foco tanto nos alérxenos presentes como na busca de posibles fitomarcadores de grupo. Empregouse tanto a inxección directa como a SPME seguidas de análise mediante GC-MS.

O segundo traballo baseouse na aplicación de UAE para obter extractos a partir dun cultivo ecolóxico galego de Filipéndula seguida da análise mediante LC-MS/MS para coñecer o perfil polifenólico dos mesmos. Ademais, o estudo completouse coa avaliación dos índices de actividade antioxidante (AA) e de contido fenólico total (TPC).

4.1.

Natural extracts and essential oils as ingredients in cosmetics: allergen survey and search for potential phytomarkers

Laura Rubio, Andrea Pita, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

Natural extracts and essential oils as ingredients in cosmetics: allergen survey and search for potential phytomarkers

L. Rubio^{1,2}, A. Pita², C. Garcia-Jares^{1,2}, M. Lores²

¹CRETUS, ²Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions (LIDSA), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain.

ABSTRACT

The increasing use of natural ingredients such as essential oils (EOs) and natural extracts (NEs) in cosmetics is an analytical and legislative challenge due to their complex composition, which includes recognized allergenic compounds. In this work, 17 EOs and NEs commercially available have been characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) by dilution of the original samples. Additionally, solid phase microextraction (SPME) has been applied for the analysis of volatile components. The results obtained allowed the identification of more than 90 compounds in the analyzed samples, including 20 allergens, revealing that all samples contained more allergenic substances than those declared on the corresponding safety data sheet. The results also support the design of a potential list of phytomarkers of the addition of EOs and NEs in cosmetics, to contribute to fraud control in the growing market of ingredients of natural origin.

Keywords: natural extract, essential oil, cosmetics, preservatives, allergens, phytomarker, solid phase microextraction, gas chromatography, mass spectrometry.

1. Introduction

The widespread use of cosmetic products has raised some social concern about the harmful effects that some ingredients used in the formulations may have on the consumer's health. Current trends are focused both on natural products as "greener" or "safer" than

conventional ones [1] and also on the avoidance of certain chemical compounds in products, commonly called "free-from" cosmetics. However, it is true that all cosmetic formulations are complex mixtures of multiple components with very different origins, chemical nature, and function.

Different preservation strategies are available to ensure the microbiological safety of cosmetic products [2]. Over the last decades, the most common way was using synthetic preservatives. In the EU framework, there is a limited number of permitted preservatives listed in Annex V of Regulation 1223 [3], which is continuously undergoing legislative changes. Cosmetic industry searches for alternative approaches to the preservation of cosmetic products developing self-preserving cosmetics and even preservative-free products. In these formulations, traditional synthetic preservatives are replaced by antimicrobial substances, mainly of natural origin, which are generally considered as multifunctional agents. However, these multifunctional antimicrobial ingredients are not regulated for this function in Annex V. In this sense, natural extracts (NEs) and essential oils (EOs) can be added to formulations as natural preservatives due to their recognized antioxidant and antimicrobial properties [4-6]. At the same time, the high prices of many NEs and EOs make adulteration a frequent practice [7,8] finding other natural compounds and even other EOs that are cheaper and easier to acquire. Both NEs and EOs are complex mixtures of chemical substances whose major components are allergenic fragrances, and therefore also require analytical control. While only 26 allergenic fragrances in cosmetics are regulated by the EU [3], the Scientific Committee for Consumer Safety (SCCS) [9] catalogs a total of 82 substances, including natural extracts and oils, as established human contact allergens. This list comprises 28 natural extracts (NE₂₈) and 54 individual chemical (IC₅₄) compounds, making their analysis difficult in complex matrices such as cosmetics.

For now, cosmetics manufacturers are obliged to label only the presence of the 26 allergens in the finished product, when their concentration is higher than 0.001% for leave-on cosmetics or higher than 0.01% in rinse-off products [3]. However, they often only take into account for

this calculation the allergens contributed by fragrance substances, as they have traditionally been the main and sometimes the only source of allergens in cosmetics. With the new trend towards the use of these multifunctional antimicrobial ingredients, this labelling will probably have to be revised upwards.

Adequate methodology for the analysis of these complex mixtures will allow the characterization of the new natural preservatives and the determination of the total allergen content. Some published studies have been conducted for the analysis of certain individual chemical compounds listed [10-13]. However, no analytical tools have been described to assess the NE₂₈. Thus, the aim of this work is to search for selective phytomarkers to determine the presence of NE₂₈ in cosmetic formulations. In addition, estimation of the real allergen levels in cosmetic products containing NEs and EOs would be possible by a prior assessment of the allergen content in those NE and EO pure original products, establishing groups based on the expected affinities due to a close botanical origin. To characterize the composition of the selected pure samples of EOs and NEs, direct injection of sample dilutions and solid-phase microextraction (SPME) were applied, followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis. After identification of allergens, potential phytomarker compounds were examined. The results obtained are useful to prevent and regulate fraud, and thus contribute to improve the safety of users of cosmetics that include NEs and EOs in their formulation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, reagents and materials

Ethyl acetate was supplied by Scharlab (Barcelona, Spain) and was of analytical grade. The SPME manual holders and fibres were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). The commercial fibre coating used throughout the present work was 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB). Prior to first use, fibre was conditioned as recommended by the manufacturer, inserting in the GC injector under helium flow at 250 °C for 30 min.

2.2. Samples

In the choice of samples, the 28 NEs highlighted as contact allergens by the SCCS of the European Commission [9] are used as reference. Samples from two different origin groups were selected, allowing the search for frequently occurring substances exclusive to each group that act as markers. Fifteen pure EOs and two NEs (Jasmine Absolute and Firmenich® Rose Absolute 220658) were acquired from Ventós (Barcelona, Spain), comprising 8 obtained from flowers and 9 from trees.

Table 1 lists the 17 samples divided into the groups, indicating their CAS numbers and the solubility indicated by the safety data sheets (SDS).

Table 1. Characteristics of the analyzed samples: sample code, CAS numbers and solubility indicated by the safety data sheets.

Code	CAS	Solubility ^a
Flowers		
Jasmine absolute	84776-64-7	H ₂ O (I), EtOH (S)
Firmenich® rose absolute 220658	90106-38-0	EtOH (S)
Geranium Egypt	90082-51-2	EtOH (S)
Lavender	90063-37-9	EtOH (S)
Lavandin super	91722-69-9	EtOH (S)
Verbena oil Firmenich® 220535	Aromatic substances mixture	H ₂ O (I), EtOH (S)
Ylang Ylang Extra	83863-30-3	H ₂ O (I), EtOH (PS)
Ylang Ylang II	83863-30-3	H ₂ O (I), EtOH (PS) alcohol (PS)
Trees		
Cinnamon leaves	84649-98-9	H ₂ O (I), EtOH (S)
Cassia	84961-46-6	H ₂ O (I), EtOH (S)
Atlas cedar	92201-55-3	EtOH (S)
Firmenich® Cedar super rect. 922051	85085-41-2	H ₂ O (I), EtOH (S)
Clove buds	84961-50-2	EtOH (S)
Eucalyptus 70/75	84625-32-1	EtOH (S)
Laurel leaves	84603-73-6	H ₂ O (I), EtOH (S)
Perú oil super Firmenich® 971717	8007-00-9	H ₂ O (I), EtOH (S)
Indian Sandalwood	84787-70-2	H ₂ O (I), EtOH (S)

^a I: insoluble; S: soluble; PS: partially soluble.

Table 2 lists the individual allergenic substances included in the SDS of the purchased samples, and details their use and function as ingredients in cosmetics [14, 15].

Table 2. Compounds declared as allergens [9]: CAS numbers, their function or use in cosmetics, and samples in which their presence is detailed in the safety data sheets.

Compound	CAS	Cosmetic function/use	Declared in
Benzyl alcohol	100-51-6	Preservative/solvent	Jasmine absolute, rose absolute, Perú oil
Benzyl benzoate	120-51-4	Solvent	Jasmine absolute, cinnamon leaves, Perú oil, Ylang ylang II, Ylang ylang extra
Benzyl cinnamate	103-41-3	Masking agent	Perú oil
Benzyl salicylate	118-58-1	UV absorber	Ylang ylang II, Ylang ylang extra
Camphor	464-49-3	Denaturant/plasticiser	Lavandin super
Cinnamaldehyde	104-55-2	Denaturant	Cassia, cinnamon leaves
Cinnamyl alcohol	104-54-1	Masking agent	Cassia
Citral	5392-40-5	Masking agent	Jasmine absolute, rose absolute, geranium Egypt
Citronellol	106-22-9	Masking agent	Rose absolute, geranium Egypt, verbena oil
Coumarin	91-64-5	Masking agent	Cassia, lavandin super
Eugenol	97-53-0	Denaturant/tonic	Jasmine absolute, rose absolute, clove buds, laurel leaves, cinnamon leaves, Ylang ylang II, Ylang ylang extra
Farnesol	4602-84-0	Soothing/solvent/deodorant	Rose absolute, Ylang ylang II, Ylang ylang extra

Table 2. (cont.) Compounds declared as allergens [9]: CAS numbers, their function or use in cosmetics, and samples in which their presence is detailed in the safety data sheets.

Compound	CAS	Cosmetic function/use	Declared in
Geraniol	106-24-1	Tonic	Rose absolute, geranium Egypt, lavender, lavandin super, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, verbena oil
Isoeugenol	97-54-1	Masking agent	Ylang ylang II, Ylang ylang extra
Limonene	138-86-3	Solvent	Geranium Egypt, lavender, lavandin super, laurel leaves, eucalyptus, cinnamon leaves, verbena oil
Linalool	78-70-6	Deodorant	Jasmine absolute, lavender, lavandin super, laurel leaves, cinnamon leaves, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, verbena oil
Linalyl acetate	115-95-7	Masking agent	Lavender, lavandin super
Terpinen-4-ol	562-74-3	Denaturant/solvent	Lavender, laurel leaves
Terpinolene	586-62-9	Fragrance	Cinnamon leaves
α -Pinene	80-56-8	Antifoaming	Geranium Egypt, laurel leaves, eucalyptus, cinnamon leaves
α -Terpineol	98-55-5	Denaturant/solvent	Lavender, lavandin super
β -Caryophyllene	87-44-5	Skin conditioning	Clove buds, geranium Egypt, lavender, lavandin super, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, cinnamon leaves
β -Pinene	127-91-3	Perfuming	Geranium Egypt, laurel leaves, eucalyptus, cinnamon leaves

2.3. Sample preparation

For direct injection of pure samples, a 1:100 dilution in ethyl acetate was established.

For SPME, aliquots of 10 μL of samples were placed in a 10 mL vial. It was sealed with an aluminium cap furnished with PTFE-faced septa. Samples were allowed to equilibrate for 30 min before the SPME fibre (PDMS/ DVB) was exposed to the headspace (HS-SPME) for 15 min at room temperature. Once the exposure period had finished, the fibre was retracted into the needle of the holder syringe and immediately inserted into the GC injection port. Figure 1 shows a scheme of the SPME process. Desorption time was set at 5 min and desorption temperature was kept at 260 $^{\circ}\text{C}$. To avoid potential contamination and memory effects on the fibre, blanks were periodically run during the analysis. GC-MS analysis was carried out. Two replicates of each sample were processed.

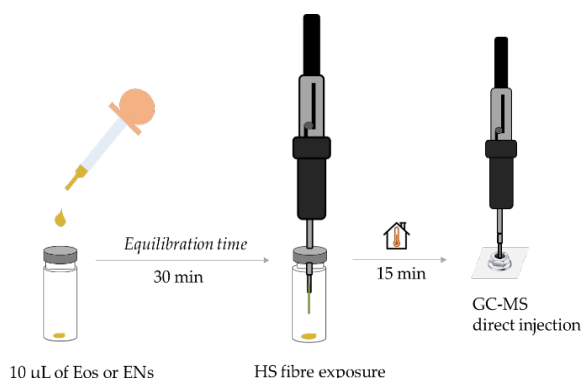


Figure 1. SPME procedure.

2.4. GC-MS analysis

The GC-MS analysis was performed using an Agilent 7890A chromatograph coupled to an Agilent 5975C inert mass spectra detector (MSD) with a triple-axis detector and an Agilent 7693 autosampler from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Two chromatographic columns were used. The first column was a low-

polarity ZB-Semivolatiles (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) from Phenomenex (Torrance, CA, USA), operated with an oven temperature program that applies 50 °C (held 3 min) to 200 °C at 4 °C min⁻¹, and a final ramp to 290 °C at 20 °C min⁻¹ (held 3 min) (total run time: 50 min); the second column was a polar J&W Scientific DB-WAX 128-7052 (50 m × 0.20 mm i.d., 0.2 μm film thickness) from Agilent Technologies, applying an oven program from 50 °C (held 3 min) to 240 °C at 4 °C min⁻¹ (held 5.5 min), with a total run time of 56 min. Helium (purity 99.999%) was employed as carrier gas at a constant flow of 1.0 mL min⁻¹ (first column) and 0.8 mL min⁻¹ (second column), and the injection temperature was 270 °C and 240 °C, respectively. The injection volume was 1 μL for direct injection. The mass spectrometer detector (MSD) was operated in the electron impact (EI) ionization positive mode (+70 eV). The ion source temperature was 150 °C. The temperature of the transfer line was set at 290 °C and 240 °C for the first and second columns, respectively.

Full Scan (FS) acquisition mode was employed, monitoring mass/charge (*m/z*) fragments between 30–800. The identification of the compounds was performed by comparison (match > 80%) between the obtained experimental MS spectra and those provided by the spectral library database (NIST MS Search 2.0).

3. Results and discussion

3.1. Direct injection GC-MS analysis

The analysis of the diluted samples using the two columns, shows a large number of compounds present in each sample. The overall data were examined by comparing the identified compounds using both columns, evaluating their concordance with the information contained in the SDS and, as a final objective, seeking to identify group phytochemicals (trees and flowers). All this, considering the list of 82 substances highlighted as contact allergens by SCCS [9].

Despite the widespread use of low polarity columns in the analysis of EOs by GC-MS, the higher polarity column allowed a better separation of the sample components.

A minimum of 28 compounds in the Clove buds and Indian Sandalwood EOs and a maximum of 85 compounds in the Laurel leaves EO were identified. The group of flower EOs is characterized by sharing more than 50 components common to all of them, while the group of tree EOs present a more differentiated composition according to their origin.

The allergenic content among the EOs and NEs varies notably, ranging from apparently innocuous essential oils such as Cedar super (with zero allergens present) to others such as Ylang ylang extra that contains 14 allergens (see Figure 2). The number of allergens vary according to the sample and is independent of the flower or tree origin. In this way, although more allergens were found in the flowers EOs, some EOs from trees contain a large number of allergenic substances, as is the case of the Cinnamon leaves EO.

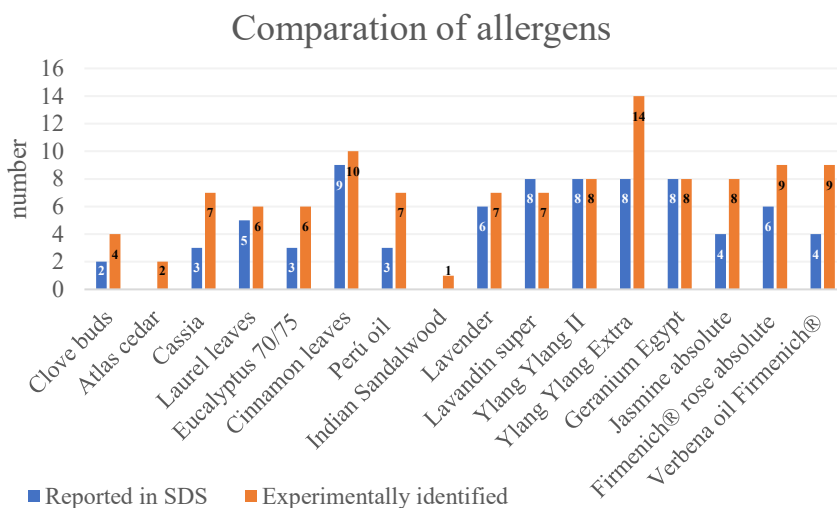


Figure 2. Comparison of the number of allergens reported (blue) and identified (orange).

The use of phytomarkers for the presence of a certain EO can greatly facilitate the quality control of cosmetic products containing this EO in their ingredients. Some compounds were identified in a single sample and could therefore be used as unique markers for the presence of a certain EO in a cosmetic product with a label indicating the content of that EO in its composition, facilitating the detection of fraud in the case of its absence. Other compounds could act as origin group markers if they are present only in EOs extracted from trees or flowers.

In samples from the flower group, a higher proportion of compounds unique to the species of origin have been identified and are therefore not useful as markers of the flower group. Furthermore, most of these compounds are not recognized allergens and therefore do not require control monitoring. Therefore, it seems more interesting to look for group phytomarkers among the compounds whose control is necessary because they are recognized allergens [9]. Figure 3 shows a comparison between the frequency of reporting a particular allergen according to the group.

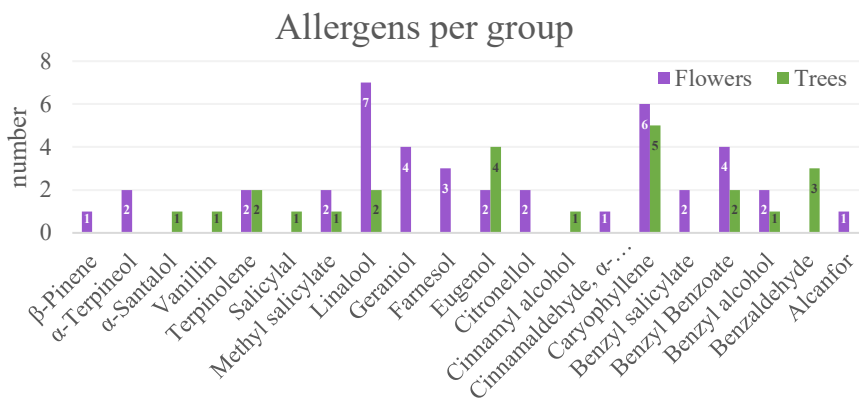


Figure 3. Comparison of the number of allergens between groups: flowers (violet) and trees (green).

Figure 3 also shows that most of the allergens found are ubiquitous substances that do not allow differentiation between groups but show

the abundance of allergens in the EOs. Those found only in the flowers group were β -pinene, α -terpineol, geraniol, farnesol, citronellol, α -hexyl-cinnamaldehyde, benzyl salicylate and alcanfor. For the trees group the allergens found were α -santalol, vanillin, salicylal, cinnamyl alcohol and benzaldehyde.

In terms of the occurrence frequency of substances with allergenic potential in the EO samples, the most common allergens are caryophyllene (appearing 5 times in the tree group and 7 times in the flower group), while others are present only once (alcanfor and cinnamaldehyde in flowers; vanillin and α -santalol in trees). Regarding allergen markers in the specific samples, the following stand out: salicylal and cinnamaldehyde in Cassia, vanillin in Perú oil, α -santalol in Indian sandalwood, levomenthol in Geranium Egypt, α -hexyl-cinnamaldehyde in Jasmine absolute and citral in Rose absolute. These facts support the need to characterize the allergenic composition and regulate the use of EOs as natural preservatives due to their potential adverse effects. In addition, allergens with the highest relevance as sample or group markers were identified.

It is important to highlight the discordance between the SDS and the results found experimentally regarding the presence of allergens in the samples. In general, the samples contain more allergens than declared. Some examples are the EOs of Atlas cedar or Indian sandalwood, whose data sheets do not mention any allergen, and in whose samples L- α -terpineol and limonene, and α -santalol, respectively, were found. Table 3 shows the allergens composition of the samples and its agreement with the samples SDS.

Table 3. Allergens identified in the samples. Italics mark their agreement with the safety data sheets.

Compound	Identification by GC-MS analysis
Benzyl alcohol	<i>Jasmine absolute, rose absolute, Perú oil, Ylang ylang II, Ylang ylang extra</i>
Benzyl benzoate	<i>Jasmine absolute, cinnamon leaves, Perú oil, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, verbena oil</i>
Benzyl cinnamate	<i>Perú oil, Ylang ylang extra</i>
Benzyl salicylate	<i>Ylang ylang II, Ylang ylang extra, jasmine absolute</i>
Camphor	<i>Lavender, lavandin super</i>
Cinnamaldehyde	<i>Cassia</i>
Cinnamyl alcohol	<i>Cassia, cinnamon leaves, Ylang ylang extra</i>
Citral	<i>Rose absolute</i>
Citronellol	<i>Rose absolute, geranium Egypt, eucalyptus</i>
Eugenol	<i>Jasmine absolute, rose absolute, clove buds, laurel leaves, cinnamon leaves, Ylang ylang extra, cassia, Perú oil</i>
Farnesol	<i>Rose absolute, Ylang ylang II, Ylang ylang extra</i>
Geraniol	<i>Rose absolute, geranium Egypt, lavender, lavandin super, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, verbena oil, eucalyptus</i>
Limonene	<i>Atlas cedar, cassia</i>
Linalool	<i>Jasmine absolute, lavender, lavandin super, laurel leaves, cinnamon leaves, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, verbena oil, clove buds, eucalyptus, geranium Egypt, rose absolute</i>
Terpinen-4-ol	<i>Eucalyptus, Perú oil, rose absolute</i>
Terpinolene	<i>Cinnamon leaves, laurel leaves, eucalyptus, lavender, lavandin super, Ylang ylang extra, geranium Egypt, verbena oil</i>
α -Terpineol	<i>Lavender, lavandin super, laurel leaves, eucalyptus, cinnamon leaves, Perú oil, Ylang ylang extra, verbena oil</i>
β -Caryophyllene	<i>Clove buds, geranium Egypt, lavender, lavandin super, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, cinnamon leaves, cassia, laurel leaves, eucalyptus, rose absolute, verbena oil</i>
β -Pinene	<i>Cinnamon leaves, lavender, lavandin super, Ylang ylang II, Ylang ylang extra, verbena oil</i>

Four allergens (linalyl acetate, α -pinene, coumarin and isoeugenol) are listed in the SDS, but their presence was not detected in the screening. In some cases, this may be the result of the CAS indicated

by the SDS could really correspond to a racemic mixture, but others were not found in the experimental procedure.

3.2. HS-SPME-GC-MS analysis

The volatile composition of the 17 samples of EOs and NEs was analyzed by HS-SPME followed by GC-MS analysis. Identification of the volatile allergens present in the samples and their concordance with the information provided by the safety data sheets were then performed.

As expected, SPME, although extracted a lower number of compounds than direct injection of samples, allowed identification of more compounds per sample than those listed in the SDS. Regarding the volatile allergenic substances present, the cinnamon leaves EO stands out with 14 substances.

4. Conclusions

This work provides the basis for the identification of EOs and NEs in cosmetic products applicable both to the quality control of raw materials and to the detection of possible fraud in procurement and/or labelling. The identification of the allergenic content of 17 samples of EOs and NEs revealed that all samples contained more allergenic substances than those declared in the corresponding safety data sheets. Although the list of samples to be considered could be extended, the results obtained support the creation of a list of specific plant markers for samples obtained from trees or flowers.

Author contributions

Conceptualization, L.R. and M.L.; methodology, L.R.; software, A.P. and L.R.; validation, L.R. and M.L.; formal analysis, L.R.; investigation, A.P. and L.R.; resources, C.G-J. and M.L.; data curation, L.R. and M.L.; writing—original draft preparation, L.R.; writing—review and editing, C.G-J. and M.L.; visualization, M.L.; supervision, C.G-J. and M.L.; project administration, C.G-J. and M.L.; funding

acquisition, C.G.-J. and M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was supported by project *ED431B 2020/06* (Galician Competitive Research Groups, Xunta de Galicia, Spain). The authors L.R. and C.G.-J. belong to the CRETUS Strategic Partnership (*ED431E 2018/01*). This study is based upon work from the Sample Preparation Study Group and Network, supported by the Division of Analytical Chemistry of the European Chemical Society. All these programs are co-funded by FEDER (EU).

References

- [1] Klaschka, U. Natural personal care products-analysis of ingredient lists and legal situation. *Environ. Sci. Eur.* 2016, 28(1), 1-14.
- [2] Halla, N; Fernandes, I.P.; Heleno, S.A.; Costa, P.; Boucherit-Otmani, Z.; Boucherit, K.; Rodrigues, A.E.; Ferreira, I.C.F.R.; Barreiro, M. F. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules.* 2018, 23, 1571.
- [3] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, *Eur. Off. J.* L342 (2009) 59–209. Available online <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=OJ:L:2009:342:FULL&from=EN> (accessed on 5 October, 2022).
- [4] Antignac, E.; Nohynek, G. J.; Re, T.; Clouzeau, J.; Toutain, H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 324–341.
- [5] Mahesh, S.K.; Fathima, J.; Veena, V.G. Cosmetic Potential of Natural Products: Industrial Applications. In: *Natural Bio-Active CompoundS*; Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Eds.; Springer, 2019; Volume 2, pp. 215–250.

- [6] Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Neng, N.; Nogueira, J.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind. Crops. Prod.* 2013, 43, 587-595.
- [7] Sell Ch. *Perfumery Materials of Natural Origin*. In: *The Chemistry of Fragrances*, 2nd ed, RSC, 2006.
- [8] Tiên, D.; Francis, H.; Sylvain, A.; Fernandez, X. Authenticity of essential oils. *TrAC*. 2014, 66, 146-157.
- [9] SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety): Opinion on Fragrance allergens in cosmetic products, 26-27 June 2012. Available online https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_102.pdf (Accessed 5 October, 2022).
- [10] Belhassen E.; Bressanello, D.; Merle, P.; Raynaud, E.; Bicchi, C.; Chaintreau, A.; Cordero, C. Routine quantification of 54 allergens in fragrances using comprehensive two-dimensional gas chromatography-quadrupole mass spectrometry with dual parallel secondary columns. Part I: Method development. *Flavour Fragr. J.* 2018, 33, 63-74.
- [11] Rey, A.; Corbi, E.; Pérès, C.; David, N. Determination of suspected fragrance allergens extended list by 2DGC-MS in ready-to-inject samples. *J. Chrom A.* 2015, 1404, 95-103.
- [12] Desmedt, B.; Canfyn, M.; Pype, M.; Baudewyns, S.; Hanot, V.; Courselle, P.; De Beer, J.O.; Rogiers, V.; De Paepe, K.; Deconinck, E. HS-GC-MS method for the analysis of fragrance allergens in complex cosmetic matrices. *Talanta*. 2015, 131, 444-451.
- [13] Tranchida, P.Q.; Maimone, M.; Franchina, F.A.; Bjerk, T.R.; Zini, C.A.; Purcaro, G.; Mondello, L. Four-stage (low-)flow modulation comprehensive gas chromatography-quadrupole mass spectrometry for the determination of recently-highlighted cosmetic allergens. *J Chrom A.* 2016, 1439, 144-151.

- [14]Cosmetic Ingredient Database. Available online https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosmetic-ingredient-database_en. (accessed on 5 October, 2022).
- [15]European Commision (EC). No 2006/257/CE: Commission Decision of 9 February 2006 amending Decision 96/335/EC establishing an inventory and a common nomenclature of ingredients employed in cosmetic products. Available online <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/db30de80-11f8-4358-b1d6-e38d6cf96625> (accessed on 5 October, 2022).

4.2.

***Sourcing new ingredients for organic cosmetics:
phytochemicals of *Filipendula vulgaris* flower extracts***

Laura Rubio, M^a del Carmen Valiño, M^a Jesús Expósito, Marta Lores,
Carmen Garcia-Jares

Sourcing new ingredients for organic cosmetics: phytochemicals of *Filipendula vulgaris* flower extracts

L. Rubio^{1,2}, M.C. Valiño^{3,4}, M.J. Expósito^{3,4}, M. Lores², C. Garcia-Jares^{1,2}

¹CRETUS, ²Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions (LIDSA), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain.

³Milhulloa S.Coop.Galega. Lugar Coto 1, E-27204, Palas de Rei, Lugo, Spain.

⁴Cosmética Muuhlloa SL. Lugar de Cumbraos 1, E-27215, Monterroso, Lugo, Spain.

ABSTRACT

Plants extracts are well known for their beneficial cosmetic properties, based on bioactive phytochemicals with highly demonstrated antimicrobial and antioxidant capacities as phenolic compounds. This work presents the polyphenolic characterization of different extracts from organically grown *Filipendula vulgaris*. An ultrasound-assisted extraction procedure is proposed for obtaining ethanolic extracts at laboratory level, both from dried and fresh plants, to be compared with those obtained by classical flower processing techniques for cosmetic purposes. Individual quantification of target phenolic compounds was carried out by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Results revealed the presence of 24 phenolic compounds in the analyzed samples, reaching concentrations from 0.1 to 71.64 $\mu\text{g g}^{-1}$. The total phenolic content (TPC), ranging from 1163 to 6114 mg GAE L⁻¹, and the antioxidant activity (AA), from 6 to 52 mmol TRE L⁻¹, were also evaluated. Differences could be established according to the plant material and to the extraction technique.

Keywords: polyphenols, plant extracts, ultrasound-assisted extraction, total phenolic content, antioxidant activity, liquid chromatography, tandem mass spectrometry.

1. Introduction

In recent years, social demand for greener and more sustainable trends in cosmetic formulations using natural origin ingredients has been increasing. Plant extracts are a good source of natural ingredients, traditionally used, but new scientific evidence confirm this fact [1]. In addition, the movement towards circular economy schemes is becoming prevalent. In this sense, extraction alternatives are emerging to recover and reuse byproducts from the agri-food and forestry industries [2,3]. This innovative concept involves alternative uses of both co-products and sub-products generated in commercial exploitation, as well as plants previously cultivated for other purposes (for spices and infusions) or even other wild plants with untapped uses. Thus, the application of plant-derived by-products as ingredients in cosmetics is a current trend [4]. Indeed, if these residues come from organic agriculture, they constitute an even more valuable source.

Filipendula vulgaris is a perennial plant belonging to the family *Rosaceae* with pinkish-white flowers, growing wild in Europe, Asia, and north-west Africa, mainly on dry non-acidic grasslands and sunny slopes [5]. Different parts of this plant (including flowers, stems, and underground organs such as rhizomes with tuberous roots) have been used as raw materials in traditional medicine [6], given the rich phenolic content of this genus [7] and the evidence of anti-inflammatory, anti-rheumatic, and diuretic activity. In some cases, a certain beneficial property is associated with a specific plant part [8]. More recently, new aspects of their biological activity, such as antioxidant capacity, have become the subject of scientific interest [9]. *Filipendula vulgaris* is an important source of different secondary metabolites with beneficial activities for human health. Due to dynamic changes in agricultural land use, the native habitats of this species are gradually disappearing, so the decrease of natural resources requires its introduction into cultivation [10] and, clearly, for environmental concerns, in line with the necessary reduction in the use of synthetic fertilizers and phytosanitary products and the introduction of sustainable crops, organic farming is the best option.

The effect of harvest time on the yield and quality of different parts of the plant, especially considering leaves and underground organs [11] has been studied, but flowers were not considered. In this case, polyphenolic analysis was carried out by high performance liquid chromatography with UV-Vis detector (HPLC-UV). Other studies focused on evaluating the effects of the antioxidant and anti-inflammatory properties, among others, of lyophilized *Filipendula* flowers infusions, in parallel with research on its active components by HPLC with diode array detector (DAD) [12]. HPLC-DAD was also used to determine phenolic compounds in methanolic extracts of above-ground and underground organs from both fresh and dried cultivated plant samples [13]. Finally, in addition to exploring anti-inflammatory effects and antioxidant properties, two research papers introduced mass spectrometry in their analysis of methanolic extracts of air-dried aerial parts and roots obtained by maceration [14] and extracts isolated by different extraction techniques and solvents depending on the plant material [15].

Plant extracts can be obtained by classical methods such as hydrodistillation, but other mechanisms including extractions and macerations are also frequently used. The International Organisation for Standardisation (ISO) adopts definitions for alcoholate and hydrolate [16]. While alcoholate is defined as a distillate resulting from the distillation of natural raw material (plant origin) in the presence of ethanol in varying concentrations, hydrolate is an aqueous distillate remaining after steam distillation and separation of the essential oil whenever possible.

In this study, *Filipendula vulgaris* organically grown in Galicia (NW Spain) was considered. Extracts were obtained from this species to be added as ingredients in cosmetics, providing it an organic seal.

Therefore, the goal of this work is the investigation of the polyphenolic profile of different extracts of *Filipendula vulgaris* flowers, both obtained at industrial level (hydrolates and alcoholates) and at laboratory scale. A green, fast, and low-cost sample preparation strategy based on ultrasound-assisted extraction (UAE) was assessed for obtaining extracts from fresh, dried, and frozen plants at laboratory

level. Individual quantification of target phenolic compounds was carried out by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Other indexes such as the total polyphenolic content (TPC) and the antioxidant activity (AA) were also evaluated. Finally, based on the results, the main differences between the considered extracts were discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

The target phenolic compounds, their CAS numbers, molecular masses, retention times and MS/MS transitions are summarized in Supplementary Table S1. The solvent used for the extraction process was ethanol of MS grade and was supplied by Scharlab (Barcelona, Spain). MS-grade methanol obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany), MS-grade ultrapure water purchased from Scharlab and formic acid obtained from Merck (Darmstadt, Germany) were used to prepare the mobile phase for chromatographic analysis. Folin–Ciocalteu’s phenol reagent and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox®) were purchased from Sigma–Aldrich, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was supplied by TCI (Tokyo Chemical Industry) (Tokyo, Japan) and sodium carbonate (Na_2CO_3) was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). All chemicals and reagents were of analytical grade.

2.2. Plant material

Organically grown *Filipendula vulgaris* flowers fresh samples, the corresponding dried samples after drying in an industrial oven at a temperature of 35 °C, and the derived hydrolates and alcoholates were supplied by Milhulloa (S.Coop.Galega, Galicia, Spain). While hydrolates are obtained by the classical steam distillation procedure, alcoholates were produced by maceration in an organic wheat alcohol during seven days and after that, it was filtered. In both cases the starting material was dried sample. The flower samples correspond to two different harvests: the dried one is from 2021 and the fresh from

2022. Extracts were stored protected from light and dried samples into the original paper bags in a non-humid place until their analysis. Fresh flowers were processed immediately after collection, and the remaining sample was frozen, with the aim of repeating the extraction of the frozen sample after one week.

2.3. Sample preparation

Before the extraction process, the *Filipendula vulgaris* sample (fresh, dried, or frozen) was passed through a glass mortar to facilitate its breakup. Afterwards, 0.200 g sample was exactly weighed into a 10 mL glass vial and 2 mL of solvent (ethanol) was added. The vial was sealed with an aluminum cap furnished with PTFE (polytetrafluoroethylene)-faced septa and immersed in an ultrasound bath (US, J Selecta (Barcelona, Spain)) for 10 min at 50 kHz and room temperature. The obtained extract was then filtered through 0.22 μm PTFE filters. Each extraction was performed in duplicate. In addition, an extraction blank was also made for each sample. The dilution of the extracts needs to be assessed. All solutions were stored in the freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The experimental procedure is summarized in Figure 1.

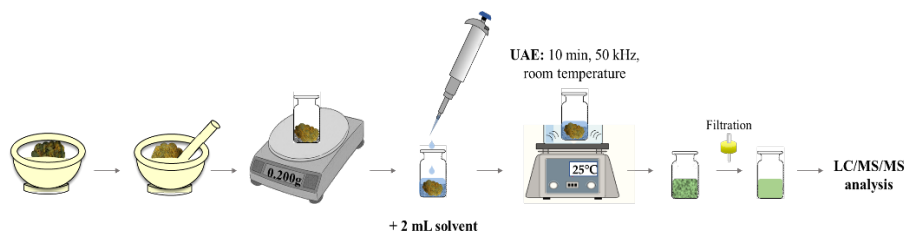


Figure 1. Schematic representation of the UAE experimental procedure.

2.4. Determination of TPC

The total polyphenolic content (TPC) of the extracts was determined according to the Folin–Ciocalteu (FC) colorimetric method described by Singleton and Rossi [17] and following Zhang's guidelines for microtitration in 96-well plates [18]. Briefly, a total of 20 μL of diluted extract is mixed with 100 μL of FC reagent (1:10, v/v) and 80 μL of

sodium carbonate solution (7.5 g L^{-1}). The mixture is shaken and isolated in the dark for 30 min and then the absorbance at 760 nm is measured in a microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). The TPC was quantified by a calibration curve prepared with gallic acid standard solutions covering a concentration range between 20 to 160 mg L^{-1} ($0.200 - 0.800 \text{ abs}$, $R^2 = 0.9986$). TPC was expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE) per liter of extract (mg GAE L^{-1}).

2.5. Determination of AA

The antioxidant activity (AA) of the different extracts was determined by the DPPH method [19], using the description by Symes et al. [20]. Briefly, $100 \mu\text{L}$ of the extracts at 8 different concentration levels were placed in a 96-well plate and mixed with $100 \mu\text{L}$ of DPPH reagent prepared in methanol. The mixture was kept in the dark for 10 min and the absorbance measurement was performed at 515 nm. The AA was quantified using a calibration curve prepared with Trolox® (3 to 31 mg L^{-1} (0.200 to 0.800 abs), $R^2 = 0.9984$). The AA was expressed as millimoles Trolox® equivalent (TRE) per liter of extract (mmol TRE L^{-1}).

2.6. LC-MS/MS analysis

The quantification of the polyphenols in the extracts was performed by LC-MS/MS employing a Thermo Scientific (San José, CA, USA) instrument based on a TSQ Quantum Ultra™ triple quadrupole mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) source, and an Accela Open autosampler with a $20 \mu\text{L}$ loop. The optimal instrumental conditions for the detection of the target phenols were adapted from those previously optimized by Celeiro et al. [2]. The chromatographic separation was achieved on a Kinetex C18 column ($2.6 \mu\text{m}$, $100 \times 2.1 \text{ mm}$) with a guard column (SecurityGuard™ ULTRA Holder) obtained from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The injection volume was $10 \mu\text{L}$ and the column temperature was set at $50 \text{ }^\circ\text{C}$. The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B), both

containing 0.1% formic acid. The eluted program started with 5% of B (held 5 min), going up to 90% of B over 11 min (held 3 min). Then, initial conditions were reached back in 6 min. The mobile phase flow rate was 200 L min⁻¹. The total run time for each injection was 20 min. The mass spectrometer and the HESI-II source were working simultaneously in the positive and negative mode (see ionization mode for each target compound in Table S1). Selected reaction monitoring (SRM) acquisition mode was implemented monitoring 2 or 3 transitions per compound (see Table S1), for an unequivocal identification and quantification of the target compounds. Additionally, new compounds were added to the optimized method [2], reaching the total of 55 compounds analyzed. The MS/MS parameters for all new compounds were optimized by individual direct infusion and the most abundant collision-induced fragments were considered for quantification. In all cases, good linearity with coefficients of determination (R^2) higher than 0.9863 were obtained (see Table S1). The system was operated by Xcalibur 2.2 and Trace FinderTM 3.2.

3. Results and discussion

3.1. TPC and AA

For all the extracts considered (industrial hydrolyte, industrial alcoholate, and extracts of fresh, frozen, and dry flowers at laboratory level), TPC and AA were measured. The obtained values are summarized in Table 1.

Table 1. Mean TPC and AA values for the studied extracts: alcoholate, ultrasonic extracts from fresh, frozen, and dried samples.

Extract	FD ¹	TPC (mg GAE L ⁻¹)	FD	AA (mmol TRE L ⁻¹)
Alcoholate	16	1163 ± 50	128	6 ± 1
Fresh sample extract	60	3599 ± 82	1024	52 ± 3
Frozen sample extract	60	3034 ± 95	512	35 ± 2
Dried sample extract	64	6114 ± 24	1024	45 ± 4

¹FD: Dilution factor

It is important to note that the TPC and AA values of the pure hydrolate (without dilution) were not listed in Table 1 because none of them were quantifiable.

Regarding the TPC measurements, the values obtained for the fresh and frozen sample extracts were similar, around 3000 mg GAE L⁻¹. Notably, about twice of that value was obtained for the dried sample, showing the dried flower extract the highest TPC value. However, the results were different for the AA. The value for the fresh sample was close to the dried one and higher than for the frozen sample. Alcoholate exhibited lower values for both TPC and AA.

3.2. Chromatographic analysis

In view of the high TPC and AA values, their polyphenolic profile was determined by LC-MS/MS. The analysis revealed that the *F. vulgaris* extracts studied contain several classes of phenolic compounds, mainly different types of flavonoids, but also phenolic acids and aldehydes. A total of 24 individual phenolic compounds were identified, and their quantification is detailed in Table 2.

As in the section on spectrophotometric indexes, hydrolate has not been included in the table because no polyphenols have been found in this type of sample. Despite having aromatic odors due to the content of volatile compounds, hydrolates do not contain a traceable polyphenolic charge. The explanation is based on the method for obtaining the hydrolate, since it is a steam current distillation, and given the thermolability of the polyphenols, they do not pass into the hydrolate. Therefore, their addition to cosmetics, despite incorporating other properties derived from the compounds they contain such as aromatisers, cannot be attributed with the beneficial properties of polyphenols.

Table 2. Mean concentration (n =3) of phenolic compounds ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in the different extracts of *Filipendula vulgaris* (the highest concentrations, >10 ppm, are marked in bold).

Phenolic compound	Mean concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Alcoholate	Fresh sample extract	Frozen sample extract	Dried sample extract
Gallic acid	20.97 ± 1.22	7.60 ± 0.03	6.03 ± 0.34	63.17 ± 4.02
Phloroglucinic acid	1.29 ± 0.51	0.53 ± 0.12	0.41 ± 0.02	4.22 ± 0.17
3,4-dihydroxybenzaldehyde	N.D.	N.D.	N.D.	1.40 ± 0.004
Genhisic acid	N.D.	N.D.	N.D.	0.24 ± 0.03
3- hydroxybenzoic acid				
4-hydroxybenzoic acid ^a	0.71 ± 0.06	N.D.	N.D.	N.D.
Procyanidines B1, B2 and C1 ^a	0.09 ± 0.005	0.85 ± 0.02	0.33 ± 0.04	0.88 ± 0.08
Catechin	1.40 ± 0.08	7.51 ± 0.01	3.60 ± 0.03	2.91 ± 0.01
Resorcylic acids ^b	0.57 ± 0.01	0.91 ± 0.05	0.73 ± 0.02	1.09 ± 0.02
4-Hydroxybenzaldehyde	0.29 ± 0.001	N.D.	N.D.	N.D.
Caffeic acid	0.49 ± 0.002	0.43 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.50 ± 0.001
4-hydroxycinnamic acid	0.69 ± 0.001	N.D.	N.D.	0.88 ± 0.01
Quercetin-3-glucuronide	N.D.	N.D.	N.D.	1.18 ± 0.03
Quercetin-3-glucoside	N.D.	N.D.	N.D.	71.64 ± 0.17
Ellagic acid	2.74 ± 0.04	6.53 ± 0.22	4.48 ± 0.19	8.62 ± 0.04
Rosmarinic acid	0.14 ± 0.002	N.D.	N.D.	0.17 ± 0.004
Astragalin	11.26 ± 0.25	40.80 ± 0.43	39.32 ± 0.45	17.42 ± 0.39
Quercetin	37.72 ± 2.98	33.24 ± 0.27	38.14 ± 0.07	46.14 ± 0.90
Naringenin	0.45 ± 0.02	0.34 ± 0.005	1.19 ± 0.02	0.63 ± 0.001
Luteolin	0.95 ± 0.06	1.09 ± 0.05	1.57 ± 0.06	1.13 ± 0.03
Kaempferol	10.57 ± 0.79	9.46 ± 0.14	15.63 ± 0.23	12.31 ± 0.05

^aQuantified as sum of the individual compounds. ^bQuantified as sum of the individual isomers (γ and α); N.D.: not detected.

As can be seen, up to 12 different polyphenols were found at least in all the extracts, highlighting the presence of quercetin, astragalin and gallic acid. The highest number of polyphenols was detected in the dried sample extract that also showed mostly the highest individual concentrations (see Figure 2).

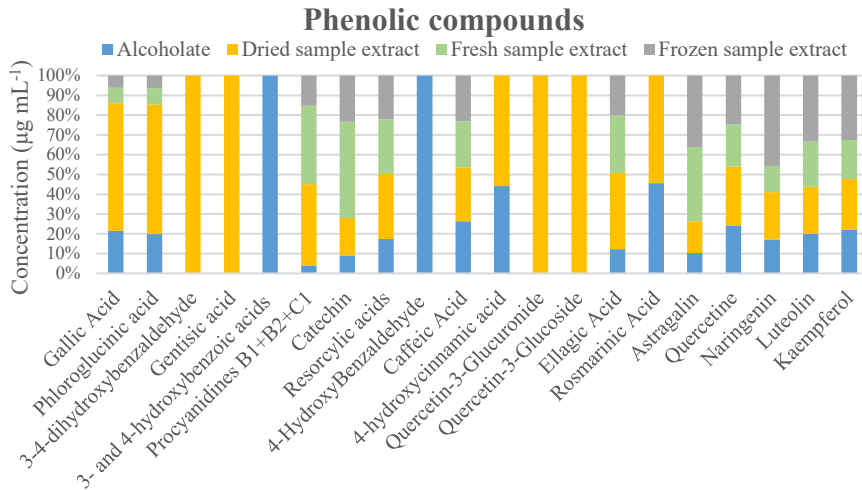


Figure 2. Distribution of polyphenols in the different samples studied.

Figure 3 shows the major polyphenols recovered in the different extracts. The most significant phenolic compounds in the alcoholate were quercetin, gallic acid, astragalín and kaempferol, all higher than 10 ppm (see Table 2). In addition, 3- and 4-hydroxybenzoic acids and 4-hydroxybenzaldehyde were only present in this sample.

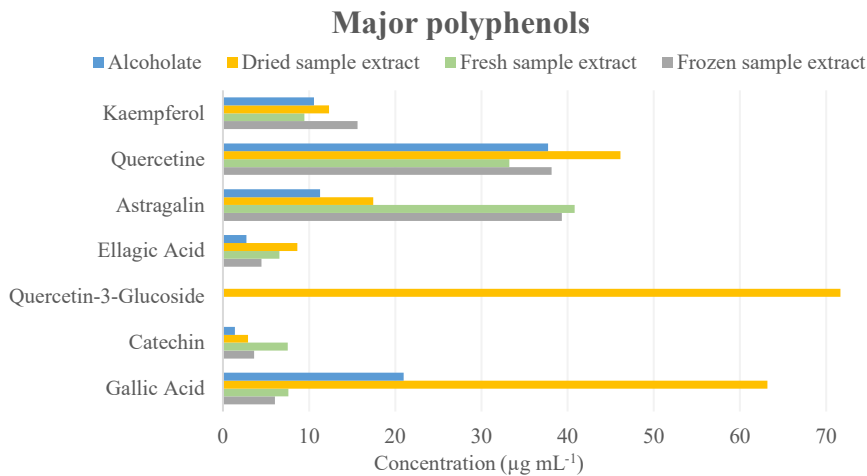


Figure 3. Major polyphenols in the different considered extracts.

The composition of the extracts obtained from the fresh and frozen samples is similar regarding the concentration of the identified compounds. For the dried sample extract, in addition to the common majority compounds, the highest concentration of quercetin-3-glucoside can be highlighted, and this compound was found exclusively in this extract.

Finally, the achieved chromatographic results consistently support the values obtained for the spectrophotometric indexes (TPC and AA). In general, polyphenols concentration in alcoholate was smaller, which explains its lower indexes. The highest number of compounds identified was in the dried *Filipendula* extract and the level of individual polyphenols, similar or greater than in the rest of the samples, was reflected in the higher TPC and AA values of this extract. The major contribution of some specific polyphenols in the fresh *Filipendula* extract, such as catechin or astragalín, could explain its higher antioxidant activity. In this sense, it is important to note that some studies have shown that structure-activity relationships play an extremely important role in determining if compounds will exhibit an antioxidant effect [21,22]. Therefore, antioxidant activities can vary significantly between different classes of compounds, even among those of the same type [23].

Five *Filipendula* compounds found in this work, namely the phenolic acids gallic and ellagic, catechin, quercetin and astragalín, have been also found in methanolic extracts of air-dried samples of *Filipendula* underground organs in different stages of development [11]. The presence of three components already reported in the previous work (gallic acid, ellagic acid and astragalín) as well as quercetin-3-glucoside were also determined in infusions of the lyophilized flowers of *Filipendula vulgaris* [12]. As in the present study, quercetin-3-glucoside showed the highest concentration. Significantly, each compound isolated from a particular part of the *Filipendula* plant has specific biological activities associated [8]. In other study that included flowers, in addition to the phenolics mentioned previously, kaempferol

was also identified [13]. Finally, regarding the works which used mass spectrometry, in the first one 11 polyphenolic compounds have been found using standards and other derivatives substances were tentatively identified [14]. In this work, seven compounds of the identified were confirmed. The second study concluded that the quantitative distribution of the compounds identified in the extracts analyzed depended on the extraction solvent applied, but in general, the highest amount determined was in the methanolic extract [15]. A total of 18 polyphenolic compounds and derivatives were determined, four of them corresponding to some of those already mentioned and considered here. However, to the authors' knowledge, other polyphenols such as hydroxybenzoic acids or procyanidins in flower extracts have never been previously reported.

Finally, it is important to note that some differences found between the extracts obtained from dried and fresh (and corresponding frozen) samples may be due to other factors such as harvest year or climate. In general, the study demonstrated that *F. vulgaris* retains a wide range of polyphenols with health benefits and consequently, extracts derived from the plant can be considered as a promising source of ingredients for use in cosmetics.

4. Conclusions

The research conducted within this study provided information about the phytochemical characterization of *Filipendula vulgaris* flowers. It was shown that there are differences in the chromatographic profiles and consequently in the TPC and AA values of the different extracts considered. The drying process that the company generally uses for the processing and storage of botanical species is suitable for preserving and concentrating their bioactive polyphenol content. In addition, the obtained results suggest that the inclusion of an ultrasound-assisted extraction step can increase the concentration of some substances of interest, being also a technique compatible with the criteria of organic cosmetics. The LC-MS/MS analysis allowed the identification and

quantification of 24 phenolic compounds. This analysis highlights the presence of some polyphenols at concentration levels up to 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Most of the identified compounds present antioxidant, antimicrobial, and other interesting properties, demonstrating that these extracts could be an interesting option for their use in cosmetic industry.

Author contributions

Conceptualization, M.L., C.G-J. and L.R.; methodology, L.R.; software, L.R.; validation, M.L., C.G-J. and L.R.; formal analysis, M.L., C.G-J. and L.R.; investigation, L.R.; resources, M.L. and C.G-J.; data curation, M.L., C.G-J. and L.R.; writing—original draft preparation, L.R.; writing—review and editing, M.L. and C.G-J; visualization, M.C.V., M.J.E., M.L. and C.G-J.; supervision, M.L. and C.G-J.; project administration, M.C.V., M.J.E., M.L. and C.G-J.; funding acquisition, M.C.V., M.J.E., M.L. and C.G-J.

Funding

This work was supported by the projects *ED431B 2020/06* (Galician Competitive Research Groups, Xunta de Galicia, Spain) and *FEADER 2021/058A* (Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia, Spain). The authors L.R. and C.G.-J. belong to the CRETUS Strategic Partnership (*ED431E 2018/01*). This study is based upon work from the Sample Preparation Study Group and Network, supported by the Division of Analytical Chemistry of the European Chemical Society. All these programs are co-funded by FEDER (EU).

References

- [1] Mahesh, S.K.; Fathima, J.; Veena, V.G. Cosmetic Potential of Natural Products: Industrial Applications. In: Natural Bio-Active Compounds; Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Eds.; Springer, 2019; pp. 215–250.

- [2] Celeiro, M.; Lamas, J.P.; Arcas, R.; Lores, M. Antioxidants Profiling of By-Products from Eucalyptus Greenboards Manufacture. *Antioxidants* 2019, 8, 263.
- [3] Celeiro, M.; Lamas, J.P.; Arcas, R.; Lores, M. Wood processing industry by-products as a source of natural bioactive compounds. *Energy Environ.* 2021, 32(6), 981-1001.
- [4] Barbulova, A.; Colucci, G.; Apone, F. New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics* 2015, 2(2), 82-92.
- [5] Weidema, I.R.; Magnussen, L.S.; Philipp, M. Gene flow and mode of pollination in a dry-grassland species, *Filipendula vulgaris* (*Rosaceae*). *Heredity*. 2000, 84 (3), 311–320.
- [6] Radulović, N.; Mišić, M.; Aleksić, J.; Đoković, D.; Palić, R.; Stojanović, G. Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. *Fitoterapia*. 2007, 78, 565–570.
- [7] Olennikov, D.N.; Kruglova, M.Y. A new quercetin glycoside and other phenolic compounds from the genus *Filipendula*. *Chem. Nat. Compd.* 2013, 49, 610-616.
- [8] Sharaf, M.; Kotb, E.R. Phytoconstituents of *Filipendula vulgaris* Moench and Their Biological uses: A Review. *Egypt. J. Chem.* 2022, 13, 14.
- [9] Smirnova, G.V.; Vysochina, G.I.; Muzyka, N.G.; Samoylova, Z.Y.; Kukushkina, T.A.; Oktyabrsky, O.N. Evaluation of antioxidant properties of medical plants using microbial test systems. *World J. Microb. Biot.* 2010, 26 (12), 2269–2276.
- [10] Bączek, K.; Przybył, J.L.; Kosakowska, O.; Węglarz, Z. Introducing Wild-Growing Medicinal Plants into Cultivation: Dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench)—A Rich Source of Phenolic Compounds. In: *Medicinal Plants. Sustainable Development and Biodiversity*; Ekiert, H.M., Ramawat, K.G., Arora, J., Eds.; Springer, 2021; Volume 28, pp. 33-53.

- [11] Capecka, E.; Geszprych, A.; Przybył, J.L.; Kunicki, E.; Binder, A.; Bączek, K.; Węglarz, Z. Accumulation of phenolic compounds in underground organs of dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench). *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. 2012, 11(4), 101-109.
- [12] Samardžić, S.; Arsenijević, J.; Božić, D.; Milenković, M.; Tešević, V.; Maksimović, Z. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. *J. Ethnopharmacol.* 2018, 213, 132-137.
- [13] Bączek, K.; Cygan, M.; Przybył, J.L.; Kosakowska, O.; Węglarz, Z. Seasonal variation of phenolics content in above-and underground organs of dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench). *Herba Pol.* 2012, 58(3).
- [14] Katanić, J.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Mihailović, V.; Boroja, T.; Pan, S.P.; Nikles, S.; Kretschmer, N.; Rosić, G.; Selaković, D.; Joksimović, J.; Bauer, R. Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of *Filipendula vulgaris* Moench extracts. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 122, 151-162.
- [15] Pukalskienė, M.; Venskutonis, P.R.; Pukalskas, A. Phytochemical composition and antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients. *J. Funct. Foods*. 2015, 15, 233-242.
- [16] ISO 9235:2021(en) Aromatic natural raw materials — Vocabulary. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en:sec:3.1> (accessed 10 October, 2022).
- [17] Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vit.* 1965, 16, 144–158.
- [18] Zhang, Q.; Zhang, J.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, DA.; Barrow, CJ. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 2006, 18, 445–450.

- [19] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* 1995, 28, 25–30.
- [20] Symes, A.; Shavandi, A.; Zhang, H.; Ahmed, I.A.M.; Al-Juhaimi, F.Y.; Bekhit, A.E.D.A. Antioxidant Activities and Caffeic Acid Content in New Zealand Asparagus (*Asparagus officinalis*) Roots Extracts. *Antioxidants* 2018, 7, 52–65.
- [21] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20(7), 933-956.
- [22] Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 22(5), 749-760.
- [23] Yokozawa, T.; Chen, C.P.; Dong, E.; Tanaka, T.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.* 1998, 56(2), 213-222.

Supplementary material

Table S1. Phenolic compounds identified: CAS number, molecular mass (Mm), retention time (Rt), ionization mode, MS/MS transitions and coefficients of determination (R²).

Phenolic compound	CAS	Mm (g mol ⁻¹)	Rt (min)	Ionization mode ^a	MS/MS transitions ^b	R ²
Galllic acid	149-91-7	170.1	2.34	-	<u>169.02</u> → <u>125.04</u> (17) 169.02 → 153.1 (15)	0.9965
Phloroglucinic acid	71989-93-0	188.1	3.28	+	<u>168.98</u> → <u>150.99</u> (17) 168.98 → 83.02 (23) 168.98 → 107.02 (22)	0.9945
3,4-dihydroxybenzaldehyde	139-85-5	138.1	4.69	+	<u>137.07</u> → <u>136.11</u> (21) 137.07 → 91.09 (24) 137.07 → 92.13 (25)	0.9948
Gentisic acid	490-79-9	117.1	4.85	+	<u>152.96</u> → <u>108.00</u> (24) 152.96 → 81.02 (21) 152.96 → 109.01 (16)	0.9949
3- hydroxybenzoic acid	99-06-9	138.1	5.23	-	<u>136.94</u> → <u>93.07</u> (14) 136.94 → 65.10 (24) 136.94 → 91.01 (32)	0.9969
4-hydroxybenzoic acid	99-96-7	138.1	5.24	-	<u>137.00</u> → <u>93.00</u> (17) 137.00 → 65.00 (27)	0.9985
Catechin	18829-70-4	290.3	5.25	-	<u>289.01</u> → <u>245.02</u> (17) 289.01 → 203.12 (22) 577.03 → 407.06 (26)	0.9868
Procyanidin B1	20315-25-7	578.5	5.30	-	<u>577.03</u> → <u>288.93</u> (25) 577.03 → 424.98 (26)	0.9958
γ-resorcylic acid ^c	303-07-1	154.1	5.54	+	<u>153.00</u> → <u>109.05</u> (17) 153.00 → 65.09 (21) 153.00 → 135.02 (16)	0.9996
Procyanidin B2	29106-49-8	578.5	5.74	-	<u>577.03</u> → <u>407.06</u> (26) 577.03 → 288.93 (25) 577.03 → 424.98 (26)	0.9946
4-Hydroxybenzaldehyde	123-08-0	122.1	5.75	+	<u>122.97</u> → <u>95.05</u> (13) 122.97 → 51.10 (36) 122.97 → 77.05 (20)	0.9887
Caffeic acid	331-39-5	180.2	6.11	-	<u>178.98</u> → <u>135.03</u> (19) 178.98 → 134.01 (28)	0.9876

a “-” and “+” indicate negative and positive ionization modes, respectively. b Underlined MS/MS transition used for quantification purpose. c Isomers.

Table S1. (cont) Phenolic compounds identified: CAS number, molecular mass (Mm), retention time (Rt), ionization mode, MS/MS transitions and coefficients of determination (R²).

Phenolic compound	CAS	Mm (g mol ⁻¹)	Rt (min)	Ionization mode ^a	MS/MS transitions ^b	R ²
Procyanidin C1	37064-30-5	866.8	6.30	-	577.03 → 288.93 (25) 577.03 → 407.07 (26) 577.03 → 424.98 (26)	0.9994
4-hydroxycinnamic acid	501-98-4	164.2	7.29	+	163.02 → 119.07 (18) 163.02 → 93.07 (37)	0.9951
Quercetin-3-glucuronide	22688-79-5	478.4	9.54	+	163.02 → 117.05 (38) 479.09 → 461.50 (14) 479.09 → 302.96 (18)	0.9955
Quercetin-3-glucoside	482-35-9	464.4	9.80	+	465.07 → 256.90 (41) 465.07 → 302.97 (14)	0.9924
Ellagic acid	476-66-4	302.2	10.05	-	301.00 → 145.1 (39) 301.00 → 185.1 (29) 301.00 → 173.1 (36)	0.9916
Rosmarinic acid	20283-92-5	360.3	10.29	-	359.07 → 161.1 (23) 359.07 → 133.1 (42) 359.07 → 135.1 (38)	0.9954
Astragalin	480-10-4	448.4	11.15	-	447.09 → 284.1 (28) 447.09 → 255.1 (40) 447.09 → 227.1 (49)	0.9960
Quercetin	117-39-5	302.2	11.81	+	303.09 → 229.10 (28) 303.09 → 153.04 (33)	0.9863
Naringenin	480-41-1	272.3	12.04	+	273.00 → 119.00 (20) 273.00 → 147.00 (20)	0.9902
Luteolin	491-70-3	286.2	12.09	-	285.04 → 199.00 (20) 285.04 → 175.00 (20) 285.04 → 241.00 (20)	0.9930
Kaempferol	520-18-3	286.2	12.40	-	285.07 → 184.91 (30) 285.07 → 239.12 (35)	0.9883

^a “-” and “+” indicate negative and positive ionization modes, respectively. ^b Underlined MS/MS transition used for quantification purpose. ^c Isomers.

V. DISCUSIÓN XERAL

Os estudos realizados durante esta tese doutoral relaciónanse con matrices cosméticas, pero adicionalmente poden ser agrupados en catro áreas diferentes, así como indican os títulos dos capítulos. Por un lado, a análise de ingredientes en cosméticos de maneira xeral; doutra banda, un achegamento ás novas formulacións que xorden no sector como son os cosméticos con características consideradas extremas ou aqueles produtos fronteirizos ou *borderline*. Afondando nestes últimos, varios estudos xiraron en torno ás tatuaxes e ás tinturas capilares temporais obtidas a partir de pigmentos naturais, como son a henna e a jagua. Finalmente, tamén se consideraron aceites esenciais (AEs) e extractos naturais (ENs) como posibles conservantes alternativos en formulacións de beleza e coidado persoal.

A selección dos analitos obxectivo foi proposta segundo o seu uso, presenza e contido nas matrices de interese. Así, fíxose unha escolla dun grupo extenso de ingredientes cosméticos e impurezas dos mesmos, abarcando dende hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), plastificantes, conservantes, glicois e derivados a principios activos, fragancias alerxénicas reportadas e compostos polifenólicos presentes, entre outros.

En todo o traballo presentado nesta tese, a extracción e as diferentes etapas de preparación da mostra xogan unha parte moi relevante, porque as matrices cosméticas contan cunha gran complexidade e, a miúdo, coa presenza de impurezas. Deste xeito, este paso é crucial en química analítica e ten que ser axeitado tanto para os analitos e a matriz como para a técnica de análise empregada posteriormente.

As metodoloxías analíticas utilizadas nos estudos incluídos nesta tese baseáronse globalmente en cromatografía acoplada a espectrometría de masas (MS). O tipo de cromatografía, de gases (GC) ou líquida (LC), foi seleccionado dependendo da aplicación e/ou os compostos obxectivo. Ademais, diferentes enfoques metodolóxicos que implicaron o uso doutros detectores cromatográficos, e outras técnicas

espectrométricas e espectrofotométricas, foron tamén postos en práctica.

Esta sección recolle os aspectos do traballo experimental e unha discusión breve dos resultados obtidos para cada capítulo, comparando os estudos incluídos en cada un. Ademais, tamén se proporciona unha discusión xeral das metodoloxías desenvolvidas durante a presente tese.

1. Determinación de ingredientes en cosméticos

Os cosméticos son matrices complexas que están constituídas por un gran número de compostos químicos. Ademais, poden conter impurezas procedentes das materias primas ou xeradas durante o proceso de fabricación. Para garantir a saúde humana, calquera produto cosmético ten que cumprir a Regulación europea vixente (CE No 1223/2009), na cal se recollen compostos restrinxidos e prohibidos. Entre as familias de compostos non desexados ou restrinxidos en cosméticos, atópanse hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), pesticidas, plastificantes, nitrosaminas, alquilfenois (APs) derivados de etoxilatos de alquilfenol (APEOs), entre outros. Tendo en conta esta gran cantidade de ingredientes que poden estar presentes, é preciso o desenvolvemento dunha metodoloxía fiable que permita controlalos nunha ampla gama de produtos. E aquí, dada a complexidade e diversidade das matrices cosméticas, a preparación da mostra xoga un papel moi importante na súa análise.

Neste contexto, propúxose unha estratexia multi-obxectivo baseada nunha técnica de preparación de mostra miniaturizada denominada micro-dispersión da matriz en fase sólida (μ -MSPD) para determinar unha ampla gama de compostos prohibidos ou non desexados en cosméticos e produtos de coidado persoal. En función das propiedades fisicoquímicas dos analitos obxectivo, elixiuse entre cromatografía de gases (GC) ou cromatografía de líquidos (LC) para levar a cabo a posterior análise. Así, a maioría dos compostos estudados eran volátiles ou semivolátiles polo que a GC foi a técnica de separación axeitada. As excepcións foron os APs e APEOs, ao tratáranse de

compostos menos volátiles e tamén máis polares, polo que a súa análise realizouse mediante LC. Empregáronse detectores selectivos para determinar niveis de traza ou impurezas, dado que ofrecen a sensibilidade e selectividade necesarias e todas as condicións cromatográficas foron optimizadas. Deste xeito, seleccionouse espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para os APEOs e os prohibidos APs, traballando en modo de seguimento de reaccións seleccionadas (SRM). Por outro lado, a espectrometría de masas (MS) seguiu a GC para a análise dos compostos das demais familias mencionadas, na modalidade de monitorización de ións seleccionados (SIM), monitorizando 2 ou 3 fragmentos de masa/carga (m/z) para cada composto, para lograr deste xeito unha identificación inequívoca.

Así, os métodos baseados na μ -MSPD seguida de GC-MS ou LC-MS/MS permitiron a determinación dun total de 57 ingredientes individuais en cosméticos. Aplicouse un procedemento de preparación da mostra anteriormente optimizado no seo do grupo de investigación para outro tipo de compostos como son as fragancias, filtros UV ou conservantes no mesmo tipo de mostras. É importante resaltar que, dado que os plastificantes son unha das familias obxectivo, durante este procedemento experimental e na medida do posible, todo o material de plástico foi substituído por outro de vidro ou metálico, previamente acondicionado a alta temperatura 12 horas antes de ser usado. Avaliouse a linealidade e validáronse ambas metodoloxías en termos de parámetros de calidade analítica (exactitude e precisión) para amosar a súa idoneidade na aplicación tanto en cosméticos de aclarado (*rinse-off*) como de permanencia (*leave-on*). Amosaron unha axeitada precisión con desviacións estándar relativas (RSD) inferiores ao 9 e 11% para a repetibilidade e reproducibilidade do método μ -MSPD-GC-MS e por debaixo do 10% para ambos parámetros empregando μ -MSPD-LC-MS/MS. Para avaliar a exactitude das metodoloxías propostas, realizáronse estudos de recuperación seleccionando para isto dúas mostras cosméticas: un xel de ducha (*rinse-off*) e unha crema de mans (*leave-on*). Os valores de recuperación atopáronse entre 72 e 116% para

a metodoloxía GC-MS e entre 83 e 106% para a que utilizou LC-MS/MS.

Finalmente, cómpre sinalar que en comparación con outras metodoloxías analíticas baseadas en GC-MS, o enfoque μ -MSPD-GC-MS proposto presentou uns límites de detección (LOD) máis baixos (ata dúas ordes de magnitude) que os publicados para a análise de PAHs ou nitrosaminas empregando extracción sólido-líquido. Aconteceu o mesmo cos LOD cotexando con outros estudos que usan LC nos que empregan extracción asistida por ultrasóns e detección de fluorescencia ou extracción sólido-líquido seguida de LC-MS/MS. Ademais, outras vantaxes do procedemento μ -MSPD proposto son que precisa pouco disolvente orgánico e a inclusión dun paso de limpeza *in situ* evita outros pasos de preparación de mostra.

Por outra banda, os éteres de glicol preséntanse como disolventes eficaces, axentes redutores da viscosidade ou de acoplamento, favorecendo a miscibilidade en cosméticos e produtos de coidado persoal. O Regulamento europeo CE No 1223/2009 recolle como permitida a presenza de algúns éteres de glicol e os seus acetatos derivados, e dependendo do tipo de cosmético e zona de aplicación do mesmo, as concentracións permitidas legais varían. Non obstante, outros destes compostos catalóganse como perigosos para a saúde humana, por efectos tóxicos na reprodución ou teratoxénicos. Os glicois constitúen os principais precursores dos éteres de glicol, estando algúns deles permitidos como ingredientes en produto cosmético final, mentres que outros están presentes en trazas tecnicamente inevitables durante o proceso da súa fabricación. Para garantir a saúde do consumidor, son indispensables métodos analíticos para detectar as concentracións máximas permitidas así como trazas destes compostos prohibidos e os seus derivados. Para este fin, optimizáronse dous enfoques diferentes.

Mentres que traballos anteriores empregaron extracción sólido-líquido requirindo pasos de limpeza adicionais, propuxéronse alternativas baseadas na extracción asistida por ultrasóns (UAE) ou μ -

MSPD. Estas implicaron procedementos experimentais menos laboriosos, con menor consumo de tempo e disolvente, achegándose máis aos principios da *Química Analítica Verde*. En canto á separación cromatográfica, os compostos obxectivo contan con certa polaridade e as técnicas máis empregadas foron LC e GC, pero, na maioría dos casos, involucran un paso de derivatización previo. Para evitar este paso lento e laborioso, propúxose levar a cabo a determinación mediante GC utilizando unha columna de alta polaridade que permite a análise directa dos extractos obtidos. Esta opción aporta unha alta selectividade para os analitos polares e permite separacións e resolucións de picos satisfactorias. Empregouse un detector sensible como é a espectrometría de masas (MS), operando en modo SIM, monitorizando 3 ou 4 fragmentos de m/z para cada composto para acadar unha identificación inequívoca.

Deste xeito, desenvolvéronse dous procedementos baseados en UAE e μ -MSPD seguidos de GC-MS para analizar simultaneamente 17 glicois e compostos derivados, incluíndo éteres de glicol e os seus acetatos. Ambas metodoloxías propostas foron validadas en termos de linealidade, límites de detección (LOD), precisión (repetibilidade e reproducibilidade) e exactitude, amosando resultados axeitados en todos os casos. Os valores de RSD foron inferiores ao 10%, excepto o valor inter-día para o tetrametilenglicol (TMG) que foi do 14% e o correspondente intra-día para o éter dimetil de trietilenglicol (TEGDME) do 13%. Os estudos de recuperación realizáronse empregando dúas mostras cosméticas: unha crema hidratante de mans (*leave-on*) e un xel de ducha (*rinse-off*), verificando previamente a ausencia dos compostos obxectivo para evitar a sobreestimación dos resultados. Os valores medios de recuperación foron semellantes para ambas metodoloxías, oscilaron entre 91 e 109%, mentres que aqueles valores individuais para cada tipo de mostra e técnica de extracción acháronse entre 79 e 116%, demostrando a elevada eficacia dos métodos. Os LOD foron lixeiramente inferiores para μ -MSPD, quizais se pode explicar dado que os extractos obtidos resultan máis limpos co

paso de limpeza *in situ* e, en calquera caso, todos inferiores a 0,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ e por debaixo dos requisitos do Regulamento CE No 1223/2009 de cosméticos. Isto permite detectar niveis traza dos compostos considerados. Comparando con outros procedementos analíticos que tamén inclúen o uso de GC-MS, os métodos UAE e μ -MSPD-GC-MS propostos presentaron LOD máis baixos en cosméticos e produtos similares.

Finalmente, as dúas metodoloxías validadas son igualmente adecuadas para a análise dos compostos de interese nas formulacións cosméticas, polo que poden ser aplicadas indistintamente a mostras reais. Escolléronse diferentes produtos para amosar a idoneidade da metodoloxía proposta, entre elas un xabón líquido, outro xabón sólido e un leite corporal destinado a nenos. Os resultados de UAE-GC-MS revelan que só tres dos 17 compostos obxectivo foron atopados, incluíndo dous glicois (etilenglicol, ETG e dietilenglicol, DEG) e un éter de glicol (éter monoetílico de dietilenglicol, DEGEE). Se ben é certo que os seus nomes non aparecían nas etiquetas dos produtos analizados, cumpren cos requisitos da normativa de cosméticos vixente.

2. Análise de cosméticos *extremos* e produtos *borderline*

O sector cosmético renóvase continuamente ante a inxente demanda de cosméticos por parte da sociedade, xurdindo deste xeito formulacións innovadoras. Algúns destes produtos posúen efectos magnificados e características que poden ser consideradas extremas, incluíndo maquillaxe de longa duración, notablemente impermeables, funcións prolongadoras ou rizadoras, efecto tatuaxe etc. Por outra banda, outra categoría cunha crecente demanda é a dos denominados produtos *borderline*, tamén chamados límite ou fronteirizos, que non son categorizados estritamente como cosméticos e poden considerarse tamén como xoguetes, biocidas, produtos farmacéuticos ou dispositivos médicos. Tanto os cosméticos *extremos* como os produtos *borderline*, ao igual que todos os outros cosméticos, deben cumprir o Regulamento europeo CE No 1223/2009 para garantir a seguridade do produto e a

saúde dos consumidores. Dado que o cumprimento legal ten que ser comprobable analiticamente, é necesaria unha metodoloxía apropiada para levar a cabo esta avaliación.

Os enfoques multianalito resultaron ser os máis útiles para o control dos cosméticos *extremos*. Ademais de contar coa complexidade das matrices cosméticas, e polo tanto, coa necesidade dun axeitado tratamento da mostra antes da súa análise, é relevante comentar que certos cosméticos contan con dispositivos de aplicación que poden cederlle ao cosmético substancias non desexadas. Porén, débese demostrar que non hai migración destas ao produto cosmético. Polo tanto, desenvolvéronse tres enfoques diferentes de procedementos baseados na extracción asistida por ultrasóns (UAE) para a análise dun total de 70 ingredientes cosméticos, abarcando plastificantes, fragancias e conservantes frecuentes nunha ampla gama de cosméticos *extremos e borderline*. Optimizouse un método de UAE para toallíñas (englobadas na categoría *límite*), no cal se introduce toda ou unha parte da toallíña no vial para realizar a extracción e tamén se empregou unha modificación da técnica, UAE con soporte (*Supported-UAE, Sup-UAE*) para valorar a posible transferencia de plastificantes dende o aplicador ao propio cosmético. Na *Sup-UAE*, a mostra cosmética non se introduce directamente, senón que foi impregnada ou depositada nun anaco de papel de filtro que posteriormente era introducido no vial. Tras experimentos preliminares, o acetato de etilo foi seleccionado como disolvente ao obter a maior eficiencia de extracción. De novo, como aconteceu no traballo comentado anteriormente, na parte experimental tamén se fixo a substitución de material de plástico por outro metálico ou de vidro para evitar a posible contaminación por plastificantes, ao seren estes unha das familias de compostos de estudo. En todos os casos, a determinación cromatográfica posterior realizouse mediante GC con detector de espectrometría de masas (MS), operando en modo SIM, comprobando tres ións por composto para conseguir a súa identificación.

Os métodos foron validados acadando unha boa linealidade e con valores de LOD no nivel de baixos ppb (ng mL^{-1}), excluindo catro compostos: farnesol, diisooftalato (DIHP), diisodecilftalato (DIDP) e ftalato de diisononil (DINP), aínda que os seus LOD tamén estaban no rango de ng mL^{-1} . Para avaliar a precisión e exactitude da UAE, escolléronse tres tipos representativos de toallíñas (para limpar a zona de cueiros, facial e hidratante para o rostro). Os resultados amosaron valores RSD inferiores a 15% e valores medios do estudo de recuperación na maioría dos casos preto do 98%. No caso da *Sup-UAE*, para efectuar os estudos de recuperación, elixiuse unha mostra de crema de células con aplicador, obtendo valores satisfactorios para todos os compostos estudados en torno ao 100% de media e valores de RSD por debaixo do 5%. Finalmente, para demostrar que o papel de filtro empregado como soporte non inflúe no proceso de extracción *Sup-UAE*, colocouse un trisco de papel de filtro cos compostos obxectivo. Obtivéronse porcentaxes de recuperación entre 80 e 108% e valores de RSD menores ao 10% para a maioría dos compostos estudados, demostrando que estes non son absorbidos durante o procedemento. Así, probouse a adecuación dos enfoques para a determinación simultánea de diferentes analitos en distintos tipos de produtos cosméticos.

As metodoloxías deseñadas aplicáronse a 50 mostras reais, comprendendo 30 produtos considerados da cosmética extrema (deliñadores e sombras de ollos, máscaras de pestanas, lapis de células, cremas faciais con diferentes efectos) e outros 20 clasificados como *borderline* (toallíñas húmidas, desmaquillantes e para bebés, máscaras faciais, inxeccións de beizos, adhesivos decorativos tanto para uñas como tatuaxes temporais ou xeles íntimos lubricantes). Concretamente, a *Sup-UAE* foi empregada cos deliñadores de ollos, máscaras de pestanas, inxeccións de beizos voluminizadoras ou cos adhesivos das tatuaxes temporais. Mentres que para algúns produtos non se acharon diferenzas significativas entre a utilización de UAE e *Sup-UAE*, para aquelas substancias máis volátiles como as fragancias, resultou mellor

o uso de UAE. Non obstante, ambas técnicas poden verse complementarias cando se tratan cosméticos que contan con aplicadores. A cantidade total de plastificantes extraída por *Sup*-UAE foi maior, o que demostra que os aplicadores son unha fonte adicional destes compostos e mesmo que algúns deles proceden exclusivamente do dispositivo. No total de produtos cosméticos acháronse cinco plastificantes (dous deles prohibidos), 20 fragancias alerxénicas e catro almiscres sintéticos e tamén catro conservantes en combinación co antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) na maioría dos casos.

Tres cosméticos, incluíndo un *extremo* e dous *borderline*, foron analizados por un procedemento de extracción baseado en μ -MSPD validado por integrantes do grupo de investigación. Os resultados comparáronse cos obtidos mediante UAE, detectando os mesmos compostos por ambas técnicas e sen diferenzas estatisticamente significativas entre as súas concentracións.

Finalmente, tamén se realizou un estudo de etiquetaxe co obxectivo de comprobar se a información reflectida nos produtos considerados era correcta e completa segundo recolle o Regulamento CE 1223/2009. Atopouse que un 23% dos cosméticos clasificados como *extremos* e un 75% dos produtos fronteirizos incumprían na etiquetaxe dos ingredientes, e incluso seis dos *borderline* carecían de etiqueta.

3. Caracterización de tatuaxes e tinturas capilares temporais

As tatuaxes e tinturas capilares temporais son alternativas populares ás permanentes e existen tendencias recentes que apuntan cara produtos a base de pigmentos naturais. O caso máis coñecido é o da henna pero tamén emerxeu outra opción como é a jagua. A henna contén lawsona como ingrediente principal e a jagua, xenipina e xenipósido. Estas tatuaxes temporais poden considerarse, ao igual que os adhesivos, como produtos límite e deben cumprir simultaneamente coa regulación de cosméticos pero tamén seguir as directrices do manual de produtos *borderline* así como outros regulamentos, coma o específico de xoguets. A henna foi valorada en tinturas capilares,

concluindo que era segura en certas preparaci3ns, pero a3nda non se publicaron normativas sobre pigmentos de base natural para tatuaxes temporais e a maior3a dos produtos comerciais de orixe vexetal non est3n etiquetados. As3, varios motivos como o incremento de uso, dispoñibilidade no mercado en li3a, falta de informaci3n sobre a composici3n na etiqueta do produto e de regulaci3n espec3fica, unha seguridade cuestionable en canto a alerxias e a posibilidade de que os nenos poidan verse afectados, motivan a realizaci3n de varios traballos para analizar estes produtos novidosos.

Nun primeiro momento, desenvolveuse un m3todo anal3tico para identificar e cuantificar os ingredientes activos de henna e jagua en 19 mostras de tatuaxes temporais para verificar a s3a orixe natural e coa intenci3n 3ltima de desenmascarar posibles fraudes nestes produtos. Como nos demais traballos desenvolvidos nesta tese, tendeuse cara a simplificaci3n da etapa de preparaci3n de mostra. Aplic3ronse procedementos sinxelos de diluci3n simple axudada por axitaci3n nun ba3o de ultras3ns para disolver completamente as mostras que se presentaban en forma de pasta l3quida. A an3lise levouse a cabo mediante cromatograf3a l3quida de alta eficacia (HPLC) con detector de diodos (DAD), adquirindo os espectros de absorci3n no rango de 200 a 600 nm. O m3todo HPLC-DAD foi validado en termos de linealidade e precisi3n con valores de RSD medios do 2%. Adicionalmente, dado que a henna natural adoita mesturarse con certa frecuencia con aditivos como a para-fenilendiamina (PPD), tam3n se avaliou a s3a presenza. A pesar de probar varios procedementos de HPLC-DAD validados en literatura, non se obtiveron resultados satisfactorios coa PPD. Por3n, neste traballo, optimiz3ronse as condici3ns de cromatograf3a l3quida de ultra alta eficacia (UHPLC) acoplada a espectrometr3a de masas de alta resoluci3n (HRMS) con cuadrupolo de tempo de voo (QTOF) para o seu estudo, operando en ionizaci3n electrospray (ESI) en modo positivo.

Tras aplicar as metodolox3as 3s mostras reais, confirmouse a ausencia do reco3ecido al3rxeno PPD en todas elas. Mentres que a

xenipina atopouse no total das jaguas e o xenipósido en dúas delas, só unha das hennas analizadas contiña lawsona, o que apunta a que o resto son produtos fraudulentos vendidos como henna natural. Xa se reportaron máis casos de fraudes en henna, pero a porcentaxe de mostras que contiña o ingrediente activo era moi superior ao obtido aquí. Hai que destacar que se incluíron no estudo hennas de cores menos típicas como rosa, laranxa, verde ou azul; mentres que os escasos estudos previamente publicados soamente consideraban hennas de coloracións típicas: negra, marrón ou vermella.

Os resultados acadados revelaron a necesidade de afondar na caracterización de formulacións de base vexetal de henna e jagua. Polo tanto, este foi o obxectivo dos tres traballos que se comentan de seguido, nos que se ampliou o número de mostras temporais a 34, abarcando tatuaxes de jagua, tinturas capilares de henna, tatuaxes de henna e mostras de henna con ambos propósitos (tintura e tatuaxe).

Propúxose unha caracterización integral aplicando agora soamente UHPLC-QTOF-HRMS mediante dúas aproximacións distintas de xeito simultáneo: determinación dos compoñentes activos mencionados anteriormente (análise *target*) e busca de outros constituíntes que poidan conter (análise *non-target*). Respecto ao tratamento de mostra, o propósito foi manter unha manipulación mínima, próxima ao estado no que se comercializan. De novo, realízase unha dilución das mostras (agora englobando mostras en forma de pasta pero tamén outras sólidas en po) e a posterior axitación ultrasónica. O sistema QTOF-MS traballou en ESI e modo negativo para o enfoque dirixido e tanto en negativo como positivo para o correspondente non dirixido. Tras optimizar as condicións cromatográficas do estudo *target*, o método logrou unha boa linealidade, calculáronse os LOD e LOQ e foi validado en termos de precisión con resultados de RSD inferiores ao 5%.

Tras analizar as mostras reais, observouse que tan só un terzo das mostras de henna contiñan lawsona e que só dúas delas eran destinadas a tatuaxes temporais (HT-11 e HT-16), coincidindo coas únicas de

coloración marrón. A xenipina e xenipósido detectáronse nas seis preparacións de jagua consideradas, polo que a metodoloxía de alta resolución supón unha mellora nos LOD respecto á análise específica de xenipósido, xa que na investigación previa con HPLC-DAD só era posible a súa detección na metade de mostras estudadas. Pola outra banda, coa aproximación *non-target*, atopáronse 70 compostos de distinta natureza, incluíndo ácidos carboxílicos e aromáticos, alcohois, compostos de orixe vexetal (terpenoides, flavonoides), azucres, colorantes, entre outros.

A aplicación directa destes cosméticos na pel ou no pelo, fai posible a aparición de diferentes efectos adversos a causa da ampla variedade de substancias químicas implicadas. A maioría dos produtos de tatuaxes e tinturas temporais non están etiquetados e a súa composición e natureza química son moi diversas. Dado que algúns envases indican a inexistencia de metais pesados ou sales metálicas, xorde a idea de incluír unha caracterización da composición inorgánica das mostras de henna e jagua. Para isto, e a partir de aquí, as 34 mostras comerciais divídense en dous grupos segundo o seu estado físico: sólidas e de tipo pasta.

Por un lado, propúxose unha metodoloxía multianalítica, comprendendo fluorescencia de raios X (XRF), difracción de raios X (XRD) e microscopia electrónica de barrido con espectrometría de raios X de dispersión de enerxía (SEM-EDS) para obter información mineralóxica e do grao de homoxeneidade das mostras. Non foi precisa ningunha preparación da mostra para os produtos sólidos, mentres que os de tipo pasta soamente foron secados previamente ao aire antes das análises. O cribado semicuantitativo mediante XRF desvelou a presenza de Al, Si, S, Cl, K, Ca, Ti e Fe nas mostras, aínda que en composicións diferentes segundo os tipos definidos. Ao igual que noutras investigacións previas, tampouco se puideron asociar todas as cores das mostras á presenza de certos elementos. A XRD en po (XRPD) foi aplicada ás mostras sólidas mentres que a microdifracción de raios X (μ -XRD) ás pastas. As substancias identificadas por ambas

técnicas de XRD permitiron establecer diferenzas entre as hennas pasta para tatuaxes e as restantes sólidas (destinadas a tinturas de cabelo e con ambos propósitos). Non obstante, nalgunhas jaguas non se atoparon fases cristalinas, o que pode suxerir un menor contido inorgánico (empregando o enfoque *non-target* mediante UHPLC-QTOF-HRMS, acháranse compostos orgánicos como azucres e outros aditivos sintéticos). SEM-EDS revelou que as mostras de po eran máis heteroxéneas que as pastas e con restos visibles de tecido vexetal. De maneira xeral, os resultados máis destacables foron: as mostras HT-11 e HT-16 resultaron ser claramente diferentes ao resto de pastas en contido (nos estudos anteriores foron as únicas nas que se atopou o ingrediente activo lawsona) e máis similares ás sólidas; a henna branca HT-3 contiña cantidades significativas de Ba e Ti, feito ao que se lle atribuíu a súa cor; diferentes características distinguen as mostras en forma de po das sólidas. Os resultados foron discutidos tendo en conta a actual regulación europea, atopándose compostos permitidos (Cu e Al como colorantes) pero tamén outros prohibidos (Cr e P e os seus derivados).

Por outro lado, aplicouse espectrometría de masas con plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) para caracterizar profundamente os 34 produtos baseados en pigmentos naturais e avaliar o seu contido metálico, estudando 11 elementos (Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Ba e Pb). Foi necesaria unha dixestión ácida antes de someter as mostras á análise, establecendo dous protocolos diferentes segundo o grupo: pastas ou sólidas. Empregouse a calibración mediante adición estándar para levar a cabo a cuantificación. O método foi validado en termos de precisión, acadando valores de RSD por baixo de 6 e 5% para as pastas e as mostras sólidas, respectivamente. Ante a falta de dispoñibilidade de materiais de referencia certificados, realizáronse estudos de recuperación para avaliar a exactitude. Elixíuse unha mostra representativa de cada grupo para levar a cabo ambos estudos. As recuperacións foron excelentes, no rango de 87-118% para as pastas e 97-116% para os pos. Os baixos LOD permitiron encontrar similitudes

e diferenzas entre grupos: os sólidos teñen maior contido metálico e xeralmente en maiores concentracións. O Ba distingue a mostra HT-3 das outras (comentado tamén na anterior aproximación multianalítica) e o Pb diferencia as únicas mostras azuis HT-8 e HT-17. A análise estatística mediante clústeres apoia a clasificación das mostras en grupos e os *outliers* coinciden cos elementos diferenciadores. De acordo aos resultados en Cr, Ni, As, Cd, Co e Pb (elementos prohibidos como ingredientes en cosméticos), ningunha das 34 mostras cumpre co actual Regulamento CE No 1223/2009. Isto suxire a falta de control de calidade destes produtos e a necesidade do mesmo xa que o seu uso continuado pode orixinar potenciais riscos para a saúde dos consumidores.

Todas os enfoques analíticos deste capítulo foron aplicados por primeira vez en mostras de tatuaxes a base de jagua e de maneira máis completa en mostras de tinturas capilares e tatuaxes de henna. Isto permite coñecer información nova e valiosa sobre a composición destes produtos temporais naturais pouco considerados e estudados ata o de agora, e pode axudar a trazar unha normativa específica.

4. Ingredientes naturais en formulacións cosméticas

O uso de ingredientes naturais en produtos cosméticos en resposta ás demandas da sociedade e a substitución doutros ingredientes sintéticos é unha tendencia que medra vigorosamente nos últimos anos. Así e todo, a orixe destes ingredientes non elimina a necesidade da súa análise e control analíticos para garantir a seguridade e cumprimento coa normativa de cosméticos.

Por unha banda, os aceites esenciais (AEs) e extractos naturais (ENs) son empregados cada vez con máis frecuencia en formulacións cosméticas con diversas funcións. Recentemente, utilízanse como aditivos multifuncionais buscando evitar o uso de conservantes de síntese. Isto supón un reto analítico e lexislativo dada a súa complexa composición, que inclúe substancias alerxénicas recoñecidas.

Para seleccionar as mostras obxecto de estudo, tívose en conta a lista de 28 extractos naturais declarados como alérxenos de contacto polo SCCS. Caracterizáronse un total de 17 mostras comerciais de AEs e ENs mediante inxección directa de dilucións das mesmas. Tamén se aplicou a microextracción en fase sólida (SPME) para levar a cabo unha primeira exploración dos compoñentes volátiles. En ambos casos, empregouse a cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), traballando en FS e empregando unha biblioteca de espectros (NIST). Probáronse dúas columnas cromatográficas: unha de polaridade baixa e outra máis polar. A pesar do uso xeneralizado de columnas de baixa polaridade na análise de AEs por GC-MS, neste traballo, a columna de maior polaridade permitiu unha mellor separación dos compoñentes. Atopáronse un gran número de compostos presentes en cada mostra. Ademais da identificación dos compoñentes individuais, o foco púxose na procura dos alérxenos presentes, así como posibles fitomarcadores de AEs e ENs segundo a súa similitude de orixe botánica (árbores ou flores). Respecto aos alérxenos, os datos globais examináronse comparando coa información contida nas fichas de seguridade dos produtos comerciais, revelando un maior contido alerxénico que o reportado en todos os casos, independentemente de se se traballa con inxección directa ou SPME. Os resultados obtidos son útiles para previr e regular o fraude no etiquetado, así como contribuír a mellorar a seguridade dos usuarios de cosméticos que inclúan AEs e ENs na súa formulación.

Por outra banda, os extractos de botánicos constitúen unha fonte de ingredientes naturais coñecidos polas súas potenciais propiedades cosméticas. Isto é debido á presenza de substancias bioactivas, como os compostos fenólicos, que lle confiren capacidades antimicrobianas e antioxidantes e outras características beneficiosas para a saúde e tamén concretamente para a pel. Cada vez son máis frecuentes as demandas da sociedade por produtos cosméticos máis verdes e sustentables. Neste sentido, xorden estratexias alternativas de recuperación de subprodutos agroforestais para obter ingredientes destinados á cosmética. Isto dota

aos produtos dun valor engadido e, ademais, se os residuos vexetais proveñen da agricultura ecolóxica, constitúen unha fonte aínda máis valiosa.

No último traballo, estudáronse diferentes extractos de *Filipendula vulgaris* obtida de cultivo ecolóxico nunha rexión de Galicia, a comarca de A Ulloa. Incluíronse hidrolatos e alcoholatos producidos a nivel empresa mediante procedementos clásicos como hidrodestilación ou maceración, para a súa aplicación en cosméticos dispoñibles no mercado. A nivel laboratorio, propúxose unha metodoloxía simple de UAE para a obtención de extractos etanólicos a partir de flores frescas, secas e conxeladas de Filipéndula. A caracterización analítica dos mesmos levouse acabo mediante LC-MS/MS, traballando en SRM. As condicións instrumentais adaptáronse das optimizadas nun traballo previo no grupo de investigación. Con todo, novos compostos optimizáronse mediante infusión directa individual e incluíronse no método, acadando uns 50 compostos fenólicos obxectivo, incluíndo ácidos, aldehidos, flavonoides (flavonois, flavonas,..), entre outros. Vinte e catro compostos bioactivos foron identificados e cuantificados nos extractos analizados. Ademais, aplicáronse protocolos previamente reportados na literatura para avaliar o contido fenólico total (TPC) e a actividade antioxidante (AA), empregando un espectrofotómetro UV-Vis equipado cun novidoso lector de microplacas. De maneira xeral, os resultados amosaron que os extractos de Filipéndula presentan unha elevada carga polifenólica, destacando a mostra seca. O proceso de secado que a empresa utiliza xeralmente para o procesamento e almacenamento das especies botánicas é axeitado para preservar e concentrar o seu contido en polifenois bioactivos. Ademais, os datos obtidos suxiren que a inclusión dunha etapa de UAE pode aumentar a concentración dalgunhas substancias de interese. Finalmente, do traballo tamén se conclúe que os hidrolatos obtidos pola empresa, a pesar de non presentar contido polifenólico, poden incorporar outras propiedades derivadas dos compostos volátiles ou semivolátiles que

conteñen, polo que sería interesante estudar a presenza de substancias aromáticas.

Finalmente, para pechar esta sección, a continuación coméntanse globalmente os aspectos destacados. Entre as matrices cosméticas consideradas, diferenciáronse mostras de cosméticos tanto de permanencia ou *leave-on* (crema de mans hidratante e loción corporal indicada para nenos) como de aclarado ou *rinse-off* (xel de ducha e xabóns en formatos líquido e sólido), formulacións que responden a características extremas (sombra de ollos resistentes á auga e diferentes máscaras faciais) e outros produtos limítrofes (toallíñas para a zona do cueiro ou calcomanías para a pel). Entre os produtos *borderline*, tamén se consideraron tintas a base de pigmentos naturais como a henna ou a jagua empregadas para realizar tatuaxes temporais ou no caso da henna, tamén para tinturas de pelo alternativas ás permanentes. Mentres que as mostras de jagua eran tipo pasta, as hennas englobaban pastas e sólidas. Finalmente, tamén se analizaron aceites esenciais e extractos naturais diversos potencialmente aplicables como ingredientes en formulacións cosméticas.

Para resumir brevemente, catro técnicas de preparación de mostra (UAE, *Sup*-UAE, μ -MSPD e SPME) aplicáronse ao longo desta tese. Na análise de cosméticos e formulacións extremas e *borderline*, as técnicas preferidas foron UAE e μ -MSPD, sendo ambas verdes e amigables co medio ambiente. A UAE tamén foi empregada para a obtención de extractos a partir dunha planta de cultivo ecolóxico. Por outra banda, a SPME utilizouse para investigar os AEs e ENs dado que ofrece a vantaxe da inxección directa acoplada a cromatografía de gases. Todas estas técnicas de preparación de mostra mencionadas presentan algunhas características en común, partindo dende a súa simplicidade. Os protocolos propuxeron poucos pasos, custo e tempo mínimos, fáciles de implantar e, na medida do posible, o seguimento dos principios da “*Química Verde*” debido ao uso de pequenos volumes

de reactivos, disolventes orgánicos e mostra implicada e á xeración da menor cantidade posible de residuos. Ademais, unha das técnicas empregouse na súa versión miniaturizada (μ -MSPD) e a SPME é de fácil automatización. Amosaron así a súa idoneidade para seren aplicadas ás matrices cosméticas. Pola contra, noutros estudos buscouse minimizar ao máximo esta etapa crítica de preparación de mostra, recorrendo a dilucións simples axudadas nalgúns casos por enerxía de ultrasóns. Así, as mostras analízanse próximas a como son comercializadas. Finalmente, a dixestión ácida foi requirida previamente debido á técnica de análise elixida (ICP-MS).

Por outra banda, as metodoloxías analíticas utilizadas nos estudos incluídos nesta tese demostraron ser apropiadas para os analitos para os cales foron seleccionadas. Baseáronse en cromatografía de gases (GC-MS) ou de líquidos (LC-MS/MS, HPLC-DAD e UHPLC-QTOF-HRMS). Ademais, outras aproximacións implicaron o uso de ICP-MS e técnicas complementarias como XRF, XRD (XRPD e μ -XRD) e SEM-EDS. Finalmente, a espectrofotometría UV-Vis empregouse para avaliar os índices de TPC e AA dos extractos naturais.

En canto aos instrumentos de detección de espectrometría de masas, englobaron aproximacións utilizando tanto baixa (sinxela cun cuadrupolo ou en tándem cun detector de triplo cuadrupolo) coma alta resolución (cuadrupolo-tempo de voo, QTOF). O detector de MS/MS proporciona unha identificación inequívoca dos compostos así como altas selectividade e sensibilidade. A importancia da HRMS vén dada polo seu valor engadido para a identificación de constituíntes non obxectivo (*non-target*) en mostras totalmente descoñecidas, como son as tinturas de cabelo de henna ou as tatuaxes temporais de henna e jagua. HRMS ofrece parámetros de identificación adicional como a masa exacta dos compostos, o seu perfil isotópico, e a posibilidade de contrastar o espectro experimental obtido con bibliotecas de espectros que conteñen fragmentos con masas exactas.

Unha característica común á maioría dos traballos presentados é que constitúen aproximacións metodolóxicas multianalito, mais aló dunha avaliación de certos compostos ou familias concretas deles. Normalmente, é frecuente a aparición conxunta de varios dos compostos das familias estudadas. Polo que, estes enfoques multianalito, ata 70 compostos nalgunha das investigacións, son máis representativos da presenza real dos analitos de interese nas matrices cosméticas e permiten o seu control simultáneo nunha única análise.

Para aquelas metodoloxías analíticas publicadas e presentadas nesta tese nas que isto aplique, foron validadas en termos de linealidade e precisión, mostrando resultados satisfactorios para ambos os dous, inter-día (reproducibilidade) e intra-día (repetibilidade), e acadando baixos límites de detección e cuantificación. Para algúns dos traballos, tamén se levaron a cabo estudos de recuperación a diferentes niveis de concentración, probando a exactitude dos métodos desenvolvidos. Estes foron aplicados a mostras reais e en todos os casos se demostrou a presenza dalgún dos analitos de interese. Ademais, as presenzas e as concentracións observadas foron comentadas tendo en conta a lexislación en vigor aplicable.

VI. CONCLUSIONS

During the development of the present thesis, analytical methodologies were applied to the assessment of a wide variety of analytes in different cosmetic matrices. So, the main objectives initially proposed were achieved:

- Optimization of multi-analyte methodologies, both sample preparation and analysis, for the determination of different ingredients in cosmetic products.
- Address the study of new format cosmetics as well as the possible contamination of their applicators.
- Development of analytical methods and approaches to reach a characterization as complete as possible of the unexplored temporary tattoo and dye samples from natural sources.
- Analysis of the potential application of natural ingredients in cosmetic formulations after determining their chemical composition.

When required, the sample preparation procedures used in this thesis are characterized by their simplicity, speed, and concordance with the principles of *Green Chemistry*, trying to minimize the amount of sample, consumption of solvents, and residues generated. The methods used were ultrasound assisted extraction (UAE) and micro-matrix solid-phase dispersion (μ -MSPD) for cosmetic ingredients applications; and solid-phase microextraction (SPME) for the analysis of different natural extracts. In addition, simple dilutions were applied for temporary dyes and tattoos, except the acid digestion needed for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

The analysis were carried out employing methods based on chromatography, both gas (GC) and liquid chromatography (LC), coupled to mass spectrometry (MS) for a comprehensive qualitative and quantitative determination. Tandem mass spectrometry (MS/MS) and high-resolution mass spectrometry (HRMS) configurations were used. HRMS was especially crucial for the non-targeted analysis of henna and

jagua dye and tattoo products. Diode array detectors coupled to LC as well as other characterization techniques such as X-ray diffraction or X-ray fluorescence (XRD or XRF), scanning electron microscopy coupled to energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS) or Ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry were also used throughout the work covered by this thesis.

The quality parameters of the analytical protocols were evaluated in terms of linearity, repeatability, reproducibility, precision and limits of detection and quantification, obtaining satisfactory results for all applications. Then, the methods were subsequently applied on real samples.

The general conclusions of each chapter are included bellow:

Chapter 1. Determination of ingredients in cosmetics

1.1. Unexpected compounds in cosmetics

- A miniaturized method based on μ -MSPD has been developed for the analysis of unexpected and banned substances (PAHs, pesticides, plasticizers, nitrosamines, and APs derived from APEOs) in *rinse-off* and *leave-on* cosmetics and applied in formulations such as moisturizing hand cream and shower gel.
- The determination techniques were GC-MS and LC-MS/MS, and the methodologies were successfully validated in terms of linearity and precision. These methods also proved to be suitable for detection of target compounds at low ng g^{-1} level.
- The application of these methodologies will allow to ensure the quality of cosmetics and the safety for consumers as well as the compliance with the legislation.

1.2. Simultaneous determination of glycols and derivative compounds

- Two simple, rapid, and environmentally friendly alternative procedures based on UAE and μ -MSPD followed by GC-MS have been proposed for the analysis of glycols and derivatives in *rinse-off* and *leave-on* cosmetics.
- Both methodologies were successfully validated in terms of linearity, repeatability, and reproducibility. Trace levels of the forbidden compounds were detected due to the low LOD achieved.
- Two glycols and one glycol ether were detected in the analyzed cosmetic samples, including liquid and solid soaps and body milk intended for children, complying with the regulations.

Chapter 2. Analysis of *extreme* cosmetics and *borderline* products

- Two ultrasound-based methods (UAE and *Sup*-UAE) were optimized for the extraction of 70 compounds comprising permitted or prohibited unexpected ingredients in cosmetics.
- The proposed UAE-GC-MS approach is fast, simple, and green and met the performance requirements. *Sup*-UAE is complementary and concerns the possible compound migration from the applicators.
- The validated protocol was applied to fifty commercial products, including both *extreme* and *borderline* cosmetics. Most of them fail to comply with either legislation or labelling.

Chapter 3. Characterization of temporary tattoos and hair dyes

3.1. Monitoring of natural pigments

- Methods based on HPLC-DAD and LC-QTOF have been proposed to evaluate the presence of active ingredients and PPD adulteration, respectively, in plant pigment-based tattoo formulations.
- Nineteen real samples were analyzed allowing a rapid recognition between natural based samples and frauds. Only one henna product contained its active ingredient.
- Due to the current regulatory situation and the incorrect or non-existent labelling, the proposed analytical method provides a useful tool to control these commercial products.

3.2. HRMS for comprehensive characterization

- For the first time, a method based on UHPLC-QTOF-MS has been proposed both to evaluate the presence of active constituents (*target*) and to investigate other ingredients or additives (*non-target*) in natural-based tattoo and hair dye products.
- The method has been applied to 34 commercial formulations, finding that while jagua samples are natural based, more than 50% of the products sold as henna are fraudulent.
- A total of 70 unknown compounds were found in these samples, including alcohols, coumarin derivatives, terpenoids and flavonoids, among others.

- Since these products may contain compounds that are banned or restricted in cosmetics, it is important to improve issues such as labelling and regulation.

3.3. Multi-analytical approach for mineralogical composition

- The combined use of h-XRF, XRD and SEM-EDS techniques has allowed the complementary characterization of 34 temporary samples of henna hair dyes and henna and jagua tattoos in relation to their mineralogical and chemical composition. The approach has been applied for the first time to jagua samples.
- Some toxic elements prohibited for their use as ingredients in cosmetics according to the Regulation EC No 1223/2009 were found in the beauty formulations.
- A specific regulation for these *borderline* cosmetics is necessary and, in this sense, the obtained results can support its implementation.

3.4. Elemental profile and heavy metal content

- An ICP-MS methodology has been developed for the characterization of temporary tattoos and hair dyes according to their elemental content.
- The heavy metal variation in the results points to the lack of any control of these products, so extensive quality measures would be recommended for products contacting the skin and hair.

- None of the 34 samples analyzed complies with the current Regulation EC No 1223/2009 according to the measured concentrations of Cr, Ni, As, Cd, Co, or Pb.
- Since most of these products are sold unlabeled and without information, greater control is necessary to ensure consumer safety without causing undesirable side effects.

Chapter 4. Natural ingredients in cosmetic formulations

4.1. Natural extracts and essential oils

- Methodology involving direct injection and SPME followed in both cases by GC-MS have been applied for the analytical characterization of essential oils and natural extracts frequently used as cosmetic ingredients.
- All 17 samples analyzed revealed higher contents of allergenic substances than those declared in their corresponding safety data sheets.
- The results obtained support the creation of a list of specific plant markers for the samples according to the origin group: flowers or trees.

4.2. Extracts from Galician organic crop

- Analysis by LC-MS/MS, in combination with additional spectrophotometric measurements, have been proposed for the evaluation of the polyphenolic content in different extracts of a Galician organic crop of *Filipendula vulgaris*.
- The inclusion of a simple, rapid, and environmentally friendly methodology based on UAE can increase the concentration of some bioactive compounds of interest.

- Due to the phytochemicals contained, highlighting phenolic acids and flavonoids, extracts derived from this plant can be considered as a valuable source of ingredients for use in cosmetics.

Anexo I: Lista de publicacións

- Maria Celeiro, Laura Rubio, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Multi-target strategy to uncover unexpected compounds in rinse-off and leave-on cosmetics, *Molecules*, 26(9) (2021), 2504
DOI: 10.3390/molecules26092504
Impact Factor: **JCR**: 4.927 (2021).
JCR-Q2: Chemistry, Multidisciplinary; Biochemistry & Molecular Biology (2021).
Contribución: Metodoloxía, Investigación, Escritura - revisión e edición.
- Maria Celeiro, Laura Rubio, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Miniaturized sample preparation methods to simultaneously determine the levels of glycols, glycol ethers and their acetates in cosmetics, *Cosmetics*, 8(4) (2021), 102
DOI: 10.3390/cosmetics8040102
Impact Factor: **CiteScore**: 4.2 (2021).
CiteScore-Q2: Dermatology (2021).
Contribución: Investigación, Escritura - revisión e edición.
- Marta Lores, Maria Celeiro, Laura Rubio, Maria Llompart, Carmen Garcia-Jares. Extreme cosmetics and borderline products: an analytical-based survey of European regulation compliance, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 (2018), 7085-7102
DOI: 10.1007/s00216-018-1312-3
Impact Factor: **JCR**: 3.286 (2018).
JCR-Q1: Analytical Chemistry (2018).
Contribución: Investigación, Escritura - preparación do borrador orixinal.

- Laura Rubio, Marta Lores, Carmen Garcia-Jares. Monitoring of natural pigments in henna and jagua tattoos for fake detection, *Cosmetics*, 74(4) (2020), 74

DOI: 10.3390/cosmetics7040074

Impact Factor: **CiteScore**: 3.4 (2020).

CiteScore-Q2: Dermatology (2020).

Contribución: Metodoloxía, Software, Validación, Análise formal, Investigación, Tratamento de datos, Escritura - preparación do borrador orixinal.

- Laura Rubio, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. High-resolution mass spectrometry for the comprehensive characterization of plant pigment-based tattoos and dyes formulations, *Cosmetics*, 8(2) (2021), 55

DOI: 10.3390/cosmetics8020055

Impact Factor: **CiteScore**: 4.2 (2021).

CiteScore-Q2: Dermatology (2021).

Contribución: Metodoloxía, Software, Validación, Análise formal, Investigación, Tratamento de datos, Escritura - preparación do borrador orixinal.

- Laura Rubio, Mafalda Costa, Pedro Barrulas, Marta Lores, Carmen Garcia-Jares, Cristina Barrocas-Dias. Understanding the chemical and mineralogical composition of commercial henna and jagua tattoos and dyes – a multi-analytical approach, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414 (2022), 6233–6246

DOI: 10.1007/s00216-022-04194-1

Impact Factor: **JCR**: 4.478 (2021).

JCR-Q2 (22/87): Analytical Chemistry (2021).

Contribución: Metodoloxía, Software, Validación, Análise formal, Investigación, Tratamento de datos, Escritura - preparación do borrador orixinal.

- Laura Rubio, Pedro Barrulas, Mafalda Costa, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores, Cristina Barrocas-Dias. The chemistry behind the body art: Unveiling the elemental profile and heavy metal content of natural tattoos and dyes by ICP-MS, *RSC Advances*.

Under review for publication

Impact Factor: **JCR**: 4.036 (2021).

JCR-Q2: Chemistry, Multidisciplinary (2021).

Contribución: Metodoloxía, Validación, Análise formal, Investigación, Tratamento de datos, Escritura - preparación do borrador orixinal.

- Laura Rubio, Eugenia Guerra, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores. Body-decorating products: Ingredients of permanent and temporary tattoos from analytical and European regulatory perspectives, *Analytica Chimica Acta*, 1079 (2019), 59-72 (*Review*)

DOI: 10.1016/j.aca.2019.06.052

Impact Factor: **JCR**: 5.977 (2019).

JCR-Q1: Analytical Chemistry (2019).

Contribución: Conceptualización, Investigación, Escritura - preparación do borrador orixinal, Escritura - revisión e edición.

Anexo II: Review

Review

Body-decorating products: Ingredients of permanent and temporary tattoos from analytical and European regulatory perspectives

Laura Rubio, Eugenia Guerra, Carmen Garcia-Jares, Marta Lores

Analytica Chimica Acta, 1079 (2019), 59-72

ISSN: 0003-2670, Elsevier

DOI: 10.1016/j.aca.2019.06.052



Anexo III: Permisos das revistas

- M. Celeiro, L. Rubio, C. Garcia-Jares, M. Lores. Multi-target strategy to uncover unexpected compounds in rinse-off and leave-on cosmetics, *Molecules*, 26(9) (2021), 2504 (*Open Access*)
- M. Celeiro, L. Rubio, C. Garcia-Jares, M. Lores. Miniaturized sample preparation methods to simultaneously determine the levels of glycols, glycol ethers and their acetates in cosmetics, *Cosmetics*, 8(4) (2021), 102 (*Open Access*)
- L. Rubio, M. Lores, C. Garcia-Jares. Monitoring of natural pigments in henna and jagua tattoos for fake detection, *Cosmetics*, 74(4) (2020), 74 (*Open Access*)
- L. Rubio, C. Garcia-Jares, M. Lores. High-resolution mass spectrometry for the comprehensive characterization of plant pigment-based tattoos and dyes formulations, *Cosmetics*, 8(2) (2021), 55 (*Open Access*)

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of all articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low Article Processing Charge (APC) for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

- M. Lores, M. Celeiro, L. Rubio, M. Llompart, C. Garcia-Jares. Extreme cosmetics and borderline products: an analytical-based survey of European regulation compliance, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410 (2018), 7085-7102

License Number	5341321028412	Printable Details	
License date	Jul 03, 2022		
Licensed Content		Order Details	
Licensed Content Publisher	Springer Nature	Type of Use	Thesis/Dissertation
Licensed Content Publication	Analytical and Bioanalytical Chemistry	Requestor type	academic/university or research institute
Licensed Content Title	Extreme cosmetics and borderline products: an analytical-based survey of European regulation compliance	Format	print and electronic
Licensed Content Author	Marta Lores et al	Portion	full article/chapter
Licensed Content Date	Aug 31, 2018	Will you be translating?	no
		Circulation/distribution	1 - 29
		Author of this Springer Nature content	yes
About Your Work		Additional Data	
Title	Estratexias analíticas integrals para novos retos no control da seguridade de cosméticos		
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela		
Expected presentation date	Dec 2022		

- L. Rubio, M. Costa, P. Barrulas, M. Lores, C. Garcia-Jares, C. Barrocas-Dias. Understanding the chemical and mineralogical composition of commercial henna and jagua tattoos and dyes – a multi-analytical approach, *Anal. Bioanal. Chem.*, 414 (2022), 6233–6246 (*Open Access*)

Understanding the chemical and mineralogical composition of commercial henna and jagua tattoos and dyes—a multi-analytical approach

SPRINGER NATURE Author: Laura Rubio et al
 Publication: Analytical and Bioanalytical Chemistry
 Publisher: Springer Nature
 Date: Jul 13, 2022

Copyright © 2022, The Author(s)


Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.
 To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)

- L. Rubio, E. Guerra, C. Garcia-Jares, M. Lores. Body-decorating products: Ingredients of permanent and temporary tattoos from analytical and European regulatory perspectives, *Anal. Chim. Acta*, 1079 (2019), 59-72 (Review)





Body-decorating products: Ingredients of permanent and temporary tattoos from analytical and european regulatory perspectives

Author: Laura Rubio,Eugenia Guerra,Carmen Garcia-jares,Marta Lores

Publication: Analytica Chimica Acta

Publisher: Elsevier

Date: 4 November 2019

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK
CLOSE WINDOW

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and Conditions
 Comments? We would like to hear from you. Email us at customer-care@copyright.com

- L. Rubio, P. Barrulas, M. Costa, C. Garcia-Jares, M. Lores, C. Barrocas-Dias. The chemistry behind the body art: Unveiling the elemental profile and heavy metal content of natural tattoos and dyes by ICP-MS, *RSC Advances*.



RSC Advances

The chemistry behind the body art: Unveiling the elemental profile and heavy metal content of natural tattoos and dyes by ICP-MS

Journal:	RSC Advances
Manuscript ID:	RA-ART-09-2022-006126
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	28-Sep-2022
Complete List of Authors:	Rubio Lareu, Laura; University of Santiago de Compostela, CRETUS, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science; University of Santiago de Compostela, Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions (LIDSA), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Barrulas, Pedro; Laboratório Heracles Herança Cultural Estudos e Salvaguarda, Costa, Mafalda; Laboratório Heracles Herança Cultural Estudos e Salvaguarda, Garcia Jares, Carmen; University of Santiago de Compostela, CRETUS, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science; University of Santiago de Compostela, Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions (LIDSA), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Lores, Marta; University of Santiago de Compostela, Laboratory of Research and Development of Analytical Solutions (LIDSA), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Dias, Cristina; Universidade de Evora,
Subject area & keyword:	Mass spectrometry < Analytical chemistry

Anexo IV: Índice de figuras e táboas

FIGURAS

Introdución

Figura 4.1. Procedemento esquemático da μ -MSPD.	65
Figura 4.2. Procedemento esquemático da <i>Sup</i> -UAE.	68
Figura 4.3. Modos de extracción na SPME.	70
Figura 5.1. Configuración dun espectrómetro de masas de triplo cuadrupolo (modo SRM).	82
Figura 5.2. Esquema dun espectrómetro QTOF	83
Figura 5.3. Esquema xeral dun ICP-MS de triplo cuadrupolo.	86

Capítulo 3.4.

Figure 1. General digestion process.	159
Figure 2. Schematic digestion procedures according to the type of sample. a) Solid samples. b) Paste samples.	159
Figure 3. Zn contents in solid samples (in logarithmic scale).	164
Figure 4. Similar element distribution in the different henna samples: solid ones and two brown paste samples (in logarithmic scale).	167
Figure 5. Dendrogram of 11 variables (element concentrations) including 34 samples and clustering technique (squared Euclidean) for cluster analysis.	169

Capítulo 4.1.

Figure 1. SPME procedure.	195
Figure 2. Comparison of the number of allergens reported (blue) and identified (orange).	197
Figure 3. Comparison of the number of allergens between groups: flowers (violet) and trees (green).	198

Capítulo 4.2.

Figure 1. Schematic representation of the UAE experimental procedure.	213
---	-----

Figure 2. Distribution of polyphenols in the different samples studied. 218

Figure 3. Major polyphenols in the different considered extracts. 218

TÁBOAS

Introdución

Táboa 1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 13,14

Táboa 1.2. Plastificantes, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 15,16

Táboa 1.3. Outros compostos considerados, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 18-20

Táboa 1.4. Glicóis e compostos derivados, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 21,22

Táboa 1.5. Fragancias (fragancias alerxénicas e almisces sintéticos), número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 24-26

Táboa 1.6. Conservantes, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 27,28

Táboa 2.1. Ingredientes da henna, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 36

Táboa 2.2. . Ingredientes da jagua, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 37

Táboa 3.1. Restantes substancias alerxénicas, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 48-50

Táboa 3.2. Extractos naturais considerados como alérxenos de contacto e número CAS. 50,51

Táboa 3.3. Compostos fenólicos, número CAS, peso molecular (MW, g mol⁻¹) e estrutura química. 52-55

Capítulo 3.4.

Table 1. Details of the analyzed samples: type, color, composition information, and other remarkable comments on the labels. HT: Henna Tattoo; HD: Henna Dye; HTD: Henna Tattoo-Dye; JT: Jagua Tattoo; HPT: Herbaceous Plant Tattoo.	158
Table 2. ICP-MS operating conditions and instrument parameters.	161
Table 3. Quality parameters of the method: precision, accuracy, and limits of quantification (LOQ).	163
Table 4. Results of the trace elements ($\mu\text{g g}^{-1}$) in all the investigated samples (n=34). HT: Henna Tattoo; HD: Henna Dye; HTD: Henna Tattoo-Dye; JT: Jagua tattoo; HPT: Herbaceous Plant.	165
Table S1. Coefficient of determination (R^2) and instrumental detection limits (LOD) obtained for the different elements).	180

Capítulo 4.1.

Table 1. Characteristics of the analyzed samples: sample code, CAS numbers and solubility indicated by the safety data sheets.	192
Table 2. Compounds declared as allergens [9]: CAS numbers, their function or use in cosmetics, and samples in which their presence is detailed in the safety data sheets.	193,194
Table 3. Allergens identified in the samples. Italics mark their agreement with the safety data sheets.	200

Capítulo 4.2.

Table 1. Mean TPC and AA values for the studied extracts: alcoholate, ultrasonic extracts from fresh, frozen, and dried samples.	215
Table 2 Mean concentration of phenolic compounds ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in the different extracts of <i>Phifipendula vulgaris</i> (the highest concentrations, >10 ppm, are marked in bold).	217
Table S1. Phenolic compounds identified: CAS number, molecular mass (Mm), retention time (Rt), ionization mode, MS/MS transitions and coefficients of determination (R^2).	225,226



Nos últimos anos, a preocupación pola imaxe desencadea unha demanda que medra vigorosamente e un elevado consumo diario de produtos cosméticos e de coidado persoal. Isto supón un alto grao de exposición a multitude de compoñentes, polo que existe un crecente interese polo control da calidade e seguridade destes produtos. Esta tese centrouse no desenvolvemento de metodoloxías analíticas para superar os retos na análise de ingredientes cosméticos. Abarcou a determinación de familias de compostos moi utilizados en cosmética así como a caracterización doutros cosméticos con características extremas ou fronteirizas, como son as tatuaxes e tinturas capilares temporais de orixe vexetal. Tamén se incluíron extractos naturais e aceites esenciais con potenciais aplicacións como ingredientes naturais en cosméticos.