

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



Tese de Doutorado

**NOVAS ESTRATÉGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIOS E  
ENXOFRE EM CABELO E UNHA**

Diogo La Rosa Novo

PELOTAS, RS

2020

Diogo La Rosa Novo

**NOVAS ESTRATÉGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO E  
ENXOFRE EM CABELO E UNHA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências, Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química (Área: Química Analítica).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Foster Mesko

Coorientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Fábio Andrei Duarte

PELOTAS, RS

2020

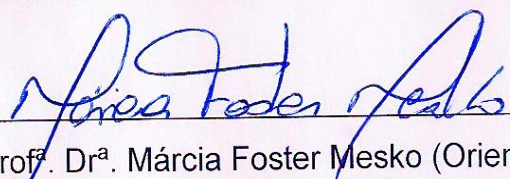
Diogo La Rosa Novo

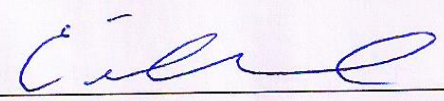
Novas estratégias para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha

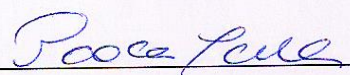
Tese de doutorado aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

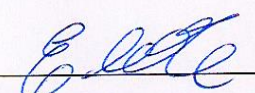
Data da defesa: 06 de março de 2020.

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Foster Mesko (Orientadora)  
Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Érico Marlon Moraes Flores  
Doutor em Engenharia de Minas, Metalúrgica e dos Materiais pela  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola de Azevedo Mello  
Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eliézer Quadro Oreste  
Doutor em Química pela Universidade Federal de Pelotas

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

N935n Novo, Diogo La Rosa

Novas estratégias para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha / Diogo La Rosa Novo ; Márcia Foster Mesko, orientadora ; Fábio Andrei Duarte, coorientador. — Pelotas, 2020.

159 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Amostras biológicas. 2. Preparo de amostras. 3. Determinação elementar. 4. Cromatografia. 5. Espectrometria. I. Mesko, Márcia Foster, orient. II. Duarte, Fábio Andrei, coorient. III. Título.

CDD : 544

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Química pelas oportunidades concedidas para a minha formação. À Coordenação de Pessoal de Nível Superior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo suporte financeiro fundamental para minha formação e execução do trabalho.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Mesko, por todas as valorosas oportunidades que me foram dadas, aos ensinamentos e ao apoio. Agradeço o incentivo e a atenciosa e dedicada orientação que, com certeza, ocasionaram o meu crescimento pessoal e profissional e, pela amizade construída. Agradeço o exemplo de profissional, a possibilidade de vislumbrar e participar da construção de um mundo melhor e a tamanha confiança em mim sempre depositada. Agradeço ao grupo *Atomic and Mass Spectrometry*, especialmente ao Prof. Dr. Frank Vanhaecke, pela orientação, aceite e a importante oportunidade de realizar uma parte dos experimentos na Universidade de Ghent. À Joke Belza e Thibaut Van Acker, por todo o suporte durante o desenvolvimento do estudo.

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio Duarte pela coorientação. Ao professor Prof. Dr. Érico Flores pela participação como banca examinadora, pelo exemplo profissional, por todos os ensinamentos e a oportunidade da realização de muitos dos experimentos deste trabalho. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola Mello e Dr. Eliézer Oreste, pela participação como banca examinadora, pelo exemplo profissional e pelas valiosas contribuições. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Hartiwg e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ethel Wilhelm pela participação como banca de qualificação, bem como pela amizade e ensinamentos. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rochele Picoloto, pela participação como banca de qualificação deste trabalho, pelo apoio incansável de sempre e pelas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais da UFPel, Álisson da Silva, Bruna Xavier, Cláudio Lima Junior, Cleiton Pereira, Fernanda Balbinot, Filipe Rondan, Priscila Scaglioni e Romina Moreira, por toda amizade, ensinamentos, ótima convivência e por todos os momentos que compartilhamos. Agradeço a inestimável ajuda para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço à Gilberto Coelho Júnior, Júlia de Mello, Marcelo Crizel e Rodrigo Pereira pela participação dessa etapa da minha trajetória e por terem contribuído para a minha

formação. Aos integrantes do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais da Universidade Federal de Santa Maria, em especial à Alessandra Henn pela amizade, ensinamentos e valorosas contribuições práticas durante o desenvolvimento do trabalho. À Djanira Maciel, secretária do PPGQ, por todo auxílio.

À namorada, melhor amiga e companheira Vitória Costa pelo amor, carinho, apoio, companhia e compreensão. Por sempre acreditar em mim e me incentivar mesmo nos momentos mais adversos e incertos. À minha família, Edson Novo, Vera Novo e Pamela Novo, por todo amor e carinho, e por sempre apoiarem as minhas escolhas. Sou eternamente grato por todo o empenho e todo o amor investido na minha criação. Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram e apoiaram durante essa importante etapa.

***“A perseverança continua sendo a chave para o sucesso de cada indivíduo. Sem preparo, objetivo e disciplina, perseverança é apenas teimosia.”***

(Semida Silveira)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	26
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	26
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	28
<b>3.1 Determinação elementar em amostras biológicas de origem humana</b> .....	29
3.1.1 Cabelo: composição e aspectos gerais .....	31
3.1.2 Unha: composição e aspectos gerais .....	32
<b>3.2 Técnicas para determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha</b> ..	34
3.2.1 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	35
3.2.2 Cromatografia de íons.....	38
3.2.3 Potenciometria com eletrodo íon seletivo .....	39
<b>3.3 Preparo de amostras</b> .....	40
3.3.1 Métodos de preparo de amostras utilizando soluções alcalinas.....	41
3.3.2 Métodos de combustão.....	42
3.3.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas.....	42
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
<b>4.1 Instrumentação</b> .....	51
<b>4.2 Reagentes</b> .....	54
<b>4.3 Descontaminação de materiais diversos</b> .....	56
<b>4.4 Amostras e materiais de referência</b> .....	56
<b>4.5 Métodos avaliados para o preparo de amostras de cabelo e unha</b> .....	57
4.5.1 Combustão iniciada por micro-ondas .....	57
4.5.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas e extração assistida por radiação micro-ondas utilizando soluções alcalinas.....	59
<b>4.6 Exatidão, precisão, limites de quantificação e análise estatística</b> .....	62
<b>4.7 Determinação de halogênios e enxofre por IC-CD-MS</b> .....	62
<b>4.8 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre por ICP-MS e ICP-OES</b> ...	63



<b>4.9 Determinação de carbono por ICP-OES</b> .....	63
<b>4.10 Determinação de flúor por ISE</b> .....	64
<b>4.11 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS</b> .....	64
4.11.1 Avaliações preliminares.....	65
4.11.1.1 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo..	65
4.11.1.1.1 Estratégia de calibração: preparação de fios de cabelo fortificados com halogênios.....	65
4.11.1.1.2 Estratégia de calibração: preparação de gotas de queratina fortificados com halogênios.....	66
4.11.1.2 Determinação qualitativa de bromo, cloro, iodo e enxofre em unha.....	68
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>5.1 Avaliação da adequabilidade das técnicas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha</b> .....	71
5.1.1 Cromatografia de íons com detecção condutimétrica acoplada à espectrometria de massas.....	71
5.1.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado .....	79
5.1.3 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado .....	82
5.1.4 Potenciometria com eletrodo íon seletivo .....	82
<b>5.2 Avaliação de métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha</b> .....	84
5.2.1 Preparo de amostras de cabelo e unha por combustão iniciada por micro-ondas .....	84
5.2.1.1 Forma de introdução da amostra no sistema e tempo de ignição e combustão .....	84
5.2.1.2 Otimização da massa de amostra e avaliação da pressão máxima do sistema de combustão .....	85
5.2.1.3 Avaliação da solução absorvedora .....	86
5.2.1.4 Brancos analíticos e limites de quantificação .....	88
5.2.1.5 Avaliação da exatidão e precisão .....	91

5.2.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas e extração assistida por radiação micro-ondas para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha por diferentes técnicas de determinação ..	96
5.2.3 Comparação entre os diferentes métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo.....	98
5.2.4 Comparação entre os diferentes métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios e enxofre em unha .....	101
5.2.5 Determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha .....	104
<b>5.3 Determinação e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS.....</b>	<b>107</b>
5.3.1 Avaliações preliminares .....	107
5.3.1.1 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo .....	108
5.3.1.1.1 Utilização de fios de cabelo fortificados com halogênios como estratégia de calibração para a determinação de bromo, cloro e iodo por LA-ICP-MS .....	110
5.3.1.1.2 Utilização de queratina extraída de cabelo como estratégia de calibração para a determinação de bromo, cloro e iodo por LA-ICP-MS .....	116
5.3.1.1.3 Determinação e distribuição de bromo e iodo em cabelo por LA-ICP-MS.....	123
5.3.1.2 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em unha.....	128
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>130</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>132</b>
<b>APÊNDICE – Artigo 1.....</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICE – Artigo 2.....</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE – Artigo 3.....</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO- Parecer comitê de ética em pesquisa da UFPel .....</b>	<b>155</b>

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Representação esquemática da composição do couro cabeludo (adaptado de ROBBINS, 1994).....	32
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática da composição da unha (adaptado de <a href="http://www.dxal.net/images-to-show-nail-anatomy-structure/">http://www.dxal.net/images-to-show-nail-anatomy-structure/</a> ).....	33
<b>Figura 3</b>	Frasco de quartzo e suporte utilizados na combustão iniciada por micro-ondas (adaptado de MESKO, 2008)..	43
<b>Figura 4</b>	A) forno micro-ondas e B) rotor para oito frascos utilizados para o preparo de amostras.....	51
<b>Figura 5</b>	A) frasco de quartzo utilizado na MIC e B) frasco de PTFE-TFM utilizado na MAD e MAE (Adaptado de PEREIRA, 2014).....	52
<b>Figura 6</b>	A e B) suporte de quartzo utilizado na MIC como suporte para a amostra.....	53
<b>Figura 7</b>	A) amostra de cabelo e B) de unha após a etapa de pré-tratamento.....	57
<b>Figura 8</b>	Cerca de 100 mg de amostra de cabelo preparadas na forma de A) <i>pellet</i> e B) invólucro e de unha preparadas na forma de C) <i>pellet</i> e D) invólucro.....	57
<b>Figura 9</b>	Frascos de quartzo fechados, fixados no rotor e sendo pressurizados com 20 bar de oxigênio.....	58
<b>Figura 10</b>	Frasco de quartzo com capa de proteção adaptada.....	59
<b>Figura 11</b>	Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de cabelo e unha para a subsequente determinação de halogênios e enxofre por diferentes técnicas de determinação.....	61
<b>Figura 12</b>	Aspecto dos fios de cabelo fortificados com halogênios como estratégia de calibração para a determinação de bromo, cloro e iodo por LA-ICP-MS.....	66

<b>Figura 13</b>	A) fios de cabelo fixados em fita adesiva dupla face em lâminas de microscópio B) introduzidos na câmara de ablação.....	66
<b>Figura 14</b>	Filtrado de queratina extraída do cabelo sendo dialisado.....	67
<b>Figura 15</b>	A) gotas de queratina em vidros fixados em lâminas de microscópio B) introduzidas na câmara de ablação.....	68
<b>Figura 16</b>	A) unhas embebidas em resina epóxi B) inseridas na câmara de ablação.....	68
<b>Figura 17</b>	Cromatogramas obtidos para A) solução padrão multielementar: 0,25 mg L <sup>-1</sup> para fluoreto; 10 mg L <sup>-1</sup> para cloreto; 0,15 mg L <sup>-1</sup> para brometo; 10 mg L <sup>-1</sup> para sulfato e 0,15 mg L <sup>-1</sup> para iodeto e B) solução obtida após a digestão de cabelo por MIC.....	72
<b>Figura 18</b>	Perfil do gradiente de eluição otimizado para determinação de halogênio e enxofre por IC-CD-MS.....	73
<b>Figura 19</b>	Cromatogramas obtidos para uma solução padrão multielementar: 0,25 mg L <sup>-1</sup> para fluoreto; 10 mg L <sup>-1</sup> para cloreto; 0,15 mg L <sup>-1</sup> para brometo; 10 mg L <sup>-1</sup> para sulfato e 0,15 mg L <sup>-1</sup> para iodeto. A) modo gradiente de eluição e B) modo isocrático de eluição.....	73
<b>Figura 20</b>	Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a intensidade de sinal para A) bromo e B) iodo na detecção por MS.....	76
<b>Figura 21</b>	Superfícies de resposta para a intensidade do sinal para A, C e F) bromo e B, D e F) iodo utilizando diferentes voltagens de cone (20 a 160 V), voltagem de agulha (1,0 a 5,0 kV) e temperatura da sonda (300 a 600 °C) na detecção por MS, n = 5.....	78
<b>Figura 22</b>	Cromatograma obtido para solução padrão multielementar. 0,25 mg L <sup>-1</sup> para fluoreto; 10 mg L <sup>-1</sup> para cloreto; 0,15 mg L <sup>-1</sup> para brometo; 10 mg L <sup>-1</sup> para sulfato; e 0,15 mg L <sup>-1</sup> para iodeto.....	79

<b>Figura 23</b>	Intensidade relativa do sinal para bromo (▲) e iodo (●) variando a concentração de carbono dissolvido de 100 a 5.000 mg L <sup>-1</sup> em comparação com a solução correspondente livre de carbono dissolvido. A intensidade relativa do sinal entre as linhas tracejadas indica a ausência do efeito de matriz. Fonte de carbono: ácido cítrico. Instrumento: Q-ICP-MS Elan DRC II e suas condições descritas na Tabela 3, n = 5.....	81
<b>Figura 24</b>	Intensidade relativa do sinal para flúor (●) variando o pH da solução de 0 a 13. A intensidade relativa do sinal entre as linhas tracejadas indica a ausência do efeito. Fonte de acidez e basicidade: HNO <sub>3</sub> e NaOH. Instrumento: Potenciômetro HANNA HI 3221 pH/ORP/ISE com eletrodo combinado HI 4110 e condições descritas na Tabela 4, n = 5.....	83
<b>Figura 25</b>	Recuperações obtidas através de ensaios de recuperação para (■) bromo, (■) cloro, (■) flúor, (■) iodo e (■) enxofre em A) cabelo e B) unha após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras. Determinação por IC-CD-MS ( $\bar{x} \pm sd$ , n=3).....	87
<b>Figura 26</b>	Cromatogramas obtidos para (—) solução padrão, (—) cabelo e (—) unha por MIC. As amostras foram diluídas A) 20 vezes na detecção por condutividade e B) 4 vezes na detecção por MS. Concentração dos analitos na solução padrão: 50 µg L <sup>-1</sup> para fluoreto, 500 µg L <sup>-1</sup> para cloreto, 50 µg L <sup>-1</sup> para brometo, 500 µg L <sup>-1</sup> para sulfato e 50 µg L <sup>-1</sup> para iodeto.....	90
<b>Figura 27</b>	Aspecto da solução após a preparação da amostra de cabelo por MAD A) utilizando 14,4 mol L <sup>-1</sup> de HNO <sub>3</sub> , por MAE utilizando B) 110 mmol L <sup>-1</sup> de TMAH e C) 100 mmol L <sup>-1</sup> de NH <sub>4</sub> OH e por D) MIC utilizando 100 mmol L <sup>-1</sup> de NH <sub>4</sub> OH como solução absorvedora.....	96

<b>Figura 28</b>	Aspecto da solução após a preparação da amostra de unha por MAD A) utilizando $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{HNO}_3$ , por MAE utilizando B) $110 \text{ mmol L}^{-1}$ de TMAH e C) $100 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NH}_4\text{OH}$ e por D) MIC utilizando $50 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NH}_4\text{OH}$ como solução absorvedora.....	97
<b>Figura 29</b>	Forma de introdução das amostras na câmara de ablação. A) fios de cabelo fixados em fita adesiva dupla face e B) unhas embebidas em resina epóxi.....	107
<b>Figura 30</b>	Intensidade de sinal para os isótopos (—) $^{79}\text{bromo}$ , (—) $^{81}\text{bromo}$ , (—) $^{35}\text{cloro}$ , (—) $^{37}\text{cloro}$ , (—) $^{127}\text{iodo}$ e (—) $^{34}\text{enxofre}$ por LA-ICP-MS ( $10 \mu\text{m}$ de diâmetro do <i>spot</i> e $0,33 \text{ J cm}^{-2}$ de densidade de energia). Cabelo com $3,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de bromo, $1.000 \mu\text{g g}^{-1}$ de cloro; $10,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de iodo e $56,0 \text{ mg g}^{-1}$ de enxofre - amostra C8.....	108
<b>Figura 31</b>	Intensidade de sinal para os isótopos (—) $^{79}\text{bromo}$ , (—) $^{81}\text{bromo}$ , (—) $^{35}\text{cloro}$ , (—) $^{37}\text{cloro}$ , (—) $^{127}\text{iodo}$ e (—) $^{34}\text{enxofre}$ por LA-ICP-MS ( $35 \mu\text{m}$ de diâmetro do <i>spot</i> e $1,50 \text{ J cm}^{-2}$ de densidade de energia). Cabelo com $3,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de bromo, $1.000 \mu\text{g g}^{-1}$ de cloro; $10,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de iodo e $56,0 \text{ mg g}^{-1}$ de enxofre - amostra C8.....	109
<b>Figura 32</b>	Intensidade do sinal para os isótopos (—) $^{79}\text{bromo}$ , (—) $^{127}\text{iodo}$ e (—) $^{34}\text{enxofre}$ nos fios de cabelo fortificados com halogênios. Utilizando três varreduras em linha para cada padrão.....	111
<b>Figura 33</b>	Intensidade do sinal para os isótopos (—) $^{79}\text{bromo}$ e (—) $^{127}\text{iodo}$ no fio de cabelo. Ensaio de profundidade com ablação total do fio de cabelo utilizando o padrão 5.....	112
<b>Figura 34</b>	Intensidade do sinal para os isótopos (—) $^{79}\text{bromo}$ , (—) $^{127}\text{iodo}$ e (—) $^{34}\text{enxofre}$ nos fios de cabelo fortificados com halogênios. Utilizando três varreduras em profundidade para cada padrão .....	114

<b>Figura 35</b>	Curvas de calibração para A) bromo e B) iodo com o sinal não normalizado com padrão interno e para C) bromo e D) iodo com o sinal normalizado com padrão interno. Utilizando varreduras de linha de 8 s.....	115
<b>Figura 36</b>	Aspecto microscópico de gotas de queratina. A1-F1 adição dos analitos na forma de brometo, cloreto e iodeto. A2-F2 adição dos analitos na forma de bromato, clorato e iodato. Concentração dos elementos adicionada na queratina: A1-2) 0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cloro, bromo e iodo, B1-2) 250 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cloro e 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bromo e iodo, C1-2) 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cloro e 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bromo e iodo, D1-2) 750 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cloro e 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bromo e iodo, E1-2) 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cloro e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bromo e iodo e F1-2) 2500 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cloro e 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bromo e iodo.....	117
<b>Figura 37</b>	Aspecto microscópico (A1 e A2) e distribuição de bromo (B1 e B2), cloro (C1 e C2), iodo (D1 e D2) e enxofre (E1 e E2) nas gotas de queratina. A1-E1 adição dos analitos na forma de brometo, cloreto e iodeto. A2-E2 adição dos analitos na forma de bromato, clorato e iodato. Concentração dos elementos adicionada na queratina (padrão 3): 750 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cloro e 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bromo e iodo.....	118
<b>Figura 38</b>	A) aspecto microscópico da gota de queratina e B) da gota após a ablação total. Representação esquemática para a curva de calibração utilizando a abordagem da a ablação total.....	119
<b>Figura 39</b>	Curvas de calibração para bromo, cloro e iodo utilizando as gotas de queratina fortificadas. A1-C1 adição dos analitos na forma de brometo, cloreto e iodeto. A2-C2 adição dos analitos na forma de bromato, clorato e iodato.....	120

<b>Figura 40</b>	Experimentos para avaliar a quantidade de material removido durante a ablação do cabelo. A1 e B1 moldes utilizados para embeber o cabelo em resina epóxi, A2 cabelo embebido em resina epóxi polida e B2) cortada em piramitome com faca de vidro. Cabelo embebido em resina epóxi na seção C1) longitudinal e C2) transversal.....	121
<b>Figura 41</b>	A) mapa de superfície 2D da seção longitudinal do fio de cabelo embebido em resina epóxi destacado em amarelo. B) Aspecto microscópico da seção longitudinal (10 µm de espessura) do fio de cabelo embebido em resina epóxi cortada com piramitome e faca de vidro. Diâmetro do <i>spot</i> de 35 µm e aumentos gradativos de disparos por posição ao longo do fio.....	122
<b>Figura 42</b>	Distribuição de (—) <sup>79</sup> bromo e (—) <sup>127</sup> iodo em regiões do cabelo.....	127
<b>Figura 43</b>	Intensidade de sinal para os isótopos (—) <sup>79</sup> bromo, (—) <sup>35</sup> cloro, (—) <sup>127</sup> iodo e (—) <sup>34</sup> enxofre por LA-ICP-MS (35 µm de diâmetro do <i>spot</i> e 1,50 J cm <sup>-2</sup> de densidade de energia). Unha com 1,00 µg g <sup>-1</sup> de bromo, 700 µg g <sup>-1</sup> de cloro; 0,27 µg g <sup>-1</sup> de iodo e 25,0 mg g <sup>-1</sup> de enxofre - amostra U1.....	128



## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>Tabela 1</b>	Interferências poliatômicas na determinação de halogênios e enxofre por ICP-MS (MONTASER, 1998; BU, WANG, HALL, 2003).....	37
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros na determinação de halogênios e enxofre por IC-CD-MS.....	63
<b>Tabela 3</b>	Parâmetros na determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre por ICP-MS e bromo, cloro, iodo, enxofre e carbono por ICP-OES.....	64
<b>Tabela 4</b>	Parâmetros na determinação de flúor por ISE.....	64
<b>Tabela 5</b>	Parâmetros na determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS.....	69
<b>Tabela 6</b>	Valores não codificados e codificados das variáveis independentes e respostas observadas para a intensidade de sinal para bromo e iodo na detecção por MS.....	75
<b>Tabela 7</b>	ANOVA para a intensidade do sinal para bromo e iodo na detecção por MS.....	77
<b>Tabela 8</b>	Tempo de ignição e duração da combustão durante a digestão de cabelo e unha por MIC, n=3.....	85
<b>Tabela 9</b>	Limites de quantificação para halogênios e enxofre em cabelo e unha utilizando diferentes técnicas de determinação após o preparo por MIC.....	89
<b>Tabela 10</b>	Concentração antes e após a adição de halogênios e enxofre em cabelo ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3).....	92
<b>Tabela 11</b>	Concentração antes e após a adição de halogênios e enxofre em unha ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3).....	93
<b>Tabela 12</b>	Concentração de halogênios e enxofre obtida para o CRM NCS DC73347a de cabelo ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3).....	94
<b>Tabela 13</b>	Concentração antes e após a adição de halogênios e enxofre em unha utilizando o CRM NIST 8435 ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=3).....	95

<b>Tabela 14</b>	Concentração de halogênios e enxofre em uma amostra de cabelo utilizada para a comparação da performance de diferentes ferramentas analíticas ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , $n=5$ ).....	98
<b>Tabela 15</b>	Limites de quantificação para os métodos avaliados visando à determinação de halogênios e enxofre em cabelo.....	100
<b>Tabela 16</b>	Concentração de halogênios e enxofre em uma amostra de unha utilizada para a comparação da performance de diferentes ferramentas analíticas ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , $n=5$ ).....	101
<b>Tabela 17</b>	Limites de quantificação para os métodos avaliados visando à determinação de halogênios e enxofre em unha.....	103
<b>Tabela 18</b>	Concentrações de halogênio e enxofre em cabelo: Combustão iniciada por micro-ondas, 300 mg da amostra e 100 mmol L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> OH como solução absorvedora. Determinação por diferentes técnicas ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , $n=5$ ).....	105
<b>Tabela 19</b>	Concentrações de halogênio e enxofre em unha: Combustão iniciada por micro-ondas, 15 a 100 mg de amostra e 50 mmol L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> OH como solução absorvedora. Determinação por diferentes técnicas ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , $n=5$ ).....	106
<b>Tabela 20</b>	Concentrações de bromo e iodo em cabelo por ICP-MS após a MIC e LA-ICP-MS ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , $n=5$ ).....	124
<b>Tabela 21</b>	Concentrações de bromo e iodo em cabelo: três fios de cabelo para cada voluntário e três linhas de ablação em diferentes posições. Determinação por LA-ICP-MS ( $\bar{x} \pm sd$ , $\mu\text{g g}^{-1}$ , $n=5$ ).....	125

## LISTA DE QUADROS

	Página
<b>Quadro 1</b> Ferramentas analíticas propostas na literatura para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRM – material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*

EDXRF - energia dispersiva de fluorescência de raios-X, do inglês, *energy dispersive X-ray fluorescence*

HR-CS MAS – espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua, do inglês, *high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry*

HTMA - hidróxido de tetrametilamônio

IC-CD-MS – cromatografia de íons com detecção condutimétrica acoplada à espectrometria de massas, do inglês, *ion chromatography with conductivity detection coupled to mass spectrometry*

ICP-MS – espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP-OES – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ISE – eletrodo de íon seletivo, do inglês, *ion-selective electrode*

LA-ICP-MS - ablação por *laser* acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*

LOD – limite de detecção, do inglês, *limit of detection*

LOQ – limite de quantificação, do inglês, *limit of quantification*

MAD – digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted digestion*

MAE – extração assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted extraction*

MIC – combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, *microwave-induced combustion*

MS - espectrometria de massas, do inglês, *mass spectrometry*

NAA - análise por ativação com nêutrons, do inglês, *neutron activation analysis*

PTFE-TFM - politetrafluoretileno modificado, do inglês, *modified polytetrafluoroethylene*

CV - coeficiente de variação, do inglês, *relative standard deviation*

XRF - fluorescência de raios-X, do inglês, *X-ray fluorescence*

## RESUMO

NOVO, Diogo La Rosa Novo. **Novas estratégias para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha**. 2020. 159f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Química, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) como método de preparo de amostras foi avaliada para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha por várias técnicas de determinação: cromatografia de íons com detecção condutimétrica acoplada à espectrometria de massas (IC-CD-MS), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE). Ao contrário dos métodos convencionais de digestão e extração, a MIC resultou em uma solução totalmente compatível com várias técnicas de determinação. A baixa concentração de carbono dissolvido para a digestão de cabelo (300 mg) e unha (100 mg) e a utilização de soluções alcalinas diluídas para absorver os elementos ( $\text{NH}_4\text{OH}$  100  $\text{mmol L}^{-1}$  para a digestão de cabelo e  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  para a digestão de unha) eliminou qualquer etapa adicional de diluição previamente à determinação. A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação com solução padrão em níveis de adição de 50 e 100% da concentração detectada (recuperação de 94 a 106%). A exatidão também foi comprovada pelos ensaios de recuperação na forma sólida (unha misturada com material de referência certificado - CRM) resultando em recuperação de 93 a 106% e pela análise de um CRM de cabelo humano resultando em concordância de 93 a 103%. O coeficiente de variação para a repetibilidade e precisão intermediária foi inferior a 10%. Os limites de quantificação (LOQ) variaram de 0,7 a 20  $\mu\text{g g}^{-1}$  para bromo, 13 a 40  $\mu\text{g g}^{-1}$  para cloro, 8 a 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  para flúor, 0,02 a 8  $\mu\text{g g}^{-1}$  para iodo e 8 a 210  $\mu\text{g g}^{-1}$  para enxofre em cabelo; e 0,1 a 60  $\mu\text{g g}^{-1}$  para bromo, 40 a 120  $\mu\text{g g}^{-1}$  para cloro, 20 a 80  $\mu\text{g g}^{-1}$  para flúor, 0,03 a 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  para iodo e 25 a 800  $\mu\text{g g}^{-1}$  para enxofre em unha utilizando IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE após a MIC. A análise de cabelo e unha na forma sólida foi avaliada pela ablação por *laser* acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) e duas estratégias de calibração foram avaliadas. Com os métodos propostos foi possível observar que a concentração dos

analitos variou em uma ampla faixa. Além disso, os métodos propostos são excelentes ferramentas para estudos de avaliações nutricionais, ambientais, toxicológicas, dentre outras.

**Palavras-chave:** Amostras biológicas, preparo de amostras, determinação elementar, MIC, IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES, ISE e LA-ICP-MS.

## ABSTRACT

NOVO, Diogo La Rosa Novo. **New strategies for the determination of halogens and sulfur in hair and nails: evaluation of multiple determination techniques and different sample preparation methods.** 2020. 159f. Thesis (Doctoral in Chemistry) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Química, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Microwave-induced combustion (MIC) as a sample preparation method was evaluated for further halogens and sulfur determination in hair and nail by several determination techniques: ion chromatography with conductivity detection coupled to mass spectrometry (IC-CD-MS), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and potentiometry with ion selective electrode (ISE). Unlike conventional digestion and extraction methods, proposed MIC sample preparation method resulted in a solution fully compatible with several determination techniques. The low dissolved carbon concentration for digestion of hair (300 mg) and nail (100 mg) and the use of dilute alkaline solutions to absorb the elements (100 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH for hair digestion and 50 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH for nail digestion) avoiding additional dilution steps before the measurement. Accuracy was assessed through recovery tests with standard solution addition (50 and 100% of the detected concentration) and recoveries ranged from 94 to 106%. Accuracy was also assessed by recovery tests in solid form considering the nail mixed with a certified reference material - CRM (recoveries ranged from 93 to 106%), and by analyzing a CRM of human hair (agreements from 93 to 103%). Relative standard deviation for repeatability and intermediate precision was lower than 10%. The limits of quantification (LOQs) ranged from 0,7 to 20 µg g<sup>-1</sup> for bromine, 13 to 40 µg g<sup>-1</sup> for chlorine, 8 to 25 µg g<sup>-1</sup> for fluorine, 0,02 to 8 µg g<sup>-1</sup> for iodine and 8 to 210 µg g<sup>-1</sup> for sulfur in hair; and 0,1 to 60 µg g<sup>-1</sup> for bromine, 40 to 120 µg g<sup>-1</sup> for chlorine, 20 to 80 µg g<sup>-1</sup> for fluorine, 0,03 to 25 µg g<sup>-1</sup> for iodine and 25 a 800 µg g<sup>-1</sup> for sulfur in nail using IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES and ISE after MIC. Hair and nail in solid form was also analyzed by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and two calibration strategies were evaluated. Using analytical methods proposed in this thesis, it was possible to observe that the analytes concentration varied in a wide range. Moreover, the proposed strategies in this thesis

are excellent tools for further studies involving nutritional, environmental, toxicological assessments, and among others.

**Keywords:** Biological samples, sample preparation, elemental determination, MIC, IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES, ISE and LA-ICP-MS.



## 1. INTRODUÇÃO

A determinação de elementos químicos em amostras biológicas, como cabelo e unha, representa uma importante ferramenta para avaliar os efeitos biológicos provenientes de fontes endógenas e/ou exógenas (SEIDEL *et al.*, 2001; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005; PARSONS, BARBOSA JUNIOR, 2007; SAVINOV, ANISIMOV, DROBYSHEV, 2016). Essa estratégia vem sendo amplamente utilizada para elucidar a toxicodinâmica e a toxicinética de elementos químicos (SEIDEL *et al.*, 2001; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005; PARSONS, BARBOSA JUNIOR, 2007; SAVINOV, ANISIMOV, DROBYSHEV, 2016). Nesse contexto, os metais e alguns metaloides têm sido determinados há vários anos em amostras biológicas, enquanto que informações acerca de outros elementos importantes do ponto de vista essencial e toxicológico, como os halogênios e enxofre, ainda são escassas (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005).

Dentre as amostras biológicas, o sangue é a matriz comumente utilizada para essa finalidade. Entretanto, a necessidade da realização de uma coleta invasiva, a complexidade de armazenamento e os riscos durante a coleta e a manipulação da amostra, torna a análise do sangue uma difícil tarefa. Diante disso, a comunidade científica tem buscado alternativas para a substituição do sangue por outras matrizes biológicas. Amostras obtidas por coletas não invasivas, como cabelo e unha, apresentam como principais vantagens a simplicidade de coleta, estocagem, transporte e manuseio (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005). Além disso, a análise de cabelo e unha torna-se uma interessante ferramenta para avaliar contaminações exógenas e/ou endógenas em diferentes períodos. Entretanto, a determinação de halogênios e enxofre em matrizes sólidas não é uma tarefa trivial e existem poucos grupos de pesquisa no mundo trabalhando no desenvolvimento desse tema.

A presença dos elementos químicos em baixas concentrações, as dificuldades relacionadas a etapa de preparo de amostras e as interferências durante a etapa de determinação fazem com que técnicas baseadas na análise direta de sólidos estejam entre as mais utilizadas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha (AGUIAR, 2001; SANCHEZ, 2012; POZEBON, SCHEFFLER, DRESSLER, 2017). Contudo, essas estratégias apresentam diversas restrições durante a etapa de calibração, falta de homogeneidade e efeito de matriz, além de não serem acessíveis à maioria dos laboratórios de análise, o que limita a ampliação desses estudos. Técnicas espectrométricas, cromatográficas e potenciométricas convencionais podem

ser alternativas desde que precedidas por um adequado método de preparo de amostras.

A realização de uma etapa de preparo de amostras que resulte em uma solução final totalmente compatível com a técnica de determinação e que mantenha os elementos estáveis em solução não é uma tarefa fácil, sendo indispensável para o sucesso da análise, principalmente quando se trata da determinação de elementos não convencionais, como os halogênios e enxofre (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016; FLORES *et al.*, 2020). A digestão por via úmida com aquecimento convencional ou assistida por radiação micro-ondas pode não ser a melhor alternativa pois halogênios e enxofre são onipresentes no ambiente e facilmente incorporados durante essa etapa (KRUG; ROCHA, 2016). Além disso, algumas espécies de halogênios são instáveis em meio ácido e podem ser perdidas por volatilização, comprometendo assim, a exatidão dos resultados (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016). O uso de ácidos concentrados ainda está associado ao aumento dos valores de branco, resultando em elevados limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), e pode causar várias interferências durante a etapa de determinação.

Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras, os quais possibilitem resultados precisos e exatos e uma solução compatível com várias técnicas de determinação. Sob esse aspecto, a extração assistida por radiação micro-ondas (MAE) utilizando soluções alcalinas e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) podem ser alternativas para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016). O uso de soluções diluídas no preparo de amostras, além de tornar os digeridos compatíveis com diferentes técnicas de determinação, reduz os riscos de acidentes, a exposição do analista, o consumo de energia e reagentes e a geração de resíduos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo geral desenvolver métodos para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha. A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi avaliada como método de preparo de amostras e a sua eficiência foi comparada com a digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAD) e a extração assistida por radiação micro-ondas (MAE). As técnicas de determinação utilizadas foram: cromatografia de íons com detecção condutimétrica acoplada à espectrometria de massas (IC-CD-MS), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE). Um método baseado na ablação por *laser* acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) foi avaliado para a determinação e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha.

### 2.1 Objetivos específicos

- Otimizar parâmetros instrumentais relativos à determinação de halogênios e enxofre por IC-CD-MS como modo de eluição, temperatura de sonda, voltagem do cone e voltagem de agulha, visando melhorar a separação dos analitos e a detectabilidade da técnica;
- Otimizar parâmetros instrumentais relativos à determinação de halogênios e enxofre por IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE;
- Otimizar parâmetros instrumentais relativos ao preparo de amostras de cabelo e unha por MIC como forma de introdução das amostras no sistema, massa de amostra, solução absorvedora e o programa de irradiação com micro-ondas;
- Comparar a performance da MIC em relação a MAD e MAE;
- Avaliar a exatidão do(s) método(s) proposto(s) através de ensaios de recuperação em diferentes formas e níveis de concentração e através da análise de um CRM de cabelo;
- Aplicar o(s) método(s) desenvolvido(s) para a análise de cabelo e unha de diferentes voluntários e avaliar a variação das faixas de concentração;

- Avaliar a adequabilidade da LA-ICP-MS para a determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha;
- Avaliar alternativas para a calibração visando à determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Essa revisão bibliográfica está dividida em três partes principais. Na primeira delas, serão abordados alguns aspectos gerais sobre a determinação elementar em amostras biológicas de origem humana, dando ênfase para a análise de cabelo e unha, que foram as amostras biológicas analisadas. Na segunda parte, será feita uma descrição das ferramentas analíticas utilizadas para a determinação de halogênios e enxofre em amostras biológicas de origem humana, sendo dedicada maior atenção para aquelas utilizadas na execução desse trabalho. Na terceira e última parte, serão abordados os principais aspectos sobre os métodos de preparo de amostras que podem ser utilizadas como alternativas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha.*

### 3.1 Determinação elementar em amostras biológicas de origem humana

A determinação elementar em amostras biológicas como, por exemplo, cabelo, saliva, sangue, unha e urina, é uma importante ferramenta no diagnóstico, prognóstico e no tratamento de diversas doenças. Essa estratégia também pode demarcar uma população exposta a toxinas ou a ambientes poluídos (SEIDEL *et al.*, 2001; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005; PARSONS, BARBOSA JUNIOR, 2007; SAVINOV, ANISIMOV, DROBYSHEV, 2016). Dentre as amostras biológicas, o cabelo e a unha apresentam algumas vantagens como biomarcadores de elementos químicos, tais como simplicidade de coleta, estocagem, transporte e manuseio (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005). Além disso, a análise de cabelo e unha torna-se uma interessante ferramenta para avaliar contaminações exógenas e/ou endógenas em diferentes períodos.

Apesar disso, segundo Seidel *et al.* 2001, para a análise de cabelo, intervalos de referência estabelecidos por importantes laboratórios clínicos internacionais, citados como referência em artigos científicos e utilizados por médicos na interpretação do mineralograma, são, no mínimo, questionáveis (SEIDEL *et al.*, 2001). Ainda, quando comparadas com o sangue e urina, existe uma maior dificuldade para estabelecer a contribuição de fatores exógenos ou endógenos na concentração final dos elementos (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1999; SEIDEL *et al.*, 2001; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005; PARSONS, BARBOSA JUNIOR, 2007; SAVINOV, ANISIMOV, DROBYSHEV, 2016; POZEBON, SCHEFFLER, DRESSLER, 2017). Nesse contexto, a química analítica emerge com um papel interdisciplinar fundamental para auxiliar na busca por respostas a essas questões.

A determinação de halogênios e enxofre em amostras biológicas tem chamado a atenção da comunidade científica em virtude dos diferentes efeitos causados por esses elementos no organismo (OTTEN, HELLWIG, MEYERS, 2006; CARMO, 2011). O iodo é um elemento essencial para o funcionamento da glândula tireoide, atuando no crescimento e desenvolvimento do cérebro e do sistema nervoso central, e de diversos processos metabólicos (COZZOLINO, 2012). O iodo vem sendo adicionado ao sal de cozinha como estratégia para reduzir a sua deficiência no organismo. Em concentrações inadequadas, o iodo pode desencadear bócio endêmico, cretinismo endêmico, hipotireoidismo ou hipertireoidismo (WHO, 2007; ZIMMERMANN, JOOSTE, PANDAV, 2008; COZZOLINO, 2012). Além disso, resíduos de hormônios tireoidianos estão cada vez mais presentes em amostras ambientais podendo expor

os seres humanos a casos graves de tireotoxicose (JUGAN *et al.*, 2009; MICHALKE, SCHRAMEL, WITTE, 2008).

O bromo, apesar de não ser considerado um elemento essencial, está relacionado à formação de colágeno IV. O bromo é utilizado como sedativo hipnótico e está também associado à  $\alpha$ -amilase (MORI *et al.*, 2012; MCCALL *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2013). Em concentrações inadequadas, esse elemento está relacionado à inibição da glândula tireoide, retardo no crescimento, insônia, broncoespasmos, distúrbios gastrointestinais, dentre outros (KOHLMEIER, 2003; VOBECKY *et al.*, 1996; FAO/WHO, 2004). Quando na forma de bromato é carcinogênico, mesmo em baixas concentrações (IARC, 1999). As espécies orgânicas de bromo são também consideradas contaminantes globais emergentes devido a sua ampla utilização em retardantes de chamas e produtos para o tratamento de águas (SADIQ, RODRIGUEZ, 2004; RICHARDSON, POSTIGO, 2012).

O cloro é um elemento essencial para a manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio acidobásico, na transmissão de impulsos nervosos, no transporte ativo dos aminoácidos e da glicose em nível celular. Na forma de ácido clorídrico, o cloro faz parte do suco gástrico (ARAÚJO *et al.*, 2008). Em concentrações inadequadas, está associado às lesões nos pulmões e, principalmente, na forma de cloreto de sódio, afeta a pressão sanguínea e na possibilidade de ocorrência de doenças relacionadas (EVANS, 2005; BLAKE, MUNOZ, VOLPE, 2009). Os compostos a base de perclorato são amplamente utilizados no tratamento de águas e indústrias alimentícias e vêm sendo considerados poluentes emergentes (SEYFFERTH, PARKER, 2006). Por ser quimicamente similar ao iodeto, o cloro pode ocasionar sérios problemas na produção dos hormônios tireoidianos (GREER *et al.*, 2002). Os compostos orgânicos de cloro são amplamente utilizados na agricultura como pesticidas e permanecem no meio ambiente por longos períodos, prejudicando os ecossistemas.

O flúor é um elemento essencial para a manutenção da saúde bucal. Em concentrações inadequadas, pode ocasionar a fluorose, levando a fragilidade do sistema ósseo (EKAMBARAM, ITTHAGARUN, KING, 2011) e/ou afetar o funcionamento dos rins e das hemácias (FAO/WHO, 2004; PRYSTUPA, 2011). Algumas espécies orgânicas de flúor, como o ácido perfluorooctanóico (PFOA), perfluorooctano-sulfonamida (PFOSA), ácido perfluorooctanossulfônico (PFOS), trifluoracético (TFA) e o ácido fluoracético (FAA), são consideradas poluentes globais

emergentes e representam um grande risco para os seres humanos (QIN *et al.*, 2012; JAMARI *et al.*, 2017).

O enxofre é um elemento essencial que atua como protagonista em fenômenos celulares e funções energéticas, plásticas e de desintoxicação (OTTEN, HELLWIG, MEYERS, 2006). Este elemento apresenta um papel fundamental no metabolismo e na síntese de proteínas, vitaminas, gorduras e carboidratos (OTTEN, HELLWIG, MEYERS, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2008). Em concentrações inadequadas o enxofre pode ocasionar distúrbios no sistema nervoso, no metabolismo de lipídios e carboidratos, além de retardos no crescimento devido a sua relação com a síntese de proteínas (OTTEN, HELLWIG, MEYERS, 2006).

Diante do que foi apresentado, a determinação de halogênios e enxofre em amostras biológicas é uma importante ferramenta na busca de informações nutricionais, ambientais, forenses e toxicológicas. A química analítica insere-se nesse contexto de maneira fundamental para a correta obtenção e interpretação dos resultados. Dentre as amostras biológicas, o cabelo e a unha foram as selecionadas para o desenvolvimento do presente trabalho e maior enfoque será dado a elas nos itens subsequentes.

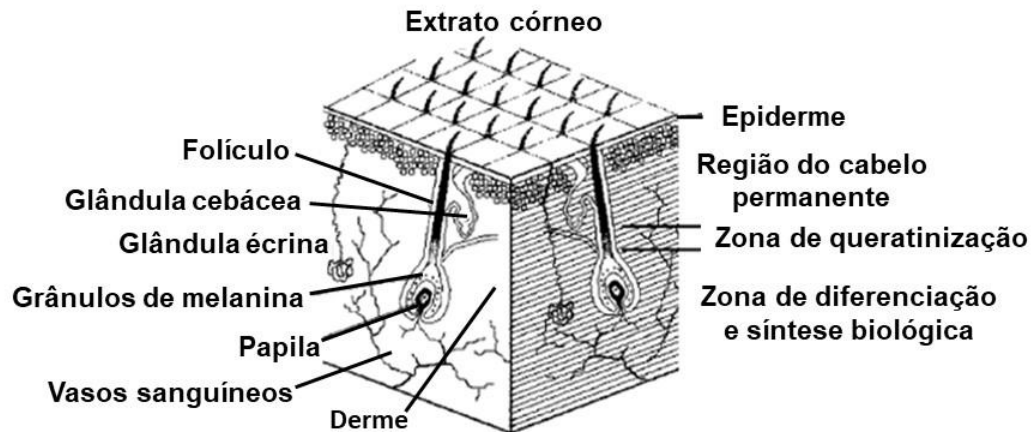
### 3.1.1 Cabelo: composição e aspectos gerais

O cabelo é composto, basicamente, por três camadas: cutícula (camada externa, composta por várias subcamadas separadas por um complexo de células - endocutícula, epicutícula e exocutícula); córtex (principal componente do cabelo, formado por um conjunto de células cilíndricas denominado de matriz, local onde fica situada a queratina e outras proteínas) e medula (camada mais interna do folículo) (CHATT, KATZ, 1988; BENCZE, 1990; POZEBON, SCHEFFLER, DRESSLER, 2017). O diâmetro de um fio de cabelo humano pode variar de 15 a 120  $\mu\text{m}$ , dependendo da raça, e apresenta em sua constituição cerca de 80% de proteínas, 15% de água e 4% lipídios. O teor de cinzas é geralmente inferior a 1%, indicando uma relativa baixa quantidade de minerais (ROBBINS, 1994).

A absorção endógena dos elementos no cabelo dá-se a partir da raiz, cuja quantidade incorporada depende da concentração instantânea dos fluidos biológicos circundantes (sangue, linfa e fluido extra-celular). O contato direto do cabelo com os fluidos biológicos durante o seu desenvolvimento e crescimento faz com que os



elementos químicos sejam absorvidos por gradientes de concentração (BENCZE, 1990; ROBBINS, 1994). Na Figura 1 é apresentada a composição do couro cabeludo.



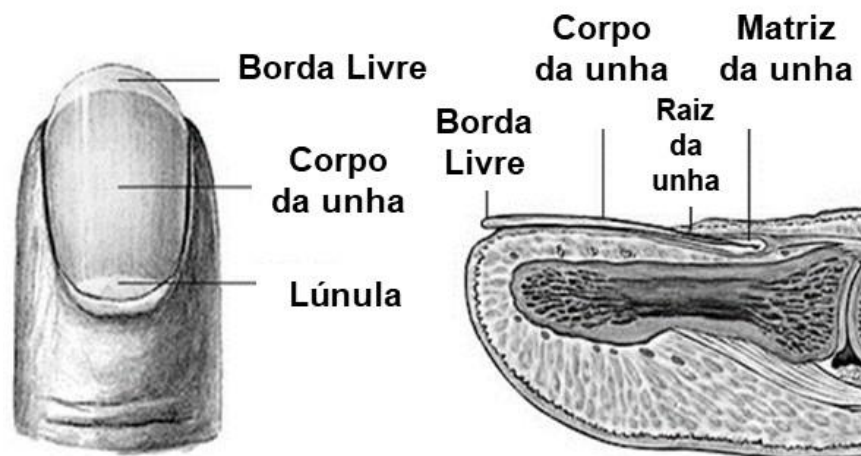
**Figura 1.** Representação esquemática da composição do couro cabeludo (adaptado de ROBBINS, 1994).

A determinação da concentração de elementos químicos no cabelo tem sido comumente utilizada para correlacionar com distúrbios de aprendizagem e nutricionais. Na comunidade médica, a análise do cabelo é mais aceita quando utilizada como análise confirmatória ou de triagem (COMBS, 1987; KLEVAY, BISTRAN, FLEMING, 1987; CHATT, KATZ, 1988; IYENGAR, WOITTIEZ, 1988; BOZSAI, 1992; CAROLI *et al.*, 1992; TORO *et al.*, 1993; ARNOLD, SACHS, 1994). No Brasil, a análise de cabelo é solicitada por médicos da área da medicina ortomolecular para avaliar o estado nutricional (elementos essenciais presentes em baixa ou elevada concentração) e possíveis contaminações por elementos tóxicos (PASSWATER, CRANTON, 1983; CHATT, KATZ, 1988; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005). Entretanto, não é possível afirmar quais são as concentrações adequadas para cada elemento, pois são muitos os fatores que contribuem para que ocorram diferentes concentrações de elementos no cabelo de determinada população, tais como idade, hábitos alimentares, localização geográfica, sexo, ocupação e etc.

### 3.1.2 Unha: composição e aspectos gerais

A unha é composta basicamente por três camadas: corpo (porção descoberta e fixa da unha), borda livre (extensão anterior livre do corpo) e raiz (parte posterior ou proximal da unha, situada sob a dobra da pele) (ERHART, 1976). O tecido cresce em

direção longitudinal ao dedo e morre à medida que se afasta das fontes de alimentação (irrigação sanguínea) (AGUIAR, 2001). A taxa de crescimento da unha dos dedos das mãos e dos pés é por volta de 3,5 e 1,5 mm ao mês, respectivamente, e apresenta em sua constituição cerca de 80% de proteínas, 15% de água e 1% lipídios (YAEMSIRI *et al.*, 2010). O teor de cinzas é geralmente inferior a 1%, indicando uma relativa baixa quantidade de minerais (YAEMSIRI *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Representação esquemática da composição da unha (adaptado de <http://www.dxal.net/images-to-show-nail-anatomy-structure/>).

A composição da unha não é afetada pelos fatores transientes que alteram os níveis de minerais no soro sanguíneo e, portanto, a unha pode ser um indicador confiável do metabolismo de minerais (AGUIAR, 2001). A absorção dos elementos na unha também dá-se a partir da raiz, cuja quantidade incorporada depende da concentração instantânea dos fluidos biológicos circundantes (AGUIAR, 2001; SANCHES, 2012). De maneira geral, a composição elementar da matriz da unha deve representar a composição das células que são alteradas pelos fatores metabólicos e ambientais. Alguns autores mencionam que "a composição das unhas reflete o estado do metabolismo mineral de um longo período e os distúrbios no sistema metabólico afetam a sua composição, então, as unhas podem ser usadas clinicamente como material de biópsia facilmente acessível" (BANK, *et al.*, 1981).

A determinação da concentração de elementos químicos na unha tem sido comumente utilizada para avaliação de doenças relacionada a deficiência e excesso de elementos químicos no organismo (AGUIAR, 2001; SANCHES, 2012). As unhas vêm sendo utilizadas como biomarcadores biológicos para exposições a

contaminantes, seja ocupacional, ambiental ou por uma exposição acidental a materiais tóxicos (CHENG *et al.*, 1994; RODUSHKIN, AXELSSON, 2000a; MENEZES *et al.*, 2004). As unhas constituem um tecido biológico de grande utilidade na avaliação do acúmulo de elementos em baixas concentrações no organismo, na variação nutricional ou dietas enriquecidas em certos elementos (SPATE *et al.*, 1995) e no exame de distúrbios metabólicos provocados por doenças (CHAPMAN *et al.*, 1985; GARLAND *et al.*, 1993; OLGUIM, *et al.*, 1994; XIAO *et al.*, 1995). Uma das doenças mais estudadas pela análise de unhas é a fibrose cística através da determinação do íon cloreto, um indicativo da doença (CHAPMAN *et al.*, 1985; OLGUIM, *et al.*, 1994). A análise da unha pode ser realizada para a identificação e classificação de grupos de indivíduos pela nacionalidade, idade, sexo, área de ocupação e hábitos alimentares (CHENG *et al.*, 1994; CHAUDHARY *et al.*, 1995).

### **3.2 Técnicas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha**

A determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha, geralmente, é realizada utilizando métodos baseados na análise por ativação com nêutrons (NAA) (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1999; AGUIAR, 2001; SANCHES, 2012). Essa técnica foi, por muitos anos, a mais utilizada para a determinação elementar em cabelo e unha, requerendo poucas etapas durante a preparação das amostras (lavagem, secagem e encapsulamento) e permitindo a determinação simultânea de vários elementos químicos (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1999). Entretanto, além de expor o analista a riscos devido a radiação, outras desvantagens estão associadas, como a baixa frequência de análise e o elevado custo de aquisição e manutenção em vista da utilização de um reator nuclear (DEVER, BRESEE, 1989; VANDECASTEELE, BLOCK, 1993).

Outras técnicas analíticas vêm sendo utilizadas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha, como a energia dispersiva de fluorescência de raios-X (EDXRF), fluorescência de raios-X (XRF), a ablação por *laser* acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) e a espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS MAS) (CHAPMAN *et al.*, 1985; CUENCA, PORIES, BRAY, 1988; KONO *et al.*, 1990; HOU *et al.*, 1997; FAGHIHIAN, RAHBARNIA, 2002; RODUSHKIN, AXELSSON, 2003; CHIKAWA *et al.*, 2007; DRESSLER *et al.*, 2010; OZBEK, BAYSAL, 2017; GUARDA *et al.*, 2017). A EDXRF, a XRF e a LA-ICP-MS apresentam capacidade de determinação

multielementar e a possibilidade de eliminar ou reduzir a etapa de preparo de amostras, sem a necessidade do uso de reatores nucleares, como é o caso da NAA (CUENCA, PORIES, BRAY, 1987; KONO *et al.*, 1990; RODUSHKIN, AXELSSON, 2003; CHIKAWA *et al.*, 2007; DRESSLER *et al.*, 2010). Essas técnicas ainda têm como vantagem a possibilidade de realizar o mapeamento da distribuição dos elementos químicos presentes em determinadas regiões da amostra.

A HR-CS MAS é uma técnica que permite a realização de uma análise com o mínimo preparo da amostra, e apresenta uma adequada sensibilidade para a determinação de elementos em baixas concentrações (GUARDA *et al.*, 2017; OZBEK, BAYSAL, 2017). Entretanto, a HR-CS MAS apresenta capacidade de determinação monoelementar e não permite o mapeamento da distribuição dos elementos químicos na amostra, como no caso da EDXRF, XRF e da LA-ICP-MS. Apesar das vantagens mencionadas, as principais limitações das técnicas que utilizam a análise direta de sólidos estão associadas à etapa de calibração, falta de homogeneidade da amostra e efeitos da matriz. Além disso, essas técnicas de determinação não estão disponíveis a muitos laboratórios de análise de rotina.

Outras ferramentas analíticas, relativamente mais simples, têm sido propostas na literatura como alternativas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha (HAC *et al.*, 1997; RODUSHKIN, AXELSSON, 2000b; LEVINE *et al.*, 2007; MOMCILOVIC, *et al.*, 2014; PREJAC *et al.*, 2014; SKALNY *et al.*, 2017). Dentre elas, técnicas espectrométricas com nebulização convencional e plasma indutivamente acoplado que apresentam capacidade de determinação multielementar com elevada seletividade e sensibilidade (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016). Outras técnicas como as cromatográficas e potenciométricas apresentam sensibilidade e seletividade adequadas para alguns elementos e baixo custo de manutenção quando comparada com técnicas espectrométricas (MELLO *et al.*, 2013). Entretanto, um aspecto relevante ao uso dessas técnicas é a necessidade de uma etapa prévia de preparo de amostras, o que para halogênios e enxofre representa um desafio analítico, principalmente pelo risco de perdas e contaminação.

### 3.2.1 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) baseia-se na geração de íons positivamente carregados em um plasma de argônio.

As soluções são introduzidas através de um sistema de nebulização e os íons gerados no plasma são amostrados pela interface e conduzidos até o analisador de massas. Os íons são separados de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e conduzidos até o detector (MONTASER, 1998). As elevadas temperaturas no plasma de argônio minimizam as interferências oriundas da matriz. Contudo, a baixa razão  $m/z$ , o elevado potencial de ionização e a presença de espécies poliatômicas no plasma de argônio são os principais desafios para a determinação de halogênios e enxofre por ICP-MS (MONTASER, 1998; MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016; FLORES *et al.*, 2020).

A determinação de flúor por ICP-MS em plasma de argônio tem sido realizada apenas utilizando algumas condições especiais (considerando a energia de ionização do flúor de 17,4 eV e do argônio de 15,8 eV - eficiência de ionização de apenas 0,0009% do flúor no plasma de argônio). Dentre elas, pode-se mencionar a utilização de espectrômetros de alta resolução (HR-ICP-MS), de espectrômetros com campo setorial e foco duplo (HR-ICP-SF-MS) e de espectrômetros com triplo quadrupolo (ICP-MS/MS) através da adição de bário para a formação de  $^{138}\text{Ba}^{19}\text{F}$  no plasma de argônio e  $\text{NH}_3$  ou  $\text{O}_2$  como gases de reação (FLORES *et al.*, 2020). O uso de espectrômetros com quadrupolo simples operando em modo negativo e de espectrômetros com plasma de hélio (energia de ionização: 24,6 eV) são outras alternativas que vêm sendo propostas para tal finalidade (FLORES *et al.*, 2020). Entretanto, a determinação de flúor por ICP-MS, assim como por outras técnicas de determinação, não é uma tarefa trivial e vem se tornando uma demanda mundial.

A presença de carbono, componente majoritário da matriz da grande maioria das amostras biológicas, como o cabelo e a unha, e o efeito de memória, proveniente da formação de espécies voláteis na câmara de nebulização e no nebulizador, também podem interferir durante a etapa de determinação. Além disso, componentes majoritários da matriz, do ar e dos reagentes utilizados na etapa de preparo de amostras podem causar interferências durante a determinação dos analitos por ICP-MS. Nesse sentido, a etapa de preparo de amostras é essencial e um desafio extremamente considerável para o sucesso da análise (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016; FLORES *et al.*, 2020). Na Tabela 1, estão apresentadas as espécies poliatômicas que podem interferir na determinação de halogênios e enxofre por ICP-MS. Como mencionado anteriormente, essas interferências podem ser advindas dos reagentes durante o preparo de amostras ou da matriz constituinte da amostra.

**Tabela 1.** Interferências poliatômicas na determinação de halogênios e enxofre por ICP-MS (MONTASER, 1998; BU, WANG, HALL, 2003).

Isótopo	Interferências poliatômicas
<sup>19</sup> F	<sup>38</sup> Ar <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>1</sup> H <sup>18</sup> O; <b><sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sub>3</sub></b>
<sup>32</sup> S	<sup>15</sup> N <sup>17</sup> O; <sup>15</sup> N <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H; <sup>14</sup> N <sup>18</sup> O; <sup>14</sup> N <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H; <b><sup>12</sup>N<sup>18</sup>O<sup>1</sup>H<sub>2</sub></b> ; <sup>16</sup> O <sub>2</sub>
<sup>34</sup> S	<sup>15</sup> N <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H; <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O; <sup>17</sup> O <sub>2</sub> ; <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H; <sup>33</sup> S <sup>1</sup> H
<sup>35</sup> Cl	<sup>17</sup> O <sup>18</sup> O; <sup>18</sup> O <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H; <b><sup>34</sup>S<sup>1</sup>H</b>
<sup>37</sup> Cl	<b><sup>1</sup>H<sup>36</sup>Ar</b> ; <sup>19</sup> F <sup>18</sup> O; <sup>36</sup> S <sup>1</sup> H
<sup>79</sup> Br	<sup>38</sup> Ar <sup>40</sup> Ar <sup>1</sup> H; <sup>62</sup> Ni <sup>17</sup> O; <sup>61</sup> Ni <sup>18</sup> O; <b><sup>63</sup>Cu<sup>16</sup>O</b> ; <b><sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sub>3</sub></b> ; <sup>40</sup> Ar <sup>39</sup> K
<sup>81</sup> Br	<b><sup>40</sup>Ar<sub>2</sub>H</b> ; <sup>63</sup> Cu <sup>18</sup> O; <sup>64</sup> Zn <sup>17</sup> O; <b><sup>32</sup>S<sup>16</sup>O<sub>3</sub>H</b> ; <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O <sub>3</sub>
<sup>127</sup> I	<sup>89</sup> Y <sup>38</sup> Ar, <sup>87</sup> Sr <sup>40</sup> Ar, <sup>87</sup> Rb <sup>40</sup> Ar, <sup>91</sup> Zr <sup>36</sup> Ar, <sup>92</sup> Zr <sup>35</sup> Cl, <sup>111</sup> Cd <sup>16</sup> O, <sup>109</sup> Ag <sup>18</sup> O

Em negrito estão destacadas as principais interferências

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) baseia-se na medida da emissão da radiação dos átomos e íons em comprimentos de onda na região do ultravioleta e visível (180 a 800 nm) excitados em um plasma de argônio (NÖLTE, 2003). O sistema de introdução da amostra no plasma em ICP-OES é muito semelhante à ICP-MS. A emissão ocorre pela absorção de energia fornecida aos átomos/íons no plasma de argônio. Embora esta técnica apresente menor sensibilidade quando comparada a ICP-MS para alguns halogênios como, por exemplo, bromo e iodo, a ICP-OES apresenta algumas vantagens no que diz respeito a ocorrência de interferências (MESKO *et al.*, 2016; TJABADI, MKETO, 2019). A ICP-OES é comumente utilizada para a determinação de enxofre nos mais variados tipos de matrizes (TJABADI, MKETO, 2019).

Apesar da ICP-OES ser amplamente utilizada para a determinação de alguns metais com elevada sensibilidade, a determinação de halogênios e enxofre é ainda um grande desafio pois as linhas de emissão mais sensíveis (abaixo de 190 nm) são muito próximas às linhas de emissão dos componentes do ar, geralmente CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016). Algumas estratégias e alterações na configuração do equipamento (sistema óptico evacuado e/ou purgado) podem tornar a utilização da ICP-OES ainda mais adequada para a determinação de elementos com comprimentos de onda de emissão abaixo de 200 nm como, por exemplo, bromo (154,07 nm), cloro (134,72 nm), iodo (178,28 nm) e enxofre (180,73 nm) (NÖLTE, 2003). Assim como para ICP-MS, o elevado potencial de ionização do flúor limita a

determinação desse elemento por ICP-OES. Algumas estratégias como a utilização de um sistema de análise de injeção de fluxo e a determinação indireta baseada no excesso de íons cério (III) após a precipitação de  $\text{CeF}_3$  tem sido proposta na literatura (KOVÁCS, MAGARINI, HALMOS, 2009). Entretanto, essa estratégia não é trivial e a determinação de flúor por ICP-OES, assim como por outras técnicas de determinação, segue sendo um desafio. Além disso, os inconvenientes associados à presença de carbono dissolvido no sistema de introdução e na interface do equipamento tornam a etapa de preparo de amostras um fator indispensável para a análise.

### 3.2.2 Cromatografia de íons

A cromatografia de íons (IC) é bastante adequada para a separação das espécies iônicas inorgânicas e orgânicas (de cadeias curtas e relativamente polares) (BARRON, NESTERENKO, PAULL, 2005; PARK *et al.*, 2014; NOVO *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2019). A separação dos íons presentes na amostra ocorre devido a interação entre as espécies iônicas, fase estacionária e fase móvel. O mecanismo de interação dos íons com a fase estacionária é conhecido como troca iônica. A fase estacionária é constituída por uma matriz polimérica, que possui em sua superfície um grupo funcional ligado. A fase móvel também contém espécies iônicas que competem pelas espécies presentes na amostra e pelos sítios ativos da fase estacionária. Para cada íon, o processo de troca é caracterizado pelo equilíbrio de distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O sistema de detecção utilizado na cromatografia aniônica é, geralmente, baseado na medida de condutividade das espécies iônicas. A condutividade é uma propriedade comum a todas as espécies iônicas em solução. Portanto, quando se almeja a determinação de ânions, a presença de cátions em solução – os quais são oriundos da fase móvel ou até mesmo da solução da amostra – podem afetar de maneira significativa na detecção dos analitos, uma vez que o sinal gerado por cátions é substancialmente superior ao gerado por ânions nesse sistema. Nesse sentido, sistemas de supressão de condutividade do eluente vêm sendo desenvolvidos e têm auxiliado na melhora da sensibilidade e seletividade da técnica para vários analitos (BARRON, NESTERENKO, PAULL, 2005; PARK *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2019).

Outros detectores, como o de radiação ultravioleta-visível (UV-Vis) e o de espectrometria de massas (MS) podem ser utilizados (BARRON, NESTERENKO, PAULL, 2005; PARK *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2019). Outro desafio que deve ser

mencionado é a sobreposição de picos devido a separação inadequada dos analitos que possuem afinidade bastante semelhante com as fases estacionária e móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Algumas alternativas como utilização de diferentes eluentes em concentrações distintas ou a alteração de parâmetros operacionais podem ser avaliadas com o intuito de promover uma melhor separação dos analitos. Além disso, a utilização de detectores adicionais em uma única corrida cromatográfica vem sendo proposta para auxiliar a identificação de espécies coeluídas e a quantificação de elementos em baixas concentração.

O acoplamento da cromatografia de íons com detecção por condutividade (IC-CD) à MS com ionização a pressão atmosférica (API) – particularmente a ionização por *electrospray* – é uma interessante ferramenta para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha. Na ionização por *electrospray*, uma voltagem (que pode variar de 2 a 5 kV) positiva ou negativa é aplicada na agulha e o campo elétrico produz gotículas carregadas que são aceleradas pelo campo elétrico. Após a evaporação do solvente, os íons livres entram no espectrômetro de massas e são separados através de sua razão  $m/z$  (BARRON, GILCHRIST, 2014; BREITBACH, *et al.*, 2016). A utilização de diferentes detectores após a separação cromatográfica - cromatografia de íons com detecção condutimétrica acoplada à espectrometria de massas (IC-DC-MS) – pode ser uma excelente alternativa para a determinação multielementar de halogênios e enxofre em amostras de cabelo e unha, visto que os analitos apresentam-se em variadas faixas de concentração.

De maneira geral, condições brandas de ionização, como ocorre com *electrospray*, não proporcionam a eliminação de compostos da matriz. Nesse sentido, a introdução de soluções compatíveis é requisito fundamental para o sucesso da análise. Apesar da IC-CD-MS ter sido utilizada para a determinação de halogênios e enxofre em amostras biológicas líquidas, tais como sangue e saliva (CHEN, DARVELL, LEUNG, 2004; DEMKOWSKA, POLKOWSKA, NAMIEŚNIK, 2008; PARK *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2019), essa técnica ainda não foi utilizada para a determinação desses elementos em amostras biológicas sólidas, como o cabelo e a unha – com exceção do presente trabalho (MESKO, *et al.*, 2019).

### 3.2.3 Potenciometria com eletrodo íon seletivo

A potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE) é baseada na medida da diferença de potencial de uma célula eletroquímica. A diferença de potencial é gerada



por íons que migram por uma membrana seletiva e está diretamente relacionada com a concentração da espécie iônica em solução (HARRIS, 2006; SKOOG *et al.*, 2006). A técnica apresenta algumas vantagens, principalmente quando comparada com os métodos clássicos de determinação, visto que dispensa vidrarias e reagentes comumente utilizados em técnicas volumétricas e gravimétricas.

A ISE é ainda hoje aplicada para a determinação de flúor nas mais diversas matrizes, incluindo cabelo e saliva (TENOVUO, MIKINEN, 1976; HAC *et al.*, 1997; SAMANIDOU *et al.*, 2002; HEDMAN *et al.*, 2006; REBACZ-MARON *et al.*, 2013; URBANOWICZ *et al.*, 2017). Apesar de um baixo custo de aquisição e manutenção e relativa simplicidade, a ISE é bastante susceptível às interferências. A presença de íons e o pH da solução devem ser controlados de acordo com o tipo de eletrodo. Além disso, o carbono presente em solução pode se depositar na interface da membrana, alterando a sensibilidade do sensor durante as medições e dificultando a interação do flúor com a membrana do eletrodo (DIMESKI, BADRICK, JOHN, 2010; MENDES *et al.*, 2020). Assim, a obtenção de uma solução compatível com a ISE é de extrema importância para a obtenção de resultados confiáveis.

### **3.3 Preparo de amostras**

A maioria das técnicas convencionais utilizadas para a determinação elementar requerem a conversão da amostra em uma solução adequada à análise (FLORES, 2014; KRUG, ROCHA, 2016). Dessa forma, geralmente, faz-se necessária a realização de uma etapa de preparo de amostras. Essa etapa é considerada a mais crítica dentro da sequência analítica, pois demanda tempo, custos e é suscetível a diversos erros que podem comprometer a exatidão e precisão dos resultados (FLORES, 2014; KRUG, ROCHA, 2016). Vale mencionar que não existe um método universal que possa ser aplicado para diferentes matrizes, uma vez que essa etapa depende da natureza da amostra, do analito e da técnica de determinação.

A digestão por via úmida utilizando ácidos, ou mistura de ácidos concentrados, é o método de preparo de amostras geralmente utilizado para a determinação elementar (FLORES, 2014; KRUG, ROCHA, 2016). Entretanto, para a determinação de não metais e, principalmente, de halogênios, a etapa de preparo de amostras é considerada um desafio ainda maior, tendo em vista a instabilidade de algumas espécies de halogênios em meio ácido e a possibilidade de contaminação (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016). O uso de ácidos concentrados resulta em soluções

não compatíveis com a maioria das técnicas de determinação utilizadas para esses elementos (MESKO *et al.*, 2016). Assim, a extração assistida por micro-ondas e a combustão iniciada por micro-ondas podem ser alternativas para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha. As características detalhadas desses métodos serão apresentadas nos itens posteriores.

### 3.3.1 Métodos de preparo de amostras utilizando soluções alcalinas

Os métodos de extração utilizando soluções alcalinas baseiam-se na diferença de afinidade do analito e da matriz com uma solução extratora. A escolha da solução mais adequada irá depender de fatores relacionados às características da amostra e dos elementos a serem determinados. Em busca de uma melhor eficiência e rapidez nos processos de extração, o uso de soluções alcalinas ainda pode ser associado à utilização de fontes de energias alternativas de aquecimento, tais como, por exemplo, a radiação micro-ondas (GU *et al.*, 1998). As soluções mais utilizadas para o preparo de amostras visando à posterior determinação de não metais são: hidróxido de tetrametilamônio (HTMA), aminas terciárias solúveis em água (CFA-C), hidróxido de amônio e carbonato de amônio (NOBREGA *et al.*, 2006).

A utilização de soluções alcalinas durante o preparo de amostras vem demonstrando uma série de vantagens, incluindo recuperações quantitativas para elementos instáveis em meio ácido (NOBREGA *et al.*, 2006). Entretanto, a eficiência do método geralmente está associada à complexidade da matriz e dos reagentes utilizados, pois muitos componentes podem ser lixiviados e interferir durante a etapa de determinação. Para amostras orgânicas, essas interferências estão relacionadas, principalmente, ao carbono dissolvido (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998; NOBREGA *et al.*, 2006). A extração utilizando HTMA foi utilizada para a determinação de iodo por ICP-MS em cabelo de humanos com transtorno de espectro autista. A concentração de iodo variou de 0,483 a 15,9  $\mu\text{g g}^{-1}$  e o limite de detecção (LOD) foi de 0,08  $\mu\text{g g}^{-1}$  (LEVINE *et al.*, 2007). A extração utilizando NaOH foi utilizada para a determinação de flúor por ISE em cabelo de cadáver da região de Gdansk na Polônia. A concentração média foi de 1,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  e o LOD não foi informado (HAC *et al.*, 1997).

Vale mencionar que existem outros trabalhos na literatura que propõem a utilização de métodos de extração ou dissolução com soluções alcalinas para a posterior determinação de diversos elementos, tais como alumínio, arsênio, cálcio, cádmio, cobre, ferro, gadolínio, potássio, manganês, magnésio, sódio, níquel, fósforo,

chumbo, estrôncio e zinco em cabelo, saliva, soro, urina e unha por diferentes técnicas de determinação (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998; NOBREGA *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2008; POZEBON, SCHEFFLER, DRESSLER, 2017); e de bromo e iodo em saliva por ICP-MS (NOVO *et al.*, 2019a). Entretanto, não foram encontrados trabalhos visando à determinação de bromo, cloro e enxofre em cabelo, bem como de halogênios e enxofre em unha – com exceção do presente trabalho (NOVO *et al.*, 2019b; 2019c; MESKO *et al.*, 2019).

### 3.3.2 Métodos de combustão

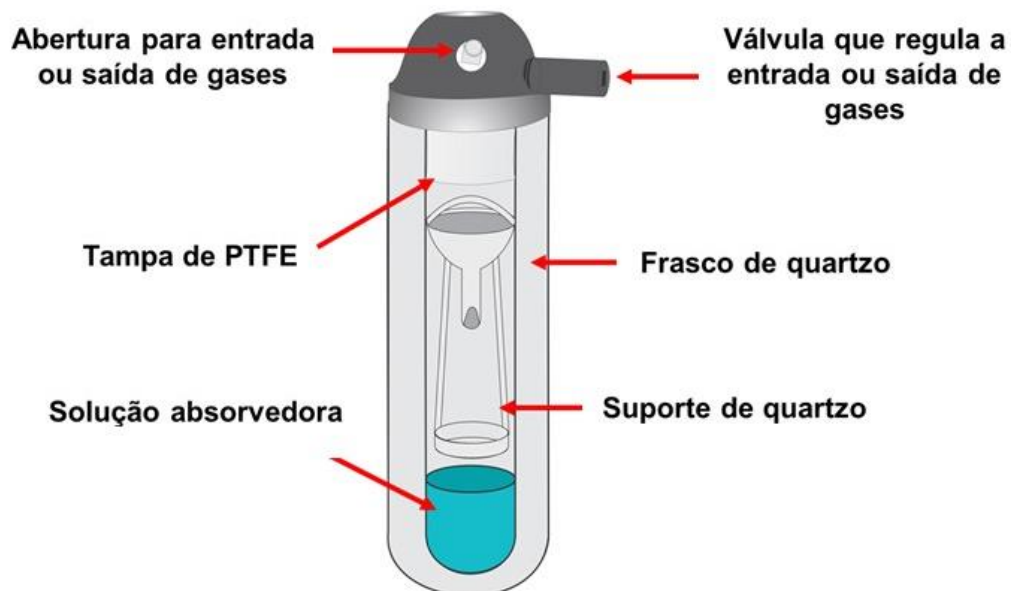
Os métodos de preparo que envolvem a combustão de amostras são caracterizados pela oxidação da matriz orgânica através do fornecimento de energia na forma de calor, convertendo seus constituintes (C, H, O e N) em suas formas oxidadas (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NO<sub>x</sub> e/ou N<sub>2</sub>) (FLORES *et al.*, 2007). Esses métodos merecem destaque pelo fato de utilizarem apenas oxigênio como reagente oxidante. Além disso, os métodos de combustão possibilitam a escolha de uma solução adequada tanto para absorver ou dissolver os analitos, como para a técnica de determinação desejada (FLORES *et al.*, 2007). Essas vantagens vêm de encontro aos métodos de digestão por via úmida, visto que em muitos casos, não proporcionam uma digestão satisfatória e/ou necessitam da utilização de reagentes concentrados.

Os métodos de combustão em sistema fechado merecem destaque por minimizar a perda dos elementos por volatilização e contaminação por fontes externas. Os métodos compreendem o frasco de Schöniger, a bomba de combustão e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Apesar do frasco de Schöniger e a bomba de combustão terem sido utilizados para a posterior determinação elementar em cabelo (FUJITA *et al.*, 1968; VENKATESWARLU, 1994; WANG, ZHOU, YANG, 1995; SUN, LI, 2000), esses métodos apresentam algumas desvantagens como a baixa frequência de análise e a elevada complexidade de manipulação. Por outro lado, a MIC tem tido destaque em vista das diversas vantagens em relação aos métodos clássicos de combustão, e essas vantagens serão destacadas no item a seguir.

#### 3.3.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas

A MIC foi proposta com o objetivo de associar as vantagens da digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas e da combustão em sistemas fechados (FLORES *et al.*, 2004). Na MIC a queima da matéria orgânica é iniciada pela incidência

da radiação micro-ondas em um papel filtro previamente umedecido com um agente oxidante, em uma atmosfera enriquecida com oxigênio. As amostras são geralmente digeridas na forma de comprimidos (ou de invólucros) sobre um suporte de quartzo, em frascos de quartzo fechados e pressurizados com oxigênio, conforme apresentado na Figura 3. Após a combustão, os analitos são liberados e, posteriormente, absorvidos em uma solução apropriada. Uma etapa de refluxo pode ser aplicada para auxiliar na recuperação quantitativa dos analitos. A MIC é um método de preparo de amostras que vem sendo considerado como o estado da arte para o preparo de amostras orgânicas de difícil digestão (FLORES *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Frasco de quartzo e suporte utilizados na combustão iniciada por micro-ondas (adaptado de MESKO, 2008).

A forma de introdução da amostra no sistema de digestão tem sido um parâmetro avaliado como forma de abranger amostras de características físicas e químicas distintas. A utilização de amostras envolvidas em um filme de polietileno (na forma de invólucro) elimina a necessidade da utilização de prensas de alta pressão e possíveis perdas por adesão às paredes do equipamento, além de possibilitar a digestão de amostras semissólidas (PEREIRA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2015). A escolha de uma solução absorvedora adequada possibilita conciliar as características dos elementos e da técnica de determinação selecionada. A absorção de halogênios e enxofre nas mais diversas matrizes tem sido feita com soluções alcalinas diluídas

(na ordem de  $\text{mmol L}^{-1}$ ) ou até mesmo com  $\text{H}_2\text{O}$  (FLORES *et al.*, 2007; 2014; 2016; COELHO Jr, *et al.*, 2017; RONDAN *et al.*, 2018).

A MIC vem sendo aplicada para a posterior determinação de halogênios e enxofre em diversas amostras, tais como industriais (MORAES *et al.*, 2010, PEREIRA *et al.*, 2010), farmacêuticas (BARIN *et al.*, 2016), biológicas (COELHO Jr, *et al.*, 2017; NOVO *et al.*, 2019a), alimentares (RONDAN *et al.*, 2018; MESKO *et al.*, 2016), dentre outras (FLORES, 2014; KRUG, ROCHA, 2016). Esta ampla aplicação está associada às vantagens da MIC, como os baixos valores de branco, redução de tempo de digestão, utilização de materiais inertes, uso de frascos de elevada pressão, baixos valores de carbono residual, elevada massa de amostra quando comparada a outros métodos de combustão em sistema fechado, e ao uso de reagentes diluídos (FLORES *et al.*, 2004; 2007). Apesar disso, não foram encontrados trabalhos na literatura que propõem a utilização da MIC para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha – com exceção do presente trabalho (NOVO *et al.*, 2019b; 2019c; MESKO *et al.*, 2019).

Para melhor elucidação da problemática abordada, no quadro 1 são apresentadas as ferramentas analíticas propostas na literatura para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha no período de 2000 a 2020. Vale mencionar que, como mencionado anteriormente, a grande parte dos trabalhos propostos utilizam métodos baseados na análise direta de sólidos. Para melhor comparação dos resultados, no quadro 1 serão também incluídos os trabalhos desenvolvidos e publicados durante esta tese.

**Quadro 1.** Ferramentas analíticas propostas na literatura para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha.

Amostra	Elem.	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Faixa de concentração	Referência
Cabelo	Br	As amostras foram lavadas, secas e analisadas diretamente	XRF	Não informado	CHIKAWA <i>et al.</i> , 2007
Cabelo	Br, Cl, F, I e S	As amostras foram lavadas e secas. Cerca de 300 mg de cabelo foram digeridos por MIC utilizando $\text{NH}_4\text{OH}$ $100 \text{ mmol L}^{-1}$ como solução absorvedora	IC-CD-MS ICP-MS ICP-OES	Br: $0,24$ a $4,17 \mu\text{g g}^{-1}$ Cl: $56,1$ a $1.190 \mu\text{g g}^{-1}$ F: $11 \mu\text{g g}^{-1}$ I: $0,56$ a $9,41 \mu\text{g g}^{-1}$ S $40.200$ a $61.200 \mu\text{g g}^{-1}$	MESKO <i>et al.</i> , 2019
Cabelo	Br, Cl, I e S	As amostras foram lavadas e secas. Cerca de 200 mg de cabelo foram analisados diretamente envolvidas em recipientes de polietileno	INAA	Br: $0,23$ a $7,7 \mu\text{g g}^{-1}$ Cl: $55$ a $4.873 \mu\text{g g}^{-1}$ I: $0,13$ a $2,45 \mu\text{g g}^{-1}$ S: $3,34$ a $6,83 \mu\text{g g}^{-1}$	FAGHIHIAN, RAHBARNIA, 2002
Cabelo	Br e I	As amostras foram lavadas e secas. Cerca de 300 mg de cabelo foram digeridos por MIC utilizando $\text{NH}_4\text{OH}$ $100 \text{ mmol L}^{-1}$ como solução absorvedora	ICP-MS	Br: $0,24$ a $4,17 \mu\text{g g}^{-1}$ I: $0,56$ a $9,41 \mu\text{g g}^{-1}$	NOVO <i>et al.</i> , 2019c
Cabelo	Cl	CRM de cabelo foi analisado diretamente na forma sólida.	HR-CS GF MAS	Cl: $48,2 \mu\text{g g}^{-1}$	GUARDA <i>et al.</i> , 2017
Cabelo	F	As amostras foram lavadas e secas. O cabelo foi digerido em bloco digestor a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h utilizando 1 mL de $\text{HClO}_4$	ISE	F: $20$ a $182 \mu\text{g g}^{-1}$	REBACZ-MARON <i>et al.</i> , 2013

(continuação)

Cabelo	I	As amostras foram lavadas, secas e moídas. Cerca de 0,05 g de cabelo foram digeridos em micro-ondas (180 °C por 20 min) utilizando HNO <sub>3</sub> concentrado	ICP-MS	I: 0,15 a 1,0 µg g <sup>-1</sup>	SKALNY <i>et al.</i> , 2017
Cabelo	I	As amostras foram lavadas, secas e moídas. Cerca de 0,5-1,0 g de cabelo foram digeridos em banho ultrassônico utilizando a mistura de HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP-MS	I: 0,01 a 114 µg g <sup>-1</sup>	PREJAC <i>et al.</i> , 2014
Cabelo	I	As amostras foram lavadas, secas e moídas. Cerca de 25 mg de cabelo, 2 mL de HTMA 25% e 2 mL de água desionizada foram aquecidos em bloco digestor a 80 °C por 4 h. Após a extração, uma alíquota de 10 mL NaOH 0,1% foi adicionado e as amostras foram aferidas a 20 mL com H <sub>2</sub> O. A solução foi agitada em vórtice e o sobrenadante filtrado e analisado	ICP-MS	I: 0,483 a 15,9 µg g <sup>-1</sup>	LEVINE <i>et al.</i> , 2007

(continuação)

Cabelo	I	As amostras foram lavadas e secas. Cerca de 2 cm de fios de cabelo foram dispostos em fita adesiva dupla face e, posteriormente, em lâminas de microscópio previamente à introdução na câmara de ablação	LA-ICP-MS	I: 30 a 129 $\mu\text{g g}^{-1}$	DRESSLER <i>et al.</i> , 2010
Cabelo	I	As amostras foram lavadas, secas e moídas. Cerca de 50 mg do cabelo foram digeridos em micro-ondas (150 W por 10 min, 0 W por 2 min, 300 W por 10 min e 0 W por 30 min) utilizando 500 $\mu\text{L}$ de $\text{HNO}_3$ , 300 $\mu\text{L}$ de $\text{HCl}$ e 200 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	ICP-MS	I: 30 a 129 $\mu\text{g g}^{-1}$	DRESSLER <i>et al.</i> , 2010
Cabelo	S	As amostras foram lavadas, secas e moídas. Cerca de 100 mg de cabelo foram digeridos em chapa de aquecimento (110 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min) utilizando 10 mL de $\text{HNO}_3$ concentrado	HR-CS GF MAS	S: 36.100 a 69.400 $\mu\text{g g}^{-1}$	OZBEK, BAYSAL, 2017
Unha	Br	As amostras foram lavadas e secas. Cerca de 170 mg de unha foram analisadas diretamente envolvidas em recipientes de polietileno e folhas de alumínio	INAA	Br: 0,5 a 6,5 $\mu\text{g g}^{-1}$	SANCHES, 2012



(continuação)

Unha	Br e I	As amostras foram lavadas e secas. Cerca de 100 mg de unha foram digeridas por MIC utilizando $\text{NH}_4\text{OH}$ $100 \text{ mmol L}^{-1}$ como solução absorvedora	ICP-MS	Br: 1,17 a $3,16 \mu\text{g g}^{-1}$ I: 0,22 a $0,72 \mu\text{g g}^{-1}$	NOVO <i>et al.</i> , 2019a
Cabelo e unha	Br e Cl	As amostras foram lavadas, secas e analisadas diretamente envolvidas em recipientes de polietileno	INAA	Cabelo Br: 0,24 a $35,08 \mu\text{g g}^{-1}$ Cl: 35,6 a $9.023 \mu\text{g g}^{-1}$  Unha Br: 0,57 a $78,2 \mu\text{g g}^{-1}$ Cl: 12,30 a $11.157 \mu\text{g g}^{-1}$	AGUIAR, 2001
Cabelo e unha	Br, Cl e I	As amostras foram lavadas, secas e grampeadas em papelão previamente à introdução na câmara de ablação	LA-ICP-MS	Cabelo: Não informado  Unha Br: 9,7 a $11,9 \mu\text{g g}^{-1}$ Cl: 3.600 a $3.900 \mu\text{g g}^{-1}$ I: 0,027 a $0,084 \mu\text{g g}^{-1}$	RODUSHKIN, AXELSSON, 2003
Cabelo e unha	Br, Cl e I	As amostras foram lavadas, secas e moídas. Cerca 50 mg das amostras foram digeridas em micro-ondas (325 W por 30 min) utilizando 500 $\mu\text{L}$ de $\text{HNO}_3$ e 500 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	HR-ICP-SF-MS	Cabelo Br: 5,6 a $221 \mu\text{g g}^{-1}$ Cl: 1.350 a $27.000 \mu\text{g g}^{-1}$ I: 0,13 a $3,31 \mu\text{g g}^{-1}$  Unha Br: 6,5 a $49,9 \mu\text{g g}^{-1}$ Cl: 2.020 a $22.600 \mu\text{g g}^{-1}$ I: 0,077 a $0,810 \mu\text{g g}^{-1}$	RODUSHKIN, AXELSSON, 2000a, 2000b, 2003

(continuação)

Cabelo e unha	CI	As amostras foram lavadas, secas e analisadas diretamente	INAA	Cabelo CI: 8 a 809 $\mu\text{g g}^{-1}$  Unha: CI: 44 a 4.480 $\mu\text{g g}^{-1}$	MENEZES <i>et al.</i> , 2004
---------------	----	---	------	--	---------------------------------

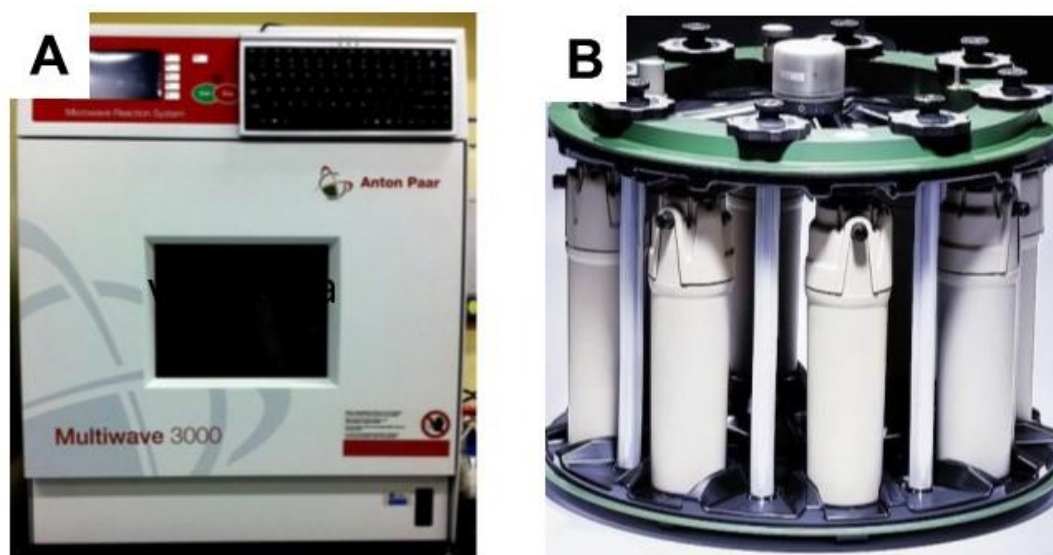
#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

*Nesse capítulo serão descritos equipamentos, reagentes, amostras, procedimentos e parâmetros utilizados para o preparo e análise das amostras. Os métodos de preparo de amostras avaliados para a subsequente determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha foram a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), a digestão assistida por radiação micro-ondas (MAD) e a extração assistida por radiação micro-ondas (MAE). A determinação foi realizada por IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE. Adicionalmente foi realizada uma avaliação para a determinação e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS.*

#### 4.1 Instrumentação

A moagem foi realizada em moinho de facas 226/5 (Lucadema Científica, Brasil), a secagem em estufa 400/2ND (Nova Ética, Brasil) e a pesagem em balança analítica AY220 com resolução 0,0001 g e carga máxima de 220 g (Marte, Brasil). Um purificador de água MegaUP (MegaPurity, Coreia do Sul) foi utilizado para obter água ultrapura (resistividade até 18,3 M $\Omega$  cm) e um sistema Duopor (Milestone, Itália) foi usado para bidestilar o HNO<sub>3</sub>. A descontaminação e a secagem dos materiais diversos foram realizadas com banho de ultrassom USC – 1800 A (Unique, Brasil) e com capela de fluxo laminar CFLH – 09 classe 100 (Veco, Brasil). Um medidor de pH mPA-210 (Tecnozon, Brasil) foi utilizado para determinar o pH das soluções.

Os procedimentos correspondentes aos métodos de MIC, MAD e MAE foram realizados em forno micro-ondas *Multiwave 3000*<sup>®</sup> - *Microwave sample preparation system* (Anton Paar, Áustria) contendo rotor com capacidade para oito frascos, conforme apresentado na Figura 4. O equipamento contém sensores de temperatura e de pressão, que permitem o acompanhamento dos parâmetros em tempo real. A potência também pode ser monitorada durante o programa de aquecimento.



**Figura 4.** A) forno micro-ondas e B) rotor para oito frascos utilizados para o preparo de amostras.

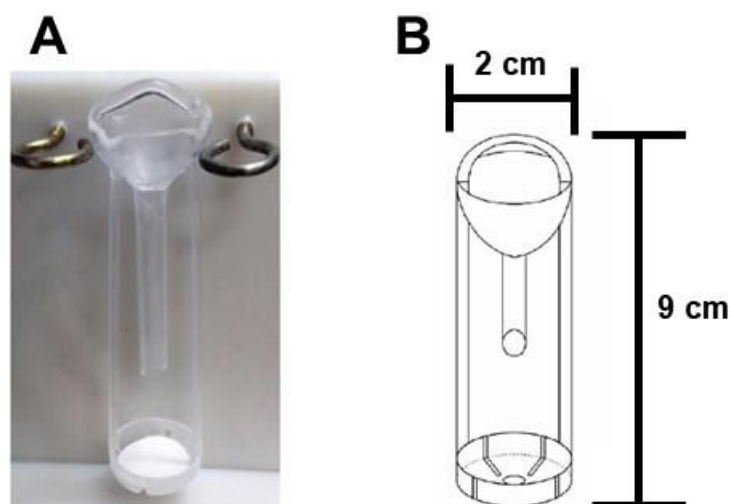
Oito frascos de quartzo com volume interno de 80 mL foram utilizados na MIC e oito frascos de politetrafluoretileno modificado quimicamente (PTFE-TFM) com volume interno de 80 mL foram utilizados na MAD e MAE. A temperatura e a pressão

foram limitadas a 280 °C e 80 bar durante a MIC, respectivamente, e a 260 °C e 60 bar durante a MAD e a MAE, respectivamente. Essas condições foram selecionadas de acordo com as recomendações do fabricante (v2.50 *Software*, Anton Paar). Na Figura 5 são apresentados os frascos de (A) quartzo e (B) PTFE-TFM utilizados nos métodos de preparo de amostras.



**Figura 5.** A) frasco de quartzo utilizado na MIC e B) frasco de PTFE-TFM utilizado na MAD e MAE (Adaptado de PEREIRA, 2014).

Uma prensa hidráulica de aço inoxidável SSP-10 41 com pressão máxima de 10 toneladas (Shimadzu, Japão) e punções em aço inoxidável (12 mm de diâmetro) foram utilizadas para preparar os *pellets*. Um soldador elétrico de ferro foi utilizado para preparar os invólucros. Um suporte de quartzo foi inserido em cada frasco de digestão quando as amostras foram preparadas utilizando a MIC. Esse suporte apresenta na parte superior um funil, que minimiza danos na tampa do frasco em virtude da chama proveniente da combustão, além de permitir que a solução absorvedora promova uma lavagem efetiva. Na base do suporte existem fendas que permitem maior contato de O<sub>2</sub> com a amostra no momento da combustão. O suporte de quartzo utilizado na tese foi confeccionado no Laboratório de Hialotecnica da Universidade Federal de Santa Maria. Para melhor compreensão, o suporte de quartzo é apresentado na Figura 6.



**Figura 6.** A e B) suporte de quartzo utilizado na MIC como suporte para a amostra.

Para a determinação dos halogênios e de enxofre foi utilizado um cromatógrafo de íons ICS-5000 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA) equipado com uma coluna de troca aniônica IonPac AS11-HC (250 mm x 2 mm i.d., tamanho de partícula 4  $\mu\text{m}$ ) e uma coluna de proteção IonPac AG11-HC (50 mm x 2 mm i.d.), com temperatura controlada a 30  $^{\circ}\text{C}$ . O cromatógrafo é equipado com supressor de ânions eletroliticamente regenerado ERS 500 (2 mm, modo de água externa de supressão automática a 0,20 mL  $\text{min}^{-1}$  e 56 mA), cartucho gerador de fonte eluente EGC 500 KOH com coluna de retenção de ânions continuamente regenerada CR-ATC e amostrador automático AS-AP. A célula de condutividade (Thermo Fisher Scientific) com temperatura controlada a 35  $^{\circ}\text{C}$  foi utilizada para detecção de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , sendo conectada (tubo PEEK, 300 mm x 0,25 mm i. d.) a um espectrômetro de massas MSQ Plus (Thermo Fisher Scientific) utilizado para detecção de  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$ . O nitrogênio utilizado como gás nebulizador na fonte de ionização foi produzido pelo gerador de nitrogênio 18LA (Peak Scientific, Escócia). A determinação dos analitos foi realizada em uma única corrida cromatográfica por integração da área de pico. O controle do equipamento e aquisição de dados foram realizados com o *software* Chromeleon 7.0 (Thermo Fisher Scientific).

A determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre foi feita utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado Elan DRC II (PerkinElmer SCIEX, EUA) equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA), câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion, Inc.,

EUA) e tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc.) com o tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.). A determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre foi também realizada utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado Spectro Ciros CCD (Spectro Analytical Instruments, Alemanha) equipado com nebulizador pneumático tipo *cross-flow*, câmara de nebulização duplo passo e tocha com injetor de quartzo (2,5 mm d.i.). Flúor foi determinado utilizando um potenciômetro digital HI 3221 pH/ORP/ISE Meter (Hanna, Estados Unidos) com eletrodo combinado íon seletivo para fluoreto HI 4110 (Hanna). O carbono dissolvido das soluções foi determinado utilizando o espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments).

A possibilidade de determinação e de observar a distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha foi avaliada por LA-ICP-MS com um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado Agilent 7900 (Agilent Technologies, EUA) com ablação por *laser*. A ablação por *laser* foi realizada utilizando um sistema Analyte G2 193 nm ArF\*, comprimento de pulso < 4 ns (Teledyne CETAC Technologies, EUA) equipado com câmara de ablação COBALT (Teledyne CETAC Technologies) por meio de um sistema de introdução rápida em aerossol (ARIS) (Teledyne CETAC Technologies). O ARIS é um complemento de baixa dispersão da câmara de ablação COBALT, consistindo em uma tubulação de transporte de aerossol (tubo PEEK, 1,2 m x 1 mm i. d.) e um dispositivo para misturar o fluxo de hélio - transportador do aerossol gerado na cela de ablação - com o fluxo de gás de reposição de argônio antes da introdução da amostra no injetor da tocha. Um vórtex Analog Vortex Mixer (VWR, Alemanha), uma placa de aquecimento A3 (Analab, França) e uma microbalança M3P (Sartorius, Alemanha) foram utilizados para preparar os padrões e as amostras. Um equipamento de polir LaboPol-5 (Struers Inc., EUA) utilizando papel SiC com granulometria 800, 1200, 2400, 4000 (Struers Inc), um piramitome (LKB Produkter, Suécia) utilizando faca de vidro confeccionada no próprio laboratório e um perfilômetro óptico NT 9080 (Veeco, Alemanha) foram utilizados para avaliar as estratégias de calibração para a determinação dos analitos por LA-ICP-MS.

## 4.2 Reagentes

Acetona 99% (Proquimios, Brasil) foi utilizada para realizar a lavagem das amostras. Ácido nítrico 65% (Synth, Brasil) e álcool etílico absoluto 96 GL (Synth) foram utilizados para a descontaminação das vidrarias, discos de papel (15 mm de

diâmetro, 12 mg) utilizados como auxiliar de combustão (Unifil, Alemanha), filmes de polietileno (8 x 8 cm e massa de aproximadamente 50 mg) utilizados para invólucros para as amostras (Congelito, Brasil), papéis filtro C40 (Unifil) e materiais diversos. Hidróxido de amônio e HTMA utilizados como solução absorvedora e extratora foram preparados a partir de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  27% de  $\text{NH}_3$  em  $\text{H}_2\text{O}$  (Dinâmica, Brasil) e HTMA 25% em água (Sigma-Aldrich, EUA), respectivamente. Ácido nítrico 65% (Merck, Alemanha) bidestilado foi utilizado como solução digestora. Na MIC, o iniciador da combustão foi preparado com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Merck) e os frascos foram pressurizados com oxigênio de elevada pureza 99,5% (Linde, Brasil).

Soluções padrão contendo  $1.000 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  foram preparadas dissolvendo KBr (Merck), NaCl (Dinâmica), KI (Merck), NaF (Merck) e  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (Synth) em água ultrapura. Essas soluções foram diluídas e usadas para preparar as curvas de calibração para determinação dos analitos por diferentes técnicas de determinação. Os mesmos sais foram utilizados para preparar as soluções adicionadas nos ensaios de recuperação. Ácido cítrico (Merck) foi utilizado para a determinação carbono por ICP-OES e ítrio  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (SpexCertPrep, EUA) foi utilizado com padrão interno. A determinação dos analitos por ICP-MS e ICP-OES foi realizada com argônio de alta pureza 99,998% (White Martins, Brasil) e a determinação de flúor por ISE utilizando o reagente TISAB II (Dinâmica) para garantir ajuste da força iônica.

Na LA-ICP-MS, fita adesiva dupla face 11 mm (HEMA, China), lâminas de microscópio 26 x 76 x 1,0 mm (Superfrost, Thermo Fisher Scientific), resina epóxi (Struers Inc., EUA) e vidro de borossilicato 24 x 40 mm (VWR, Alemanha) foram utilizados para introduzir as amostras e os padrões na câmara de ablação. O ajuste das configurações do equipamento foi realizado utilizando o CRM NIST 612 de vidro (NIST, EUA). Ureia (Sigma-Aldrich), dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich) e 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) foram utilizados para extrair a queratina do cabelo. O pH da extração foi mantido em 9,0 com solução tampão (Riedel-de Haen, Romênia). Uma membrana de celulose para tubos de diálise 25 mm de largura, 16 mm de i.d. (Sigma-Aldrich) foi utilizada para purificar a queratina. Glicerol (Sigma-Aldrich) foi utilizado como plastificante para as gotas de queratina. Soluções padrão monoelementares ( $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de brometo (Merck), cloreto (Merck) e iodeto (Merck) e soluções de bromato, clorato e iodato preparadas por dissolução de sais  $\text{KBrO}_3$  (UCB, Bélgica),  $\text{KClO}_3$  (UCB) e  $\text{KIO}_3$  (UCB) foram utilizadas na etapa de calibração para a determinação dos elementos por LA-ICP-MS.



### **4.3 Descontaminação de materiais diversos**

As vidrarias e outros materiais comuns de laboratório foram descontaminados com HNO<sub>3</sub> 10%, por pelo menos 24 h, lavados com álcool etílico absoluto e água ultrapura. Os discos de papel filtro e os filmes de polietileno foram descontaminados após a imersão em HNO<sub>3</sub> 10% por 10 min em banho ultrassônico, sendo posteriormente submetido ao mesmo procedimento com álcool etílico absoluto ao invés de HNO<sub>3</sub>, lavados com água ultrapura e secos em capela de fluxo laminar. Os frascos de quartzo e PTFE-TFM, assim como os suportes de quartzo foram descontaminados com HNO<sub>3</sub> concentrado sob aquecimento em forno micro-ondas. O programa de aquecimento utilizado foi de 1000 W por 10 min, seguido de 20 min a 0 W (etapa de resfriamento). Previamente ao preparo das amostras, o procedimento de descontaminação foi repetido utilizando água ultrapura.

### **4.4 Amostras e materiais de referência**

As amostras de cabelo (cerca de 1 g por voluntário) e de unha (cerca de 0,1 g por voluntário) foram coletadas sem nenhuma restrição em salões de beleza na cidade de Pelotas (RS, Brasil). O cabelo e a unha foram cortados por um profissional do salão com uma tesoura de aço inoxidável e armazenados em frasco de polietileno. No laboratório, as amostras foram lavadas três vezes com acetona e água (entre as repetições), conforme recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA; 1985; POZEBON, SCHEFFLER, DRESSLER, 2017). As amostras foram moídas, secas em estufa a 60 °C e armazenadas em frasco de polipropileno. Cerca de 10 g de cabelo e 5 g de unha de diferentes voluntários foram homogeneizadas, considerando cada matriz, para o desenvolvimento dos métodos. Os objetivos e os procedimentos foram apresentados para o profissional do salão e para os voluntários de acordo com o projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFPel (parecer: 2.251.932 – Anexo 1). Na Figura 7 é apresentado o aspecto das amostras após a realização da etapa de pré-tratamento.



**Figura 7.** A) amostra de cabelo e B) de unha após a etapa de pré-tratamento.

O CRM NCS DC73347a de cabelo humano do *China National Analysis Center for Iron and Steel* foi utilizado para avaliar a exatidão dos métodos propostos para a análise de cabelo. O CRM NIST 8435 (leite em pó integral) do *National Institute of Standards and Technology* foi utilizado, misturado com a amostra de unha para a realização de um ensaio de recuperação na forma sólida, para avaliar a exatidão dos métodos propostos.

#### 4.5 Métodos avaliados para o preparo de amostras de cabelo e unha

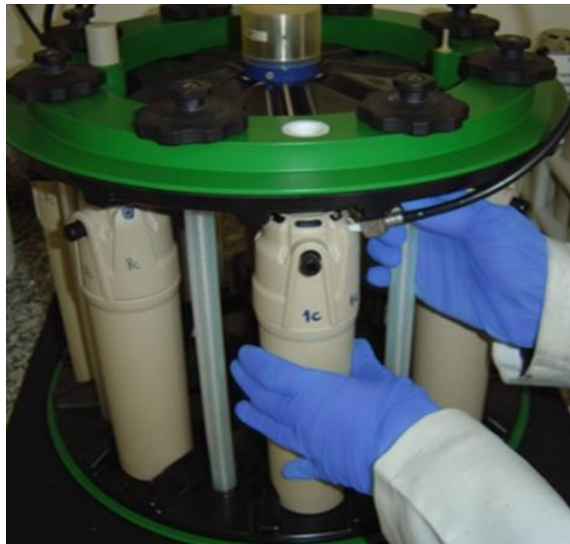
##### 4.5.1 Combustão iniciada por micro-ondas

Amostras de cabelo (30 a 300 mg) ou de unha (30 a 100 mg) foram prensadas usando uma prensa hidráulica ajustada em 3 toneladas por 1 min, ou embrulhadas em filme de polietileno selado por aquecimento e seu excesso removido. Na Figura 8 são apresentadas as formas de introdução das amostras avaliadas para a MIC.



**Figura 8.** Cerca de 100 mg de amostra de cabelo preparadas na forma de A) *pellet* e B) invólucro e de unha preparadas na forma de C) *pellet* e D) invólucro.

Os *pellets* ou invólucros foram colocados na base de um suporte de quartzo, contendo disco de papel de filtro previamente umedecido com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$ . O suporte contendo a amostra foi introduzido em frasco de quartzo contendo 6 mL da solução absorvedora. As soluções absorvedoras avaliadas foram água ultrapura e  $\text{NH}_4\text{OH}$  nas concentrações de 25, 50 ou 100 mmol  $\text{L}^{-1}$ , selecionadas de acordo com estudos anteriores (FLORES, 2014; 2016). Os frascos foram fechados, fixados no rotor, pressurizados com 20 bar de  $\text{O}_2$ , como pode ser observado na Figura 9, e submetidos ao programa de radiação micro-ondas de 1400 W por 5 min (etapas de combustão e refluxo) e 0 W por 20 min (etapa de resfriamento) - taxa de aumento de pressão: 0,8 bar  $\text{s}^{-1}$ , temperatura máxima: 280  $^\circ\text{C}$  e pressão máxima: 80 bar.



**Figura 9.** Frascos de quartzo fechados, fixados no rotor e sendo pressurizados com 20 bar de oxigênio.

Inicialmente, o tempo de ignição e combustão foram determinados visualmente através de uma adaptação na capa de proteção do frasco com um corte frontal, conforme apresentado na Figura 10, utilizando função *Power check* no *software* do equipamento e cessando a radiação logo após iniciar a combustão (PEREIRA, 2014). O volume da solução absorvedora, o volume e a concentração da solução de ignição, o programa de radiação micro-ondas e a pressão de oxigênio foram selecionados de acordo com estudos anteriores (FLORES, 2014; 2016).



**Figura 10.** Frasco de quartzo com capa de proteção adaptada.

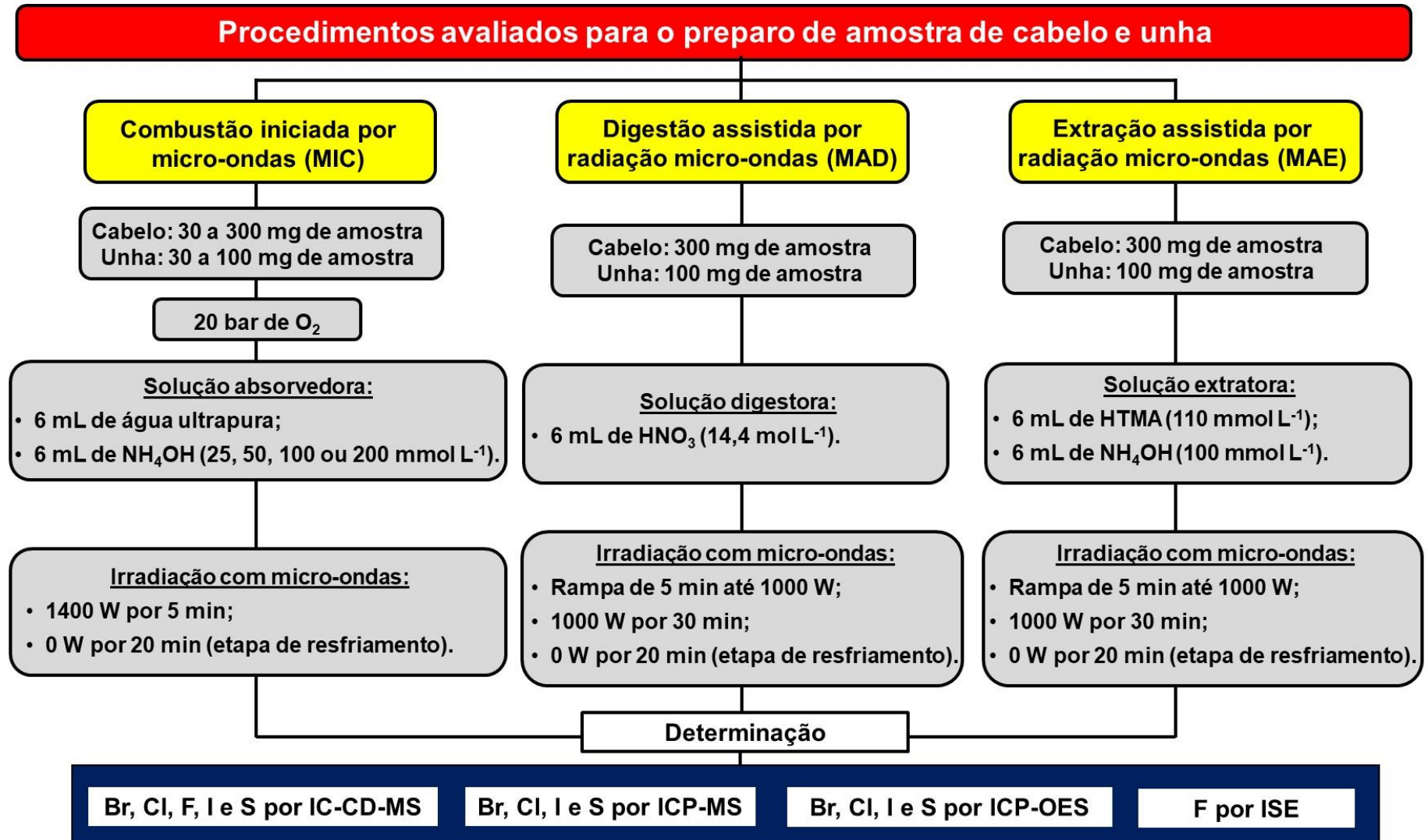
Após a digestão, a solução final foi diluída com água até 20 mL para a posterior determinação de halogênios e enxofre por diferentes técnicas de determinação. A compatibilidade da solução final com as técnicas de determinação foi avaliada pela determinação do carbono dissolvido por ICP-OES.

#### 4.5.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas e extração assistida por radiação micro-ondas utilizando soluções alcalinas

Nos métodos de preparo de amostras baseados na MAD e MAE, massas de 300 mg de cabelo ou 100 mg de unha e 6 mL da solução digestora ( $\text{HNO}_3$  14,4 mol L<sup>-1</sup>) ou extratora (HTMA 110 mmol L<sup>-1</sup> ou  $\text{NH}_4\text{OH}$  100 mmol L<sup>-1</sup>) foram transferidos para frascos de PTFE-TFM. Os frascos foram fechados, fixados ao rotor e submetidos ao programa de radiação micro-ondas de 1000 W por 15 min (rampa de 5 min até 1000 W) e 0 W por 20 min (etapa de resfriamento) - taxa de aumento de pressão: 0,8 bar s<sup>-1</sup>, temperatura máxima: 240 °C e pressão máxima: 60 bar. A temperatura máxima para a extração com HTMA foi limitada a 90 °C para evitar a degradação do reagente (KNAPP et al. 1998). As soluções e o programa de aquecimento utilizados foram selecionados com base em trabalhos publicados na literatura (KNAPP et al., 1998; NOBREGA et al., 2006; COSTA et al., 2015; SKALNY et al., 2017).

Os extratos foram filtrados e, assim como os digeridos, diluídos com água até 20 mL para a posterior determinação de halogênios e enxofre por diferentes técnicas de determinação. A compatibilidade da solução final com diferentes técnicas de

determinação foi avaliada pela determinação do carbono dissolvido por ICP-OES. Na Figura 11 são apresentados os procedimentos avaliados para o preparo de amostras de cabelo e unha visando à posterior determinação de halogênios e enxofre por diferentes técnicas de determinação.



**Figura 11.** Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de cabelo e unha para subsequente determinação de halogênios e enxofre por diferentes técnicas de determinação.

#### 4.6 Exatidão, precisão, limites de quantificação e análise estatística

A exatidão dos métodos foi avaliada inicialmente pela realização de ensaios de recuperação utilizando solução padrão, adicionando 50 e 100% da concentração previamente detectada dos analitos nas amostras utilizadas para as otimizações ou 2 e 3 vezes o valor equivalente ao limite de quantificação (LOQ). Um CRM de cabelo foi analisado com as mesmas condições estabelecidas para avaliar a exatidão dos métodos propostos para a análise de cabelo. Ensaios de recuperação na forma sólida utilizando CRM misturado com a amostra, foram feitos para avaliar a exatidão dos métodos propostos para análise de unha.

A precisão foi avaliada por repetibilidade e precisão intermediária conforme recomendado pela Eurachem (EURACHEM, 2014). O limite de quantificação (LOQ) para os elementos foi estimado como  $LOQ = kQ \times s'_0$ , sendo  $kQ$  o fator de multiplicação (10 para LOQ) e  $s'_0$  o desvio padrão de dez medidas do branco (EURACHEM, 2014). No entanto, o valor médio do elemento para o branco ou para a concentração limite quantificável foi incluído na fórmula do cálculo ( $\bar{x} \pm kQ \times s'_0$ , sendo  $\bar{x}$  a média dos valores). A estatística foi realizada com o *software* GraphPad InStat (teste t de Student ou ANOVA, nível de confiança de 95%, 3.00 Software Inc., EUA).

#### 4.7 Determinação de halogênios e enxofre por IC-CD-MS

Alguns parâmetros da técnica, como modo de eluição, voltagem do cone, voltagem da agulha e temperatura da sonda foram otimizados considerando a ausência de relatos na literatura para a determinação multielementar de halogênios e enxofre por IC-CD-MS. As curvas de calibração foram preparadas de acordo com a sensibilidade da técnica ou com a faixa de concentração dos elementos nas amostras. As curvas de calibração foram preparadas de 0,005 a 0,05 mg L<sup>-1</sup> para Br<sup>-</sup>; 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> para Cl<sup>-</sup>; 0,01 a 0,1 mg L<sup>-1</sup> para F<sup>-</sup>; 0,001 a 0,01 mg L<sup>-1</sup> para I<sup>-</sup> e 1,0 a 10 mg L<sup>-1</sup> para SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, em meio a solução em que a amostra se encontrava no momento da análise – visando evitar possíveis erros na etapa de determinação. Na Tabela 2 são apresentadas as condições operacionais utilizadas para a determinação dos analitos por IC-CD-MS.

**Tabela 2.** Parâmetros na determinação de halogênios e enxofre por IC-CD-MS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Condição</b>
<b>IC</b>	
Fase móvel	KOH
Vazão da fase móvel, mL min <sup>-1</sup>	0,28
Volume de injeção, µL	50
Modo de integração do sinal	Área de pico
<b>MS</b>	
Modo de ionização	<i>Electrospray</i>
Polarização	Negativa
Gás do nebulizador, bar	5,5
Intervalo, m/z e tempo de espera, s scan <sup>-1</sup>	0,2 e 1,0, respectivamente
Isótopos, m/z	<sup>79</sup> Br, <sup>127</sup> I

#### 4.8 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre por ICP-MS e ICP-OES

Inicialmente, estudos sistemáticos foram realizados para avaliar interferências poliatômicas, efeitos de acidez residual e carbono dissolvido e faixa de concentração na determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre por ICP-MS e ICP-OES. As curvas de calibração foram de 1,0 a 10 µg L<sup>-1</sup> para Br, 500 a 10.000 µg L<sup>-1</sup> para Cl, 0,1 a 1,0 µg L<sup>-1</sup> para I e 100 a 10.000 µg L<sup>-1</sup> para S por ICP-MS. Por outro lado, as curvas de calibração foram de 250 a 50.000 µg L<sup>-1</sup> para Br, 500 a 10.000 µg L<sup>-1</sup> para Cl, 100 a 10.000 µg L<sup>-1</sup> para I e 25 a 1.000 µg L<sup>-1</sup> para S por ICP-OES. Na Tabela 3 são apresentadas as condições operacionais utilizadas para a determinação dos analitos por ICP-MS e ICP-OES.

#### 4.9 Determinação de carbono por ICP-OES

Na determinação de carbono dissolvido, ácido cítrico foi utilizado como fonte de carbono e ítrio (1 mg L<sup>-1</sup>) como padrão interno. A curva de calibração foi de 25 a 500 mg L<sup>-1</sup> para C em meio a HNO<sub>3</sub> 5%. Previamente à determinação de carbono, todas as soluções foram purgadas com argônio (0,1 L min<sup>-1</sup>, durante 2 min). Na Tabela 3 são apresentadas as condições operacionais utilizadas para a determinação de carbono dissolvido por ICP-OES.



**Tabela 3.** Parâmetros na determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre por ICP-MS e bromo, cloro, iodo, enxofre e carbono por ICP-OES.

<b>Parâmetros</b>	<b>ICP-MS</b>	<b>ICP-OES</b>
Potência do gerador de RF, W	1400	1400
Vazão principal de argônio, L min <sup>-1</sup>	15	15
Vazão auxiliar de argônio, L min <sup>-1</sup>	1,2	1,0
Vazão de argônio do nebulizador, L min <sup>-1</sup>	1,1	1,0
Câmara de nebulização	Ciclônica	Duplo passo, scott
Nebulizador	Concêntrico	<i>Cross flow</i>
Cones de amostragem e <i>skimmer</i>	Pt	-
Lente iônica	<i>Auto lens on</i>	-
Isótopos, m/z	<sup>34</sup> S, <sup>35</sup> Cl, <sup>79</sup> Br, <sup>127</sup> I	-
Comprimentos de onda, nm		Cl (134,72), Br (154,07), I (178,28), S (180,73) e C (193,03)

#### 4.10 Determinação de flúor por ISE

Na determinação de flúor em cabelo e unha por ISE, a curva de calibração foi preparada de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> em 30 mL e uma solução de TISAB II foi adicionada para o ajuste da força iônica (15 mL). Na Tabela 4 são apresentadas as condições operacionais para a determinação de flúor por ISE.

**Tabela 4.** Parâmetros na determinação de flúor por ISE.

<b>Parâmetros</b>	<b>ISE</b>
Solução para leitura, mL	30
Eletrodo para F <sup>-</sup>	HI 4110
Proporção de tampão	1:1

#### 4.11 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS

A avaliação da adequabilidade da LA-ICP-MS para a determinação da concentração e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-

ICP-MS foi realizada de maneira complementar aos resultados obtidos durante esta tese. Os experimentos foram realizados durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de Ghent, Bélgica. Através dos métodos desenvolvidos durante esta tese, foi possível propor uma alternativa eficiente de calibração para a determinação de bromo e iodo por LA-ICP-MS, conforme será apresentado nos itens posteriores.

#### 4.11.1 Avaliações preliminares

Inicialmente foi avaliada a maneira mais adequada para a introdução das amostras no sistema, evitando a introdução de partículas grandes no espectrômetro para minimizar picos intensos positivos de sinal e até mesmo a obstrução do tubo de transporte do aerossol. Algumas avaliações preliminares foram realizadas como: frequência de disparos por posição, diâmetro do *spot* e densidade de energia.

##### 4.11.1.1 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo

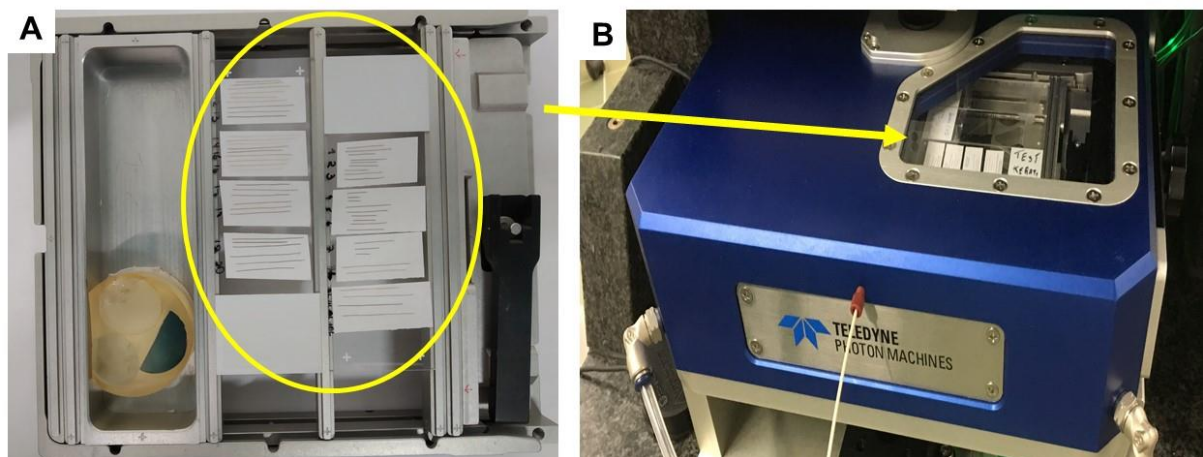
###### 4.11.1.1.1 Estratégia de calibração: preparação de fios de cabelo fortificados com halogênios

A estratégia de calibração utilizando fios de cabelo fortificados com halogênios foi desenvolvido com a amostra previamente analisada e foi selecionada por conter uma baixa concentração dos analitos. Cerca de 100 mg de cabelo foram imersos em solução padrão contendo 0,025; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 10,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup> de bromo e iodo e 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0 e 100 mg L<sup>-1</sup> de cloro por 24 h a temperatura ambiente. Enxofre não foi adicionado visto que foi avaliado como padrão interno. A mistura foi decantada e o cabelo foi lavado duas vezes com água ultrapura por 2 h e deixado em dessecador (POZEBON, SCHEFFLER, DRESSLER, 2017). O aspecto do cabelo utilizado para essa avaliação está apresentado na Figura 12.



**Figura 12.** Aspecto dos fios de cabelo fortificados com halogênios como estratégia de calibração para a determinação de bromo, cloro e iodo por LA-ICP-MS.

Uma porção desse cabelo foi analisada utilizando os métodos analíticos previamente otimizados e apresentados nesta tese. Bromo e iodo foram determinados por ICP-MS e cloro por IC-CD após a digestão do cabelo por MIC. Uma outra porção foi fixada em paralelo em fita adesiva dupla face (cerca de 2 cm de fio de cabelo considerando 3 fios para cada padrão), depositada em lâminas de microscópio de vidro e introduzida na câmara de ablação, conforme apresentado na Figura 13.



**Figura 13.** A) fios de cabelo fixados em fita adesiva dupla face em lâminas de microscópio B) introduzidos na câmara de ablação.

#### 4.11.1.1.2 Estratégia de calibração: preparação de gotas de queratina fortificadas com halogênios

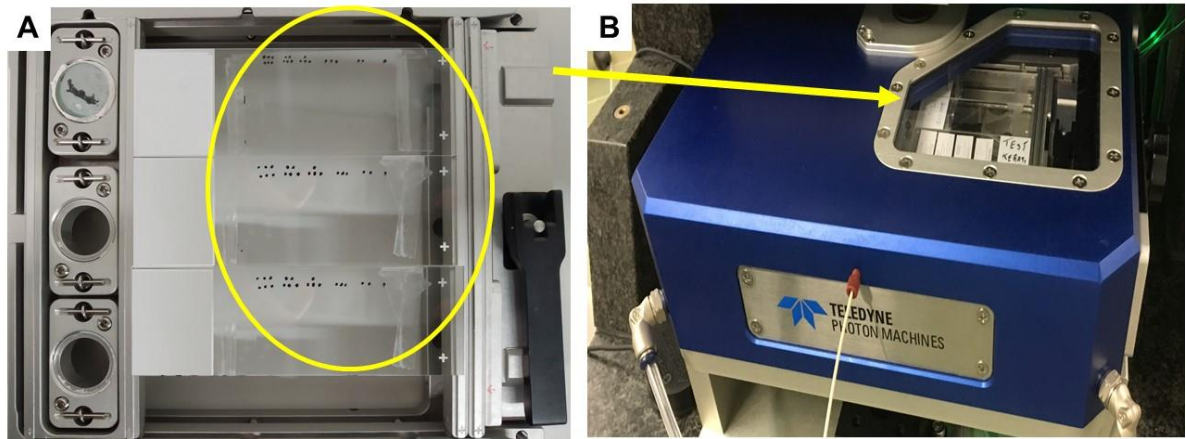
Para a extração da queratina, cerca de 10 g de cabelo homogeneizado, conforme aspecto apresentados na Figura 7 A, foram misturados com 180 mL de ureia

7 mol L<sup>-1</sup>, 6 g de dodecilsulfato de sódio e 15 mL de 2-mercaptoetanol e agitados a 50 °C por 12 h, com pH mantido a 9,0. O filtrado foi dialisado contra 3,5 L de solução a 0,08% de 2-mercaptoetanol (CHEAJESADAGUL, *et al.*, 2011), conforme Figura 14.



**Figura 14.** Filtrado de queratina extraída do cabelo sendo dialisado.

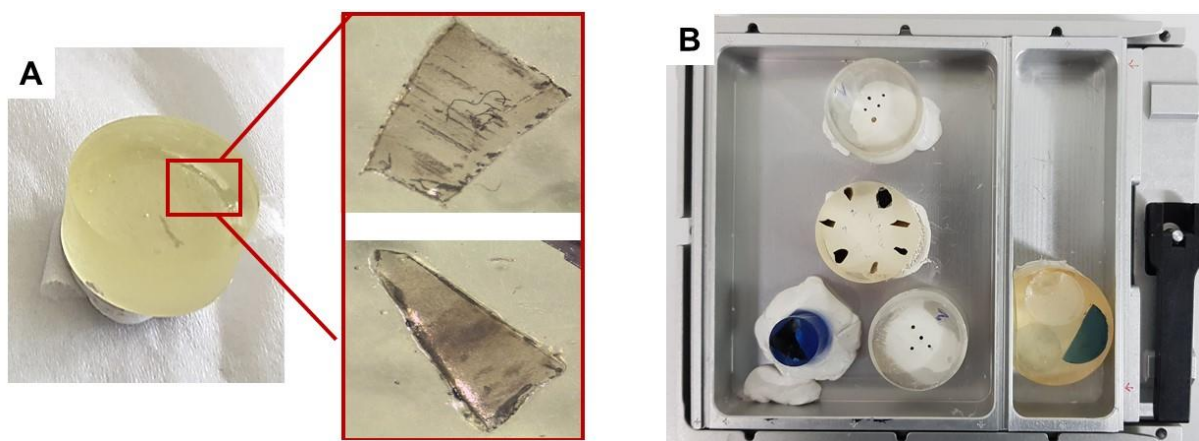
Cinco padrões foram preparados com a queratina extraída adicionando uma concentração final de 1,0, 2,5, 5,0, 10 e 25 µg g<sup>-1</sup> de bromo e iodo e 250, 500, 750, 1000 e 2500 µg g<sup>-1</sup> de cloro. Glicerina foi utilizada para melhorar a flexibilidade da queratina, imitando a matriz do cabelo natural. A solução final foi misturada em um vórtex a 4000 rpm por 10 min. Cerca de 50 µg dessa solução, pesadas em microbalança, foram pipetados em vidro de borossilicato e colocados no dessecador. Os vidros contendo as gotas de queratina fortificadas com halogênios, apresentados na Figura 15, foram fixados em lâminas de microscópio e introduzidos na câmara de ablação. Na Tabela 5 são apresentadas as condições operacionais para a determinação dos analitos por LA-ICP-MS. As configurações foram ajustadas diariamente pela intensidade de sinal (<sup>7</sup>Li<sup>+</sup>, <sup>115</sup>In<sup>+</sup> and <sup>238</sup>U<sup>+</sup>), baixa formação de óxido (<sup>238</sup>U<sup>16</sup>O<sup>+</sup>/<sup>238</sup>U<sup>+</sup> < 1%) e baixo fracionamento elementar induzido por *laser* (<sup>238</sup>U<sup>+</sup>/<sup>232</sup>Th<sup>+</sup> ≈ 1) utilizando o CRM NIST 612 de vidro.



**Figura 15.** A) gotas de queratina em vidros fixados em lâminas de microscópio B) introduzidas na câmara de ablação.

#### 4.11.1.2 Determinação qualitativa de bromo, cloro, iodo e enxofre em unha

As unhas foram introduzidas diretamente na câmara de ablação embebidas em resina epóxi, conforme apresentado na Figura 16. Uma amostra foi selecionada aleatoriamente e analisada utilizando as mesmas condições estabelecidas para a análise do cabelo.



**Figura 16.** A) unhas embebidas em resina epóxi B) inseridas na câmara de ablação.

**Tabela 5.** Parâmetros na determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS.

Parâmetro	Condição		
	Cabelo e unha	Gota de queratina	Perfil de profundidade
<b>ICP-MS</b>			
Potência do gerador de RF, W	1500	1500	1500
Vazão principal argônio, L min <sup>-1</sup>	15	15	15
Vazão argônio nebulizador, L min <sup>-1</sup>	1,05	1,03	1,05
Profundidade da amostra, mm	5,8	5,5	5,8
Isótopos, m/z	<sup>34</sup> S, <sup>79</sup> Br, <sup>127</sup> I, <sup>35</sup> Cl	<sup>34</sup> S, <sup>79</sup> Br, <sup>127</sup> I, <sup>35</sup> Cl	<sup>34</sup> S, <sup>79</sup> Br, <sup>127</sup> I, <sup>35</sup> Cl
Modo de aquisição dos dados	TRA - <i>time resolved</i>	TRA - <i>time resolved</i>	TRA - <i>time resolved</i>
Tempo de permanência por isótopo, ms	0,005, 0,044, 0,044	0,005, 0,038, 0,038, 0,011	0,005, um elemento/análise
Período de amostragem (tempo total de aquisição/pixel), s	0,100	0,100	0,005
<b>LA</b>			
Taxa de repetição, Hz	100	100	1
Número de disparos por posição	40	10	40 a 200
Diâmetro do <i>spot</i> , µm (forma)	35 (quadrado)	10 (quadrado)	10 (quadrado)
Densidade de energia, J cm <sup>-2</sup>	1,52	1,52	1,52
Velocidade de translação, µm s <sup>-1</sup>	87,5	100	87,5
Modo de escaneamento	Linha	Pontual	Área

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados para as análises descritas no capítulo 3 (Materiais e métodos). Inicialmente, serão apresentados os estudos sistemáticos realizados para a obtenção de condições instrumentais adequadas para a determinação de halogênios e enxofre. Posteriormente, serão apresentados os resultados para as otimizações dos métodos visando à posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha. Por fim, serão apresentadas algumas avaliações realizadas para a determinação e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS.*

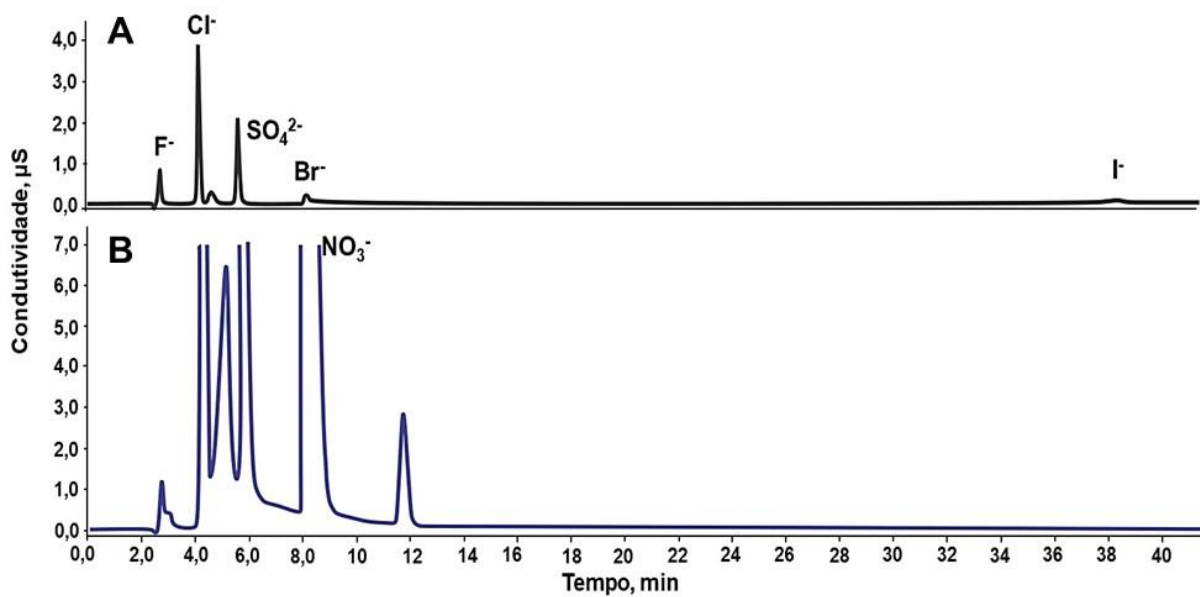
## 5.1 Avaliação da adequabilidade das técnicas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha

### 5.1.1 Cromatografia de íons com detecção condutimétrica acoplada à espectrometria de massas

A determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha por IC-CD-MS foi avaliada tendo em vista que não havia relatos na literatura sobre a utilização dessa técnica para esta finalidade. A concentração total de bromo, cloro, flúor, iodo e enxofre foi determinada como  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{I}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , respectivamente. Os resultados foram comparados com outras técnicas de determinação para avaliar possíveis erros durante a quantificação. Cloro, flúor e enxofre foram separados por IC e determinados por condutividade (IC-CD), enquanto bromo e iodo foram separados por IC e determinados por MS (IC-MS), mas em uma única corrida cromatográfica (IC-CD-MS). As condições foram otimizadas considerando as características das amostras de cabelo e unha.

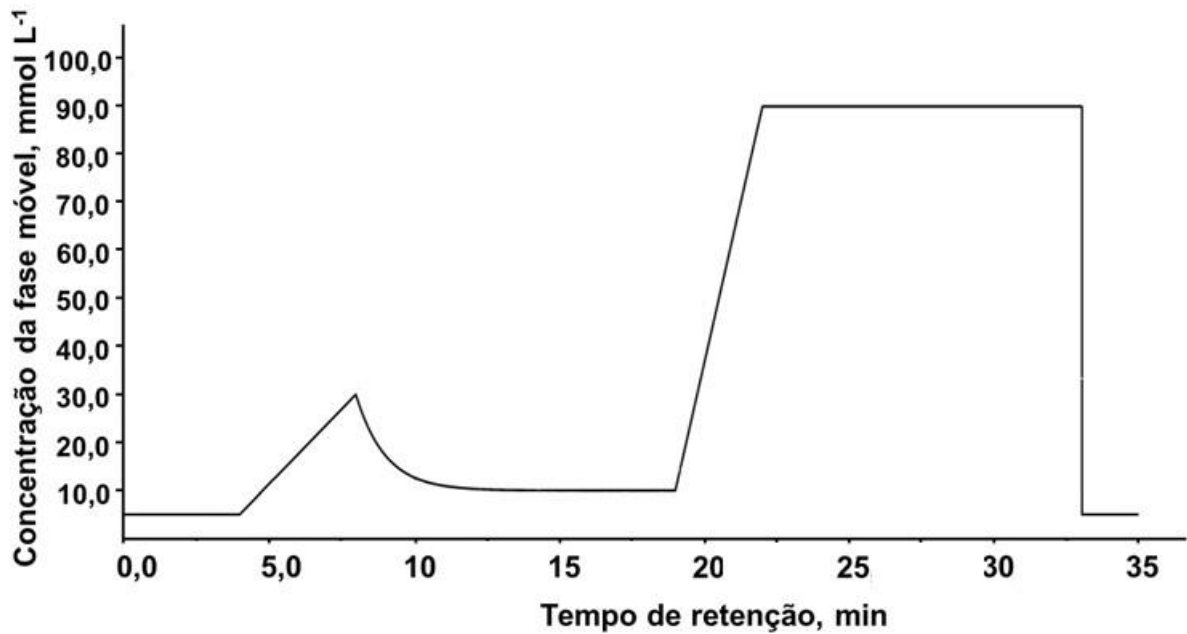
O eluente inicialmente avaliado foi  $\text{KOH}$   $30 \text{ mmol L}^{-1}$ , no modo isocrático de eluição, conforme recomendado pelo fabricante (DIONEX, 2020). Nessa condição, uma baixa resolução cromatográfica foi observada no tempo de retenção do  $\text{Cl}^-$  (4,0 min) e um elevado tempo de eluição foi constatado para o  $\text{I}^-$  (38 min). Além disso, quando uma amostra de cabelo ou unha foi digerida por MIC, interferências de compostos da matriz no tempo de retenção do  $\text{F}^-$  (3,0 min), uma baixa resolução cromatográfica nos tempos de retenção do  $\text{Cl}^-$  (4,0 min) e  $\text{SO}_4^{2-}$  (6,0 min) e a coeluição de  $\text{Br}^-$  (8,5 min) pelo íon  $\text{NO}_3^-$  (8,5 min) dificultaram a realização da análise. Na Figura 17 são apresentados os cromatogramas para uma solução padrão e para uma amostra de cabelo analisada por IC-CD após a digestão por MIC.



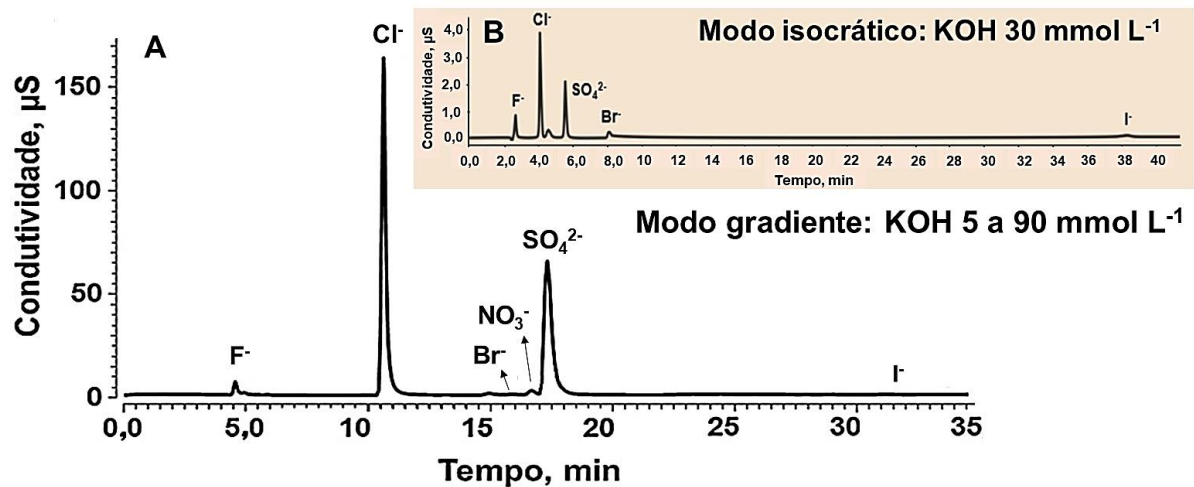


**Figura 17.** Cromatogramas obtidos para A) solução padrão multielementar:  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  para fluoreto;  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para cloreto;  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  para brometo;  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para sulfato e  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  para iodeto e B) solução obtida após a digestão de cabelo por MIC.

Diante dos inconvenientes mencionados, a eluição da fase móvel no modo gradiente de concentração foi otimizada. O gradiente de eluição com KOH foi: a)  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de 0 a 4 min (para minimizar interferências na determinação de F e melhorar a resolução do pico); b)  $5$  a  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de 4 a 8 min (para reduzir o tempo de análise); c)  $30$  a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de 8 a 13 min (para melhorar a separação de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ ); d)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de 13 a 19 min; e)  $10$  a  $90 \text{ mmol L}^{-1}$  de 19 a 22 min (para diminuir o tempo de retenção de  $\text{I}^-$ ); f)  $90 \text{ mmol L}^{-1}$  de 22 a 33 min; e g)  $90$  a  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de 33 a 35 min (para estabilizar da linha de base). É importante mencionar que a etapa c) foi necessária devido à elevada concentração de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , resultante da amostra e da solução de ignição utilizada na MIC. O gráfico com o perfil do gradiente de eluição otimizado está apresentado na Figura 18. Além disso, dois cromatogramas para a mesma solução padrão utilizando o modo isocrático e o modo gradiente de eluição são apresentados na Figura 19.



**Figura 18.** Perfil do gradiente de eluição otimizado para a determinação de halogênios e enxofre por IC-CD-MS.



**Figura 19.** Cromatogramas obtidos para uma solução padrão multielementar: 0,25 mg L<sup>-1</sup> para fluoreto; 10 mg L<sup>-1</sup> para cloreto; 0,15 mg L<sup>-1</sup> para brometo; 10 mg L<sup>-1</sup> para sulfato e 0,15 mg L<sup>-1</sup> para iodeto. A) modo gradiente de eluição e B) modo isocrático de eluição.

Assim como pode ser observado na Figura 19, utilizando o modo gradiente de eluição foi possível melhorar a separação cromatográfica para Cl<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, presentes em elevadas concentrações em cabelo e unha, e diminuir o tempo de retenção do I<sup>-</sup> (33 min). Entretanto, a detecção por condutividade não apresentou sensibilidade

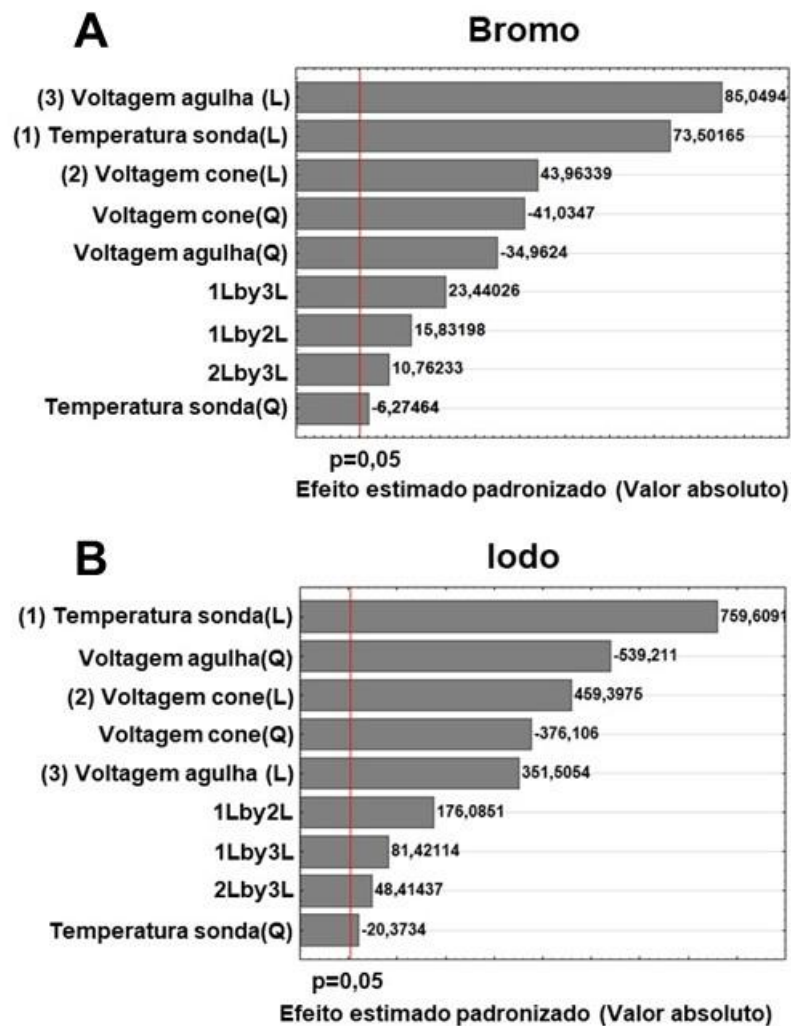
suficiente para a determinação de bromo e iodo em cabelo e unha. Assim, a separação dos analitos por IC e a detecção de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  por condutividade e  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$  por MS foram avaliadas, mas em uma única corrida cromatográfica (IC-CD-MS).

A voltagem do cone, voltagem da agulha e temperatura da sonda são parâmetros críticos na resposta por MS (WANG, SCHNUTE, 2009) e foram otimizados para a determinação de bromo e iodo utilizando planejamento delineamento composto central rotacional (DCCR) com triplicata no ponto central ( $\alpha = 1,68$ ), totalizando 17 experimentos ( $2^k + 2k + c$ ). Uma solução padrão contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  dos analitos foi introduzida diretamente no MS utilizando uma bomba auxiliar AXP-MS (Dionex/Thermo Fisher Scientific) com vazão de  $0,28 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $500 \text{ }\mu\text{L}$ . A pressão do gás do nebulizador foi ajustada em  $5,5 \text{ bar}$  (medida pelo regulador de gás dianteiro do MSQPlus), condição recomendada no MSQ (WANG, SCHNUTE, 2009). A intensidade do sinal nos tempos de retenção entre 12 e 22 min para  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$  entre 30 e 35 min para  $^{127}\text{I}$  foi monitorada. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores não codificados e codificados das variáveis independentes e respostas observadas para a intensidade de sinal para bromo e iodo na detecção por MS.

Ensaio	Temperatura de sonda, °C	Voltagem do cone, V	Voltagem da agulha, kV	Intensidade para bromo, cps	Intensidade para iodo, cps
1	-1 (360)	-1 (48)	-1 (1,8)	34.433	111.000
2	+1 (540)	-1 (48)	-1 (1,8)	84.667	294.333
3	-1 (360)	+1 (132)	-1 (1,8)	38.117	135.167
4	+1 (540)	+1 (132)	-1 (1,8)	146.167	546.333
5	-1 (360)	-1 (48)	+1 (4,2)	98.340	204.400
6	+1 (540)	-1 (48)	+1 (4,2)	239.667	497.500
7	-1 (360)	+1 (132)	+1 (4,2)	137.667	297.167
8	+1 (540)	+1 (132)	+1 (4,2)	359.667	801.667
9	-1,68 (300)	0 (90)	0 (3,0)	144.167	394.500
10	+1,68 (600)	0 (90)	0 (3,0)	333.500	1038.833
11	0 (450)	-1,68 (20)	0 (3,0)	65.683	207.500
12	0 (450)	+1,68 (160)	0 (3,0)	231.000	697.667
13	0 (450)	0 (90)	-1,68 (1,0)	333.00	203.167
14	0 (450)	0 (90)	+1,68 (5,0)	295.000	459.833
15	0 (450)	0 (90)	0 (3,0)	228.000	649.000
16	0 (450)	0 (90)	0 (3,0)	234.167	650.333
17	0 (450)	0 (90)	0 (3,0)	230.667	650.667

Conforme apresentado na Tabela 6 e no gráfico de pareto na Figura 20, todas as variáveis são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Os parâmetros lineares apresentaram efeito positivo nas respostas para todas as variáveis avaliadas, enquanto os parâmetros quadráticos apresentaram efeito negativo. Os pontos centrais mostraram pouca variação (coeficiente de variação -  $CV \leq 2\%$ ) para ambas as respostas (intensidade de sinal para bromo e iodo), indicando uma boa repetibilidade.



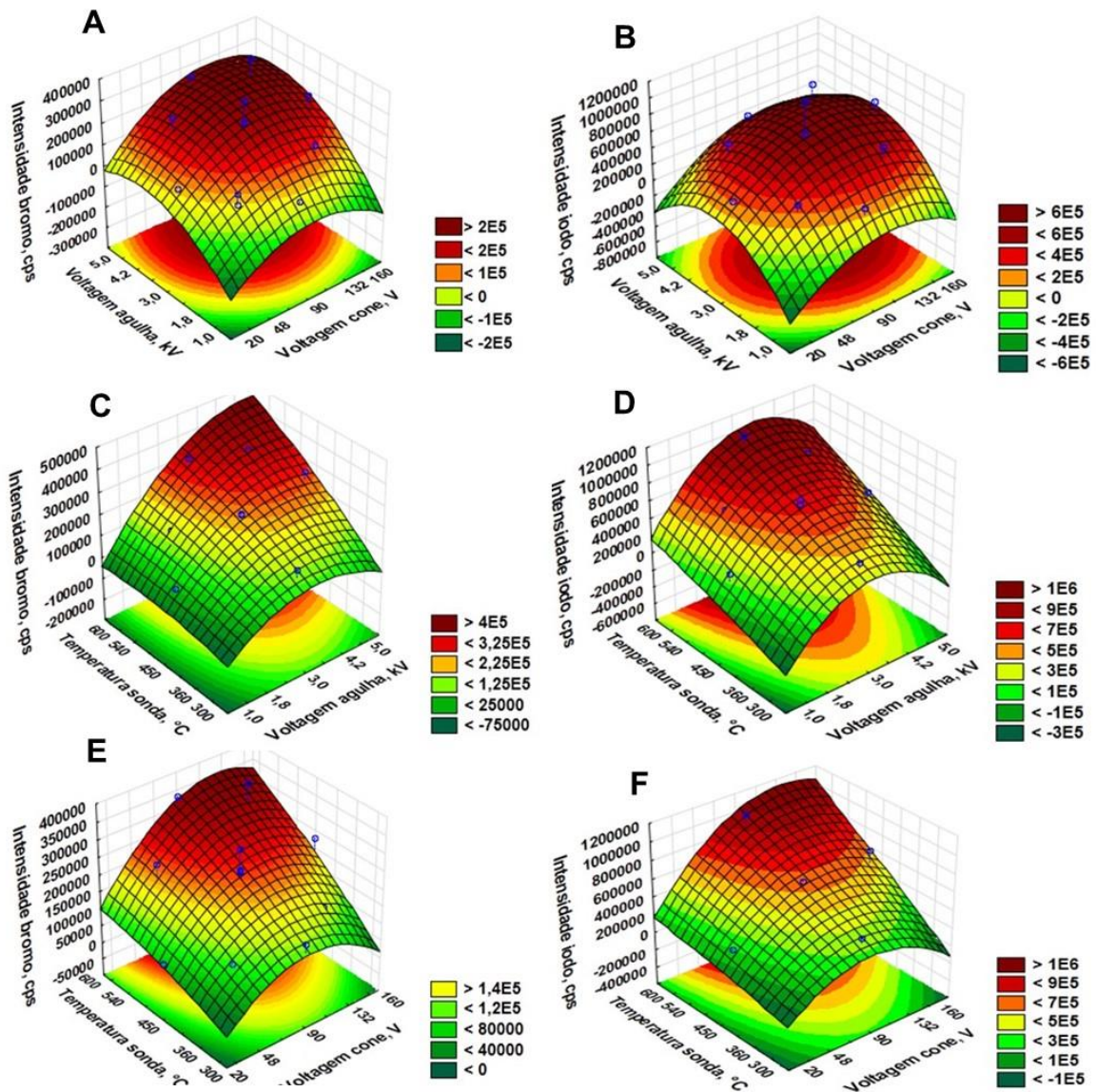
**Figura 20.** Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a intensidade de sinal para A) bromo e B) iodo na detecção por MS.

A adequação e a significância dos modelos gerados foram avaliadas através do teste estatístico de Fisher para ANOVA. Conforme pode ser observado na Tabela 7, a ANOVA do modelo sugere que ele é preditivo ( $F$  calculado  $>$   $F$  tabulado) e significativo ( $p < 0,05$ ). Os coeficientes de determinação foram 0,961 e 0,939 para bromo e iodo, respectivamente, indicando que 96% e 94% da variação da resposta da MS foram atribuídos aos fatores. Os resultados obtidos experimentalmente foram comparados com os obtidos com o modelo, e o coeficiente de correlação linear para ambos analitos foi superior a 0,85. Nesse sentido, os modelos para a intensidade do sinal para bromo e iodo por MS foram gerados.

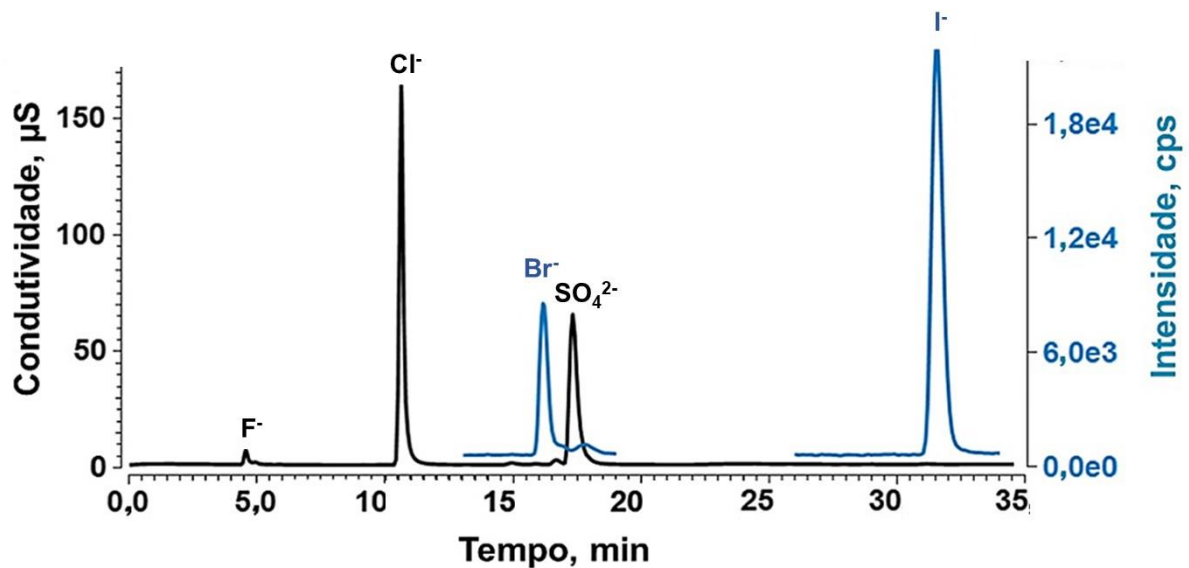
**Tabela 7.** ANOVA para a intensidade do sinal para bromo e iodo na detecção por MS.

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabelado (95%)</sub></b>
<b>Bromo</b>					
Regressão	1,76×10 <sup>11</sup>	9	1,96×10 <sup>10</sup>	19,71	3,68
Residual	6,95×10 <sup>09</sup>	7	9,93×10 <sup>8</sup>		
Total	1,83×10 <sup>11</sup>	16	-		
<b>Iodo</b>					
Regressão	1,07×10 <sup>12</sup>	9	1,20×10 <sup>11</sup>	12,34	3,68
Residual	6,79×10 <sup>10</sup>	7	9,69×10 <sup>9</sup>		
Total	1,14×10 <sup>12</sup>	16	-		

As superfícies de resposta obtidas para a intensidade do sinal para bromo e iodo por MS utilizando diferentes voltagens de cone (20 a 160 V), voltagens de agulha (1,0 a 5,0 kV) e temperaturas da sonda (300 a 600 °C) estão apresentadas na Figura 21. A intensidade máxima de sinal para bromo e iodo foi obtida com a máxima temperatura da sonda. Embora temperaturas mais elevadas possam fornecer maior intensidade de sinal, 600 °C foi selecionada tendo em vista as recomendações do fabricante visando minimizar danos ao espectrômetro. A voltagem do cone de 132 V e a voltagem da agulha de 4,2 kV corroboraram para maior intensidade do sinal para bromo e iodo e essas condições foram as selecionadas para avaliações posteriores. A separação por cromatografia para uma solução padrão contendo 0,25 mg L<sup>-1</sup> de F<sup>-</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e 0,15 mg L<sup>-1</sup> de Br<sup>-</sup> e I<sup>-</sup> é apresentada na Figura 22.



**Figura 21.** Superfícies de resposta para a intensidade do sinal para A, C e F) bromo e B, D e F) iodo utilizando diferentes voltagens de cone (20 a 160 V), voltagem de agulha (1,0 a 5,0 kV) e temperatura da sonda (300 a 600 °C) na detecção por MS, n = 5.



**Figura 22.** Cromatograma obtido para solução padrão multielementar:  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  para fluoreto;  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para cloreto;  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  para brometo;  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para sulfato; e  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  para iodeto.

Como mostrado na Figura 22, foi possível separar todas as espécies em uma única corrida cromatográfica de 35 min. Flúor, cloro e enxofre foram determinados como  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  utilizando a detecção por condutividade, enquanto bromo e iodo foram determinados como  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$  utilizando a detecção por MS. O uso da MS como detector adicional melhorou a detectabilidade da técnica para bromo e iodo, que geralmente estão presentes em baixas concentrações em cabelo e unha.

### 5.1.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

Apesar de menos frequente que a determinação de metais, a determinação de bromo e iodo por ICP-MS vem sendo amplamente realizada em diferentes matrizes (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016; TJABADI, MKETO, 2019; FLORES *et al.*, 2020) e as condições instrumentais foram baseadas em trabalhos presentes na literatura (RONDAN *et al.*, 2018; NOVO *et al.*, 2019a). A determinação de flúor por ICP-MS não foi avaliada nesta tese. Por outro lado, a determinação de cloro por ICP-MS foi investigada utilizando os isótopos  $^{37}\text{Cl}$  e  $^{35}\text{Cl}$ . O isótopo  $^{37}\text{Cl}$  foi bastante impactado por interferências de espécies poliatômicas, principalmente,  $^{1}\text{H}^{36}\text{Ar}$ , enquanto o isótopo  $^{35}\text{Cl}$  foi bastante afetado pela espécie  $^{34}\text{S}^{1}\text{H}$  proveniente da elevada concentração de enxofre no cabelo e na unha. Assim, a determinação de



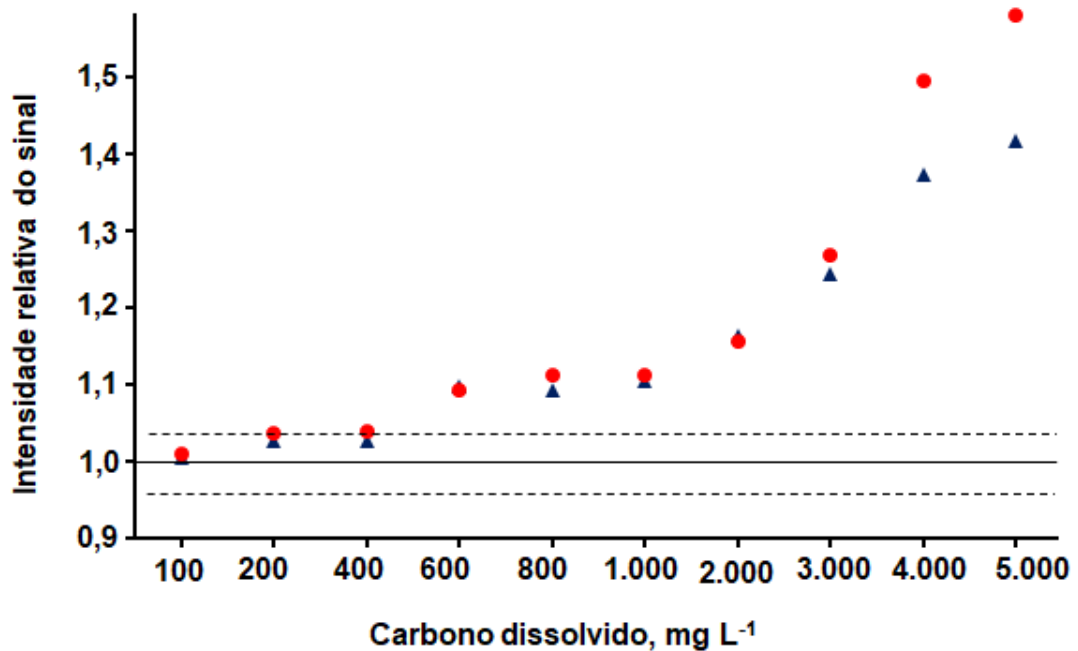
cloro em cabelo e unha por ICP-MS não foi considerada a mais adequada dentre as alternativas avaliadas nesta tese.

Apesar de bastante impactada por interferências poliatômicas, a determinação de enxofre por ICP-MS foi avaliada em cabelo e unha considerando a elevada concentração desse elemento nas amostras. Como esperado, interferências de espécies poliatômicas nos isótopos  $^{32}\text{S}$  ( $^{16}\text{O}_2$  e  $^{14}\text{N}^{18}\text{O}$ ) e  $^{34}\text{S}$  ( $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$  e  $^{17}\text{O}_2$ ) dificultaram a análise. Entretanto, curvas de calibração lineares foram obtidas para enxofre por ICP-MS a partir de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  (isótopo  $^{32}\text{S}$ ) e  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  (isótopo  $^{34}\text{S}$ ). Vale mencionar que a presença de interferências de espécies poliatômicas resultou em um CV entre as medidas de até 10%. Apesar das lineares curvas de calibração e a adequada faixa de concentração para a determinação de enxofre em cabelo e unha, a elevada intensidade de sinal para o branco (sinal de fundo) devido as interferências poliatômicas com oxigênio e nitrogênio podem danificar o detector do equipamento em uma análise de rotina. Assim, a determinação de enxofre em cabelo e unha por ICP-MS não foi considerada como a mais adequada dentre as alternativas avaliadas.

Apesar da adequada sensibilidade e ausência de interferências poliatômicas observadas para a determinação de bromo e iodo em cabelo e unha por ICP-MS, alguns estudos relataram problemas de efeito de memória (NOBREGA *et al.*, 1997; KNAPP *et al.*, 1998) e interferências de carbono durante a determinação destes analitos por ICP-MS (GRINDLAY *et al.*, 2013). O efeito de memória pode ser atribuído principalmente à formação de espécies voláteis (HX ou  $\text{X}_2$  em que X é bromo e iodo) na câmara de nebulização e no nebulizador (NOBREGA *et al.*, 1997; KNAPP *et al.*, 1998). Entretanto, com base em trabalhos presentes na literatura, esse inconveniente foi contornado através da análise das soluções em meio de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , assim como a lavagem do sistema de introdução de amostras (tubulação, câmara de pulverização, nebulizador) com a mesma solução (DEVOUGE-BOYER *et al.*, 2018; ROMARÍS–HORTAS *et al.*, 2010; WEIS *et al.*, 2019).

O efeito do carbono dissolvido é atribuído principalmente à elementos com elevada energia de ionização (GRINDLAY *et al.*, 2013). O aumento está relacionado à transferência de carga dos analitos com níveis eletrônicos e energia de ionização semelhante a espécies de carbono ionizadas ( $\text{C}^+$ ,  $\text{C}^{2+}$ ,  $\text{CO}^+$  ou  $\text{CO}_2^+$ ) no plasma de argônio (GRINDLAY *et al.*, 2013). Vale mencionar que o carbono pode se acumular na interface do equipamento, causando alterações na sensibilidade durante a análise por ICP-MS, exigindo uma manutenção de rotina (FLORES *et al.*, 2004). O efeito do

carbono na determinação de bromo e iodo por ICP-MS foi avaliado utilizando soluções padrão contendo  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de bromo e  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  de iodo em meio a concentrações conhecidas de carbono (variando de 100 a  $5.000 \text{ mg L}^{-1}$ ). A intensidade relativa do sinal foi definida como a relação da intensidade do sinal dos analitos em uma solução padrão contendo carbono e a intensidade do sinal dos analitos em uma solução padrão livre de carbono, mostrado na Figura 23.



**Figura 23.** Intensidade relativa do sinal para bromo ( $\blacktriangle$ ) e iodo ( $\bullet$ ) variando a concentração de carbono dissolvido de 100 a  $5.000 \text{ mg L}^{-1}$  em comparação com a solução correspondente livre de carbono dissolvido. A intensidade relativa do sinal entre as linhas tracejadas indica a ausência do efeito de matriz. Fonte de carbono: ácido cítrico. Instrumento: Q-ICP-MS Elan DRC II e suas condições descritas na Tabela 3,  $n = 5$ .

Como mostrado na Figura 23, a intensidade relativa do sinal para bromo e iodo foi afetada pela concentração de carbono dissolvido - todos os sinais foram corrigidos com o branco. O CV da repetibilidade do sinal foi de cerca de 2% ou 4% a intensidade relativa do sinal abaixo de 0,96 ou 0,90 indica supressão do sinal, enquanto a intensidade relativa do sinal maior de que 1,04 ou 1,10 indica aumento do sinal. Efeito de matriz pronunciado foi observado para solução contendo concentrações maiores que  $400 \text{ mg L}^{-1}$  ou  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono dissolvido. Vale mencionar que o carbono

dissolvido em outras formas proveniente da matriz deve ser sempre levado em consideração para avaliações futuras, pois o efeito de carbono pode estar também relacionado com esse fator. Nesse sentido, com base nestes resultados, a acidez e o carbono dissolvido na solução final foram considerados no desenvolvimento dos métodos visando à determinação de bromo e iodo em cabelo e unha por ICP-MS.

#### 5.1.3 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

Apesar de menos frequente que a determinação de metais, a determinação de cloro e enxofre por ICP-OES vem sendo amplamente realizada em diferentes matrizes (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016; TJABADI, MKETO, 2019), e as condições instrumentais foram baseadas em trabalhos presentes na literatura (PEREIRA *et al.*, 2009; MESKO *et al.*, 2020). Vale mencionar que a determinação de flúor por ICP-OES não foi avaliada. Por outro lado, a determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre por ICP-OES é principalmente impactada pelas linhas de emissão dos componentes do ar próximas as linhas de emissão mais sensíveis dos elementos (cloro: 134,72 nm, bromo: 154,07 nm, iodo: 178,28 nm e enxofre: 180,73 nm) (NÖLTE, 2003; MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016). Para minimizar essas interferências foi utilizado um espectrômetro com óptica selada e preenchida com argônio.

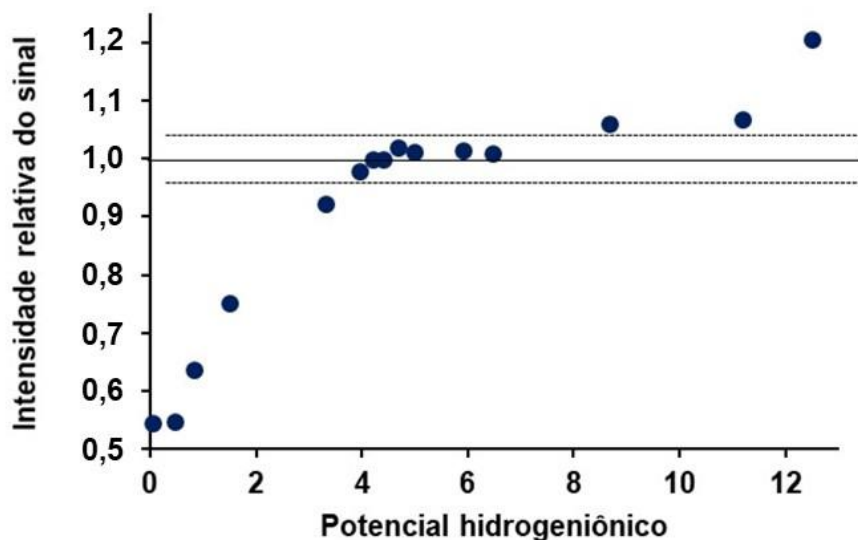
A determinação de bromo e iodo não foi realizada por ICP-OES tendo em vista a concentração desses elementos no cabelo e na unha (curva de calibração a partir de 0,25 mg L<sup>-1</sup> para bromo e 0,1 mg L<sup>-1</sup> para iodo). Por outro lado, a determinação de cloro e enxofre em cabelo e unha por ICP-OES foi considerada adequada tendo em vista, principalmente, a faixa de concentração desses elementos nas amostras. O ponto mais baixo da curva de calibração durante as análises por ICP-OES foi de 0,5 mg L<sup>-1</sup> para cloro e 0,025 mg L<sup>-1</sup> para enxofre. Através da comparação dos espectros de emissão dos analitos para o branco, amostras e solução padrão, foi possível observar a ausência de interferências espectrais nas linhas de emissão utilizadas durante os experimentos. A utilização de linhas de emissão abaixo de 200 nm e a faixa de concentração dos analitos nas amostras tornaram adequada a determinação de cloro e enxofre em cabelo e unha por ICP-OES.

#### 5.1.4 Potenciometria com eletrodo íon seletivo

A determinação de flúor por ISE vem sendo amplamente realizada em diferentes matrizes (DIMESKI, BADRICK, JOHN, 2010; MENDES *et al.*, 2020), e as

condições instrumentais foram baseadas em trabalhos presentes na literatura (DIMESKI, BADRICK, JOHN, 2010; REBACZ-MARON *et al.*, 2013; URBANOWICZ *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2020). Apesar do ajuste da força iônica com o reagente TISAB II, a determinação de flúor por ISE é principalmente impactada pela elevada acidez ou alcalinidade da solução (HANNA, 2020).

O efeito da acidez e da alcalinidade na determinação de flúor por ISE foi avaliado. Para isso, o sinal do analito para uma solução padrão contendo  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{F}^-$  em diferentes meios ácidos e básicos foi avaliado (pH variando 0 a 13). Os resultados estão apresentados na Figura 24. A intensidade relativa do sinal foi definida como a relação da voltagem do sinal do analito em uma solução padrão com pH ácido e básico e a voltagem do sinal do analito em uma solução padrão com pH neutro.



**Figura 24.** Intensidade relativa do sinal para flúor (●) variando o pH da solução de 0 a 13. A intensidade relativa do sinal entre as linhas tracejadas indica a ausência do efeito. Fonte de acidez e basicidade:  $\text{HNO}_3$  e  $\text{NaOH}$ . Instrumento: Potenciômetro HANNA HI 3221 pH/ORP/ISE com eletrodo combinado HI 4110 e condições descritas na Tabela 4,  $n = 5$ .

Como mostrado na Figura 24, a intensidade relativa do sinal para flúor foi afetada pela acidez ou basicidade da solução. O CV da repetibilidade do sinal foi de cerca de 2% ou 4% e a intensidade relativa do sinal abaixo de 0,96 ou 0,90 indica supressão do sinal, enquanto a intensidade relativa do sinal maior de que 1,04 ou 1,10 indica aumento do sinal. Um decréscimo no sinal para o analito foi observado em

soluções ácidas (pH menor que 4 ou 3,5) e um acréscimo no sinal para o analito em soluções básicas (pH maiores que 8 ou 11). Esse efeito pode estar relacionado com interferências físicas e químicas que alteram a interação do analito com a membrana do eletrodo. A acidez e a basicidade da solução final foram parâmetros considerados no desenvolvimento dos métodos visando à determinação de flúor por ISE.

A determinação de flúor por ISE é também impactada pela presença de carbono na solução a ser analisada (DIMESKI, BADRICK, JOHN, 2010; MENDES *et al.*, 2020). O carbono pode alterar a natureza física do ISE, causando depósitos na interface da membrana e alterando a sensibilidade do sensor durante as medições. Um filme pode ser gerado na interface da membrana, dificultando a interação do flúor presente na solução com as vagas no interior do eletrodo da membrana (DIMESKI, BADRICK, JOHN, 2010; MENDES *et al.*, 2020). Um estudo sistemático foi recentemente publicado na literatura avaliando o efeito do carbono dissolvido na determinação de flúor por ISE (MENDES *et al.*, 2020). Os autores demonstraram que uma concentração de carbono dissolvido a partir de 1000 mg L<sup>-1</sup> afeta de maneira significativa o sinal do analito quando comparado com uma solução livre de carbono. Com base nesse estudo, a concentração de carbono de até 1000 mg L<sup>-1</sup> foi considerada para a determinação de flúor por ISE.

## **5.2 Avaliação de métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha**

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados dos métodos avaliados para análise de cabelo e unha. Os métodos de preparo de amostras foram MIC, MAD e MAE e as técnicas de determinação IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE.

### **5.2.1 Preparo de amostras de cabelo e unha por combustão iniciada por micro-ondas**

As decomposições de cabelo e unha por MIC foram realizadas conforme descrito no item 4.5.1 (*Materiais e métodos*). A seguir serão apresentados e discutidos os resultados referentes aos ensaios realizados.

#### **5.2.1.1 Forma de introdução da amostra no sistema e tempo de ignição e combustão**

Inicialmente, foi avaliada a forma mais adequada para a introdução de cabelo e unha no sistema de MIC. A forma de invólucro foi selecionada como a mais adequada, uma vez que os *pellets* de cabelo e unha se mostraram instáveis durante

a manipulação e durante a etapa de pressurização do frasco. Além disso, o uso de invólucros traz maior segurança ao analista em virtude de não necessitar de prensas de elevada pressão e uma maior praticidade para a confecção quando comparado com os *pellets*. Os filmes de polietileno foram descontaminados com eficiência e não contribuíram para o aumento dos valores de branco.

O tempo de ignição e combustão foram determinados para avaliar, visualmente, o momento em que as amostras entram em ignição e o tempo que elas permanecem em combustão. O tempo de ignição não varia significativamente ( $p > 0,05$ ) quando utilizadas diferentes massas de cabelo e unha. Esse resultado era esperado, visto que o tempo de ignição está relacionado com a interação da radiação micro-ondas com a solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  responsável pela oxidação do papel filtro. Entretanto, como pode ser observado na Tabela 8, a duração da combustão foi proporcional ao aumento da massa de amostra. O tempo de ignição e combustão foram parâmetros importantes para a definição do programa de radiação micro-ondas (1400 W por 5 min e 0 W por 20 min). O tempo relativamente rápido para a ignição e combustão não necessitou a inclusão de uma etapa adicional no programa de aquecimento (entre a etapa de combustão e a etapa de refluxo) visando garantir a combustão completa das amostras. A etapa de refluxo foi utilizada para auxiliar na recuperação quantitativa dos elementos através da lavagem do sistema.

**Tabela 8.** Tempo de ignição e duração da combustão durante a digestão de cabelo e unha por MIC,  $n=3$ .

Amostra	Tempo de ignição (s)	Duração da combustão (s)		
		50 mg	100 mg	300 mg
Cabelo	$3 \pm 1$	$4 \pm 1$	$7 \pm 1$	$18 \pm 2$
Unha	$4 \pm 1$	$3 \pm 1$	$5 \pm 1$	-

Parâmetros não avaliados para 300 mg de unha.

#### 5.2.1.2 Otimização da massa de amostra e avaliação da pressão máxima do sistema de combustão

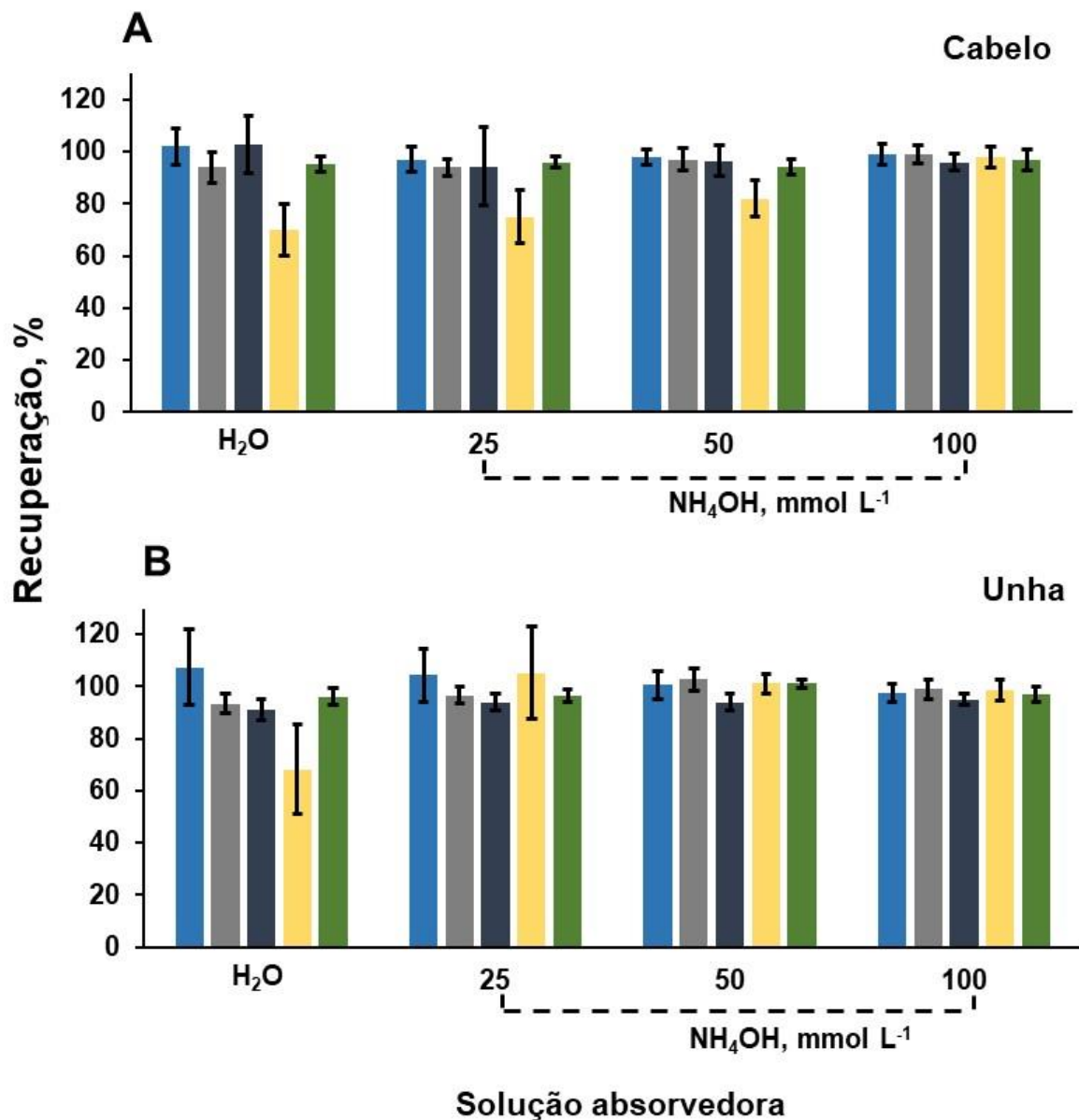
A massa máxima de cabelo e unha a ser decomposta por MIC foi um parâmetro avaliado para a obtenção de menores LOQs. A menor massa utilizada foi 30 mg de cabelo e unha, sendo acompanhado o comportamento da combustão, o aspecto da

solução final obtida após a combustão e a pressão máxima atingida pelo sistema. A combustão de 400 mg de cabelo e 200 mg de unha não foi considerada segura pois a chama gerada foi bastante intensa, podendo causar danos à tampa do frasco de digestão. Por outro lado, a combustão de até 300 mg de cabelo e 100 mg de unha mostrou-se segura (a pressão máxima atingida no sistema foi de cerca de 40% do limite de pressão operacional recomendada pelo fabricante de 80 bar). Assim, considerando o comportamento de combustão e a disponibilidade de amostra, 300 mg de cabelo e 100 mg de unha foram selecionados para estudos posteriores.

#### 5.2.1.3 Avaliação da solução absorvedora

Após as condições operacionais iniciais do sistema de combustão terem sido estabelecidas, a solução mais adequada para a absorção de halogênios e enxofre, liberados após a combustão de cabelo e unha, foi avaliada através de ensaios de recuperação. Vale mencionar que a solução absorvedora deve ser avaliada para cada elemento e amostra, considerando que a faixa de concentração dos elementos de interesse e dos compostos na matriz influenciam de maneira incontestável nas características da solução final e, conseqüentemente, na recuperação dos analitos. Inicialmente, 300 mg de cabelo e 100 mg de unha, utilizando as amostras homogêneas selecionadas para as otimizações, foram digeridas por MIC utilizando água ultrapura ou  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25, 50 e 100 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) como solução absorvedora e a técnica de determinação utilizada nesta avaliação foi a IC-CD-MS

Nos ensaios de recuperação, cerca de 50% da concentração dos analitos previamente detectada ou 2 vezes o valor equivalente ao LOQ foi adicionado previamente à etapa de preparo de amostras. Para absorver halogênios e enxofre após a combustão do cabelo, 20  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 10 mg  $\text{L}^{-1}$  de bromo, 3750 mg  $\text{L}^{-1}$  de cloro, 300 mg  $\text{L}^{-1}$  de flúor, 100 mg  $\text{L}^{-1}$  de iodo e 300 g  $\text{L}^{-1}$  de enxofre foi adicionado a 300 mg de amostra antes de fechar o invólucro. Para a combustão da unha, 20  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 25 mg  $\text{L}^{-1}$  de bromo, 8.000 mg  $\text{L}^{-1}$  de cloro, 200 mg  $\text{L}^{-1}$  de flúor, 8 mg  $\text{L}^{-1}$  de iodo e 50 g  $\text{L}^{-1}$  de enxofre foi adicionado a 100 mg de amostra antes de fechar o invólucro. Na Figura 25 são apresentados os resultados obtidos após os ensaios de recuperação para a absorção de halogênios e enxofre após a combustão do cabelo e unha por MIC.



**Figura 25.** Recuperações obtidas através de ensaios de recuperação para (■) bromo, (■) cloro, (■) flúor, (■) iodo e (■) enxofre em A) cabelo e B) unha após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras. Determinação por IC-CD-MS ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $n=3$ ).

Como mostrado na Figura 25 A, a recuperação de bromo, cloro, flúor e enxofre após a combustão do cabelo foi entre 94 e 103% para todas as soluções avaliadas. Contudo, uma recuperação inferior para iodo foi obtida utilizando água, 25 mmol L<sup>-1</sup> ou 50 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH (entre 70 e 82%) como solução absorvedora. É importante mencionar que apesar de ter sido obtida uma recuperação adequada para flúor utilizando água (103%) e 25 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH (94%) como solução absorvedora,



um CV de até 16% foi observado. A recuperação para iodo utilizando água, 25 mmol L<sup>-1</sup> ou 50 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora após a combustão do cabelo pode estar associada à instabilidade de algumas espécies de iodo em soluções com caráter ácido - o pH dos digeridos finais variou de 2 para 4 (FLORES, 2014; FLORES *et al.*, 2016). Por outro lado, a recuperação de iodo utilizando NH<sub>4</sub>OH 100 mmol L<sup>-1</sup> como solução absorvedora foi de 98 ± 4% e o pH do digerido final ficou em torno de 7. A solução de NH<sub>4</sub>OH 100 mmol L<sup>-1</sup> foi selecionada para avaliações subsequentes.

Como mostrado na Figura 25 B, a recuperação de bromo, cloro, flúor e enxofre após a combustão da unha foi entre 91 e 107% para todas as soluções avaliadas. Contudo, a recuperação para iodo (68%) foi inferior utilizando água com solução absorvedora. Apesar de ter sido obtida uma recuperação adequada para bromo utilizando água (107%) e 25 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH (104%) como solução absorvedora, um CV para bromo e iodo de até 14% foi observado. A baixa recuperação para iodo e o elevado CV para bromo e iodo utilizando água e 25 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora após a combustão da unha podem estar relacionadas à instabilidade de algumas espécies de bromo e iodo em soluções com caráter ácido (FLORES, 2014; FLORES *et al.*, 2016) - o pH dos digeridos variou de 2 para 4 utilizando água e 25 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH, enquanto que variou de 7 para 8 utilizando 50 mmol L<sup>-1</sup> e 100 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH. Assim, a solução NH<sub>4</sub>OH 50 mmol L<sup>-1</sup> foi selecionada para avaliações subsequentes.

#### 5.2.1.4 Brancos analíticos e limites de quantificação

Uma das dificuldades relacionadas a determinação de halogênios e enxofre em baixa concentração é os valores dos brancos. Nesse sentido, vale mencionar que algumas características da MIC, como a utilização de materiais de elevada pureza e de soluções alcalinas diluídas durante o preparo da amostra, possibilitou a obtenção de baixos valores de branco: 0,6 µg L<sup>-1</sup> para bromo, 0,1 mg L<sup>-1</sup> para cloro, 0,1 mg L<sup>-1</sup> para enxofre, < 0,025 mg L<sup>-1</sup> para flúor e 0,2 µg L<sup>-1</sup> para iodo. Isso torna-se uma vantagem extremamente importante para a obtenção de LOQ adequado para a análise de amostras com pouca disponibilidade, como é o caso de cabelo e unha.

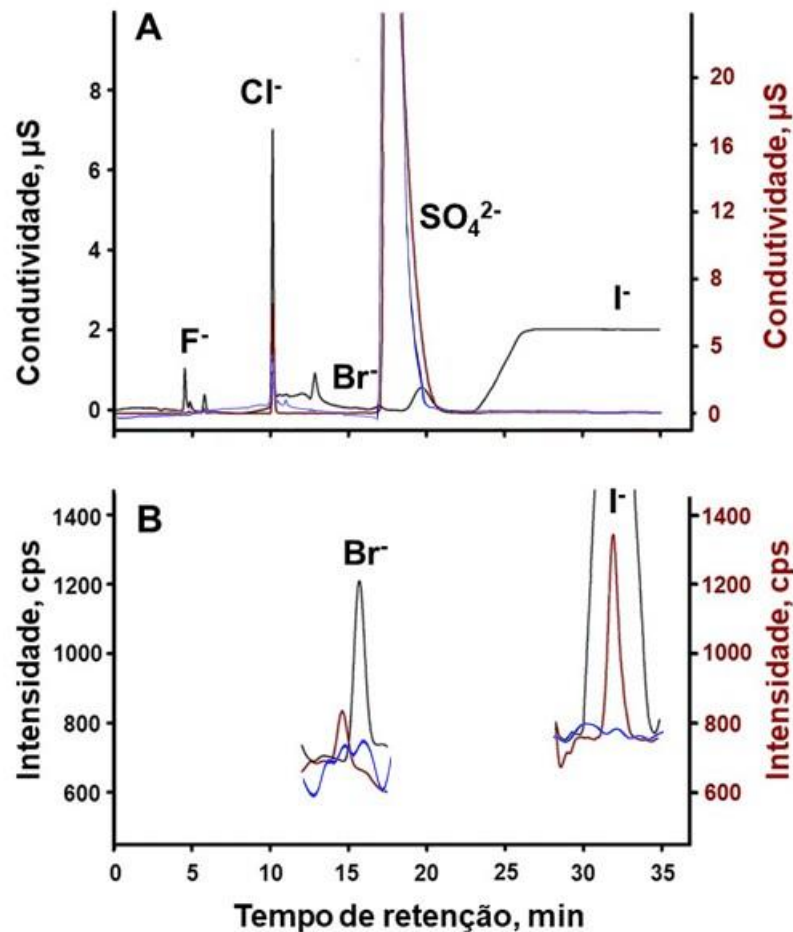
A solução obtida apresentou um aspecto límpido sem a presença de material em suspensão e a concentração de carbono nessas soluções foi inferior a 5 mg L<sup>-1</sup>. Este valor pode ser explicado pela elevada temperatura (superior a 1350 °C) atingida durante a combustão (CARRENO *et al.*, 2018). O baixo valor de carbono dissolvido e

a ausência de material particulado minimizam interferências de matriz durante a etapa de determinação e possíveis danos aos equipamentos. O uso de uma solução alcalina diluída para absorver os elementos evita os inconvenientes da acidez residual na determinação dos elementos por IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE. Os LOQs para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha após a MIC utilizando diferentes técnicas de determinação estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Limites de quantificação para halogênios e enxofre em cabelo e unha utilizando diferentes técnicas de determinação após o preparo por MIC.

Técnica	Limite de quantificação, $\mu\text{g g}^{-1}$									
	Br	Cl	F	I	S	Br	Cl	F	I	S
	<b>Cabelo – 300 mg</b>					<b>Unha – 100 mg</b>				
IC-CD-MS	0,7	13	8	0,3	210	3,0	40	20	1,0	800
ICP-MS	0,06	40	-	0,02	8	0,1	120	-	0,03	25
ICP-OES	20	40	-	8	8	60	120	-	25	25
ISE	-	-	25	-	-	-	-	80	-	-

Na Figura 26, são apresentados os cromatogramas obtidos para uma solução padrão multielementar e para a análise de cabelo e unha digeridos por MIC. Fatores de diluição de 4 e 20 vezes foram realizados para minimizar as interferências dos compostos da matriz e reagentes, especialmente durante a determinação de flúor e enxofre, respectivamente por IC-CD. Além disso, a utilização da MS acoplada à IC-CD como um detector adicional aumentou a detectabilidade da técnica para bromo e iodo, geralmente presentes em baixas concentrações nas amostras de cabelo e unha. O tempo de retenção correspondente a  $\text{I}^-$  foi bastante semelhante para a solução padrão e para as amostras analisadas. No entanto, um deslocamento para o sinal de  $\text{Br}^-$  foi observado, o que provavelmente está relacionado à constituintes da matriz que modificam a fase estacionária ou interação com outras espécies aniônicas (por exemplo,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ ) em concentrações elevadas. Cabe ressaltar que o sinal para o  $\text{Br}^-$  foi confirmado na amostra através de ensaios de recuperação na etapa de determinação e esse fato não afetou a determinação de bromo por IC-MS.



**Figura 26.** Cromatogramas obtidos para (—) solução padrão, (—) cabelo e (—) unha por MIC. As amostras foram diluídas A) 20 vezes na detecção por condutividade e B) 4 vezes na detecção por MS. Concentração dos analitos na solução padrão:  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  para fluoreto,  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para cloreto,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  para brometo,  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para sulfato e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  para iodeto.

A baixa concentração de carbono dissolvido, a ausência de material particulado em suspensão e o uso de solução alcalina diluída para absorção dos analitos produzem uma solução final totalmente compatível com a análise por ICP-MS, ICP-OES e ISE, praticamente livre de interferências. O aspecto da solução obtida após o preparo das amostras de cabelo e unha serão apresentados no item 5.2.2 (*Resultados e discussão*, Figuras 27 D e 28 D, respectivamente). O método de digestão de cabelo e unha por MIC possibilita a utilização de várias técnicas de determinação e, a melhor alternativa, sempre irá depender da faixa de concentração e da disponibilidade de amostra. O LOQ para os analitos utilizando todas as técnicas de determinação

avaliadas neste trabalho após a digestão de cabelo e unha por MIC está apresentado na Tabela 9.

#### 5.2.1.5 Avaliação da exatidão e da precisão

A avaliação da exatidão foi realizada inicialmente por ensaios de recuperação, conforme apresentado no item 4.6 (*Materiais e métodos*), considerando as condições do método otimizado: 300 mg de amostra na forma de invólucros e 100 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora para cabelo e 100 mg de amostra na forma de invólucros e 50 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora para unha. Além do primeiro ensaio de recuperação utilizado para a avaliação da solução absorvedora, foi realizado um segundo ensaio de recuperação utilizando as condições selecionadas adicionando 100% da concentração previamente detectada ou 3 vezes o valor equivalente ao LOQ. Para o cabelo, foram adicionados 40 µL de uma solução contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de bromo, 3750 mg L<sup>-1</sup> de cloro, 300 mg L<sup>-1</sup> de flúor, 100 mg L<sup>-1</sup> de iodo e 300 g L<sup>-1</sup> de enxofre em 300 mg de amostra antes de fechar o invólucro. Para a unha, foram adicionados 40 µL de uma solução contendo 25 mg L<sup>-1</sup> de bromo, 8.000 mg L<sup>-1</sup> de cloro, 200 mg L<sup>-1</sup> de flúor, 8 mg L<sup>-1</sup> de iodo e 50 g L<sup>-1</sup> de enxofre em 100 mg de amostra antes de fechar o invólucro. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

**Tabela 10.** Concentração antes e após a adição de halogênios e enxofre em cabelo ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

Elemento	Valor adicionado	Valor Obtido	Recuperação, %	Valor Obtido	Recuperação, %
Cabelo		IC-CD-MS		ICP-MS, ICP-OES ou ISE	
<b>Br</b>	0	1,30 ± 0,05		1,32 ± 0,07 <sup>a</sup>	
	0,667	1,96 ± 0,08	99 ± 4	1,98 ± 0,08 <sup>a</sup>	99 ± 4
	1,33	2,59 ± 0,14	97 ± 5	2,59 ± 0,08 <sup>a</sup>	95 ± 3
<b>Cl</b>	0	488 ± 31		490 ± 20 <sup>b</sup>	
	250	735 ± 23	99 ± 3	729 ± 21 <sup>b</sup>	95 ± 4
	500	990 ± 57	100 ± 5	979 ± 68 <sup>b</sup>	98 ± 7
<b>F</b>	0	< 8 <sup>¥c</sup>		< 25 <sup>¥c</sup>	
	20	19,2 ± 0,6	96 ± 3	< 25 <sup>¥c</sup>	
	40	38,0 ± 2,1	95 ± 5	42,3 ± 3,9 <sup>c</sup>	106 ± 10
<b>I</b>	0	1,20 ± 0,05		1,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	
	0,667	1,85 ± 0,08	98 ± 4	1,87 ± 0,08 <sup>a</sup>	98 ± 4
	1,33	2,49 ± 0,21	97 ± 8	2,58 ± 0,15 <sup>a</sup>	102 ± 5
<b>S</b>	0	47.200 ± 2.600		48.110 ± 2.023 <sup>b</sup>	
	20.000	66.000 ± 2.540	98 ± 3	67.120 ± 2.490 <sup>b</sup>	95 ± 4
	40.000	86.600 ± 3.990	98 ± 5	86.216 ± 4.612 <sup>b</sup>	98 ± 5

<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>ICP-OES, <sup>c</sup>ISE e <sup>¥</sup>LOQ.

**Tabela 11.** Concentração antes e após a adição de halogênios e enxofre em unha ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

Elemento	Valor adicionado	Valor Obtido	Recuperação, %	Valor Obtido	Recuperação, %
Unha		IC-CD-MS		ICP-MS, ICP-OES ou ISE	
<b>Br</b>	0	10,1 ± 0,5		10,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	
	5	15,3 ± 0,5	106 ± 3	15,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	96 ± 5
	10	20,1 ± 0,5	101 ± 3	20,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	102 ± 5
<b>Cl</b>	0	3.080 ± 225		3.012 ± 205 <sup>b</sup>	
	1.600	4.655 ± 180	103 ± 4	4.512 ± 112 <sup>b</sup>	94 ± 5
	3.200	6.120 ± 180	97 ± 3	6.098 ± 231 <sup>b</sup>	96 ± 4
<b>F</b>	0	< 20 <sup>¥c</sup>		< 80 <sup>¥c</sup>	
	40	37,6 ± 1,2	94 ± 3	< 80 <sup>¥c</sup>	
	80	84,0 ± 3,6	105 ± 5	82,4 ± 2,1 <sup>c</sup>	103 ± 2
<b>I</b>	0	2,68 ± 0,12		2,73 ± 0,10 <sup>a</sup>	
	1,6	4,31 ± 0,14	102 ± 3	4,30 ± 0,20 <sup>a</sup>	98 ± 4
	3,2	6,01 ± 0,35	104 ± 6	5,80 ± 0,20 <sup>a</sup>	95 ± 4
<b>S</b>	0	23.200 ± 1.200		23.141 ± 1.089 <sup>b</sup>	
	10.000	33.100 ± 390	101 ± 1	32.981 ± 1.122 <sup>b</sup>	98 ± 3
	20.000	44.000 ± 1.200	105 ± 3	43.781 ± 1.897 <sup>b</sup>	103 ± 4

<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>ICP-OES, <sup>c</sup>ISE e <sup>¥</sup>LOQ.

Como pode ser observado nas Tabelas 10 e 11, a recuperação para os analitos variou de 94 a 106% quando realizados ensaios de recuperação em diferentes níveis de concentração para as amostras de cabelo e unha digeridas por MIC com as condições selecionadas e analisadas por diferentes técnicas de determinação. A exatidão dos métodos propostos para a análise do cabelo também foi avaliada através da análise de um CRM de cabelo humano. Como pode ser observado na Tabela 12, a concentração de halogênios e enxofre obtida pelos métodos propostos não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) da concentração descrita no certificado do CRM (concordando de 93 a 103%). O CV para repetibilidade e precisão intermediária para a análise do cabelo foi sempre inferior a 10%.

**Tabela 12.** Concentração de halogênios e enxofre obtida para o CRM NCS DC73347a de cabelo ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

Amostra	Elem.	Valor de referência	Valor Obtido IC-CD-MS	Valor Obtido ICP-MS, ICP-OES ou ISE
CRM NCS	Br	1,1	$1,04 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,06^a$
DC73347a	Cl	180	$176 \pm 4$	$186 \pm 8^b$
	F	11,0	$11,0 \pm 0,3$	$< 25^{\text{c}}$
	I	$0,8 \pm 0,2$	$0,78 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,04^a$
	S	$41.900 \pm 1.100$	$40.200 \pm 800$	$39.900 \pm 1.200^b$

<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>ICP-OES, <sup>c</sup>ISE e <sup>¥</sup>LOQ.

A exatidão dos métodos propostos para a análise da unha também foi avaliada através de ensaios de recuperação na forma sólida. Para isso, 25 mg do CRM NIST 8435 (leite em pó integral) foi misturado a 75 mg de unha humana e digeridos por MIC utilizando as condições otimizadas e analisada por diferentes técnicas de determinação. Como pode ser observado na Tabela 13, a recuperação variou de 93 a 106% e o CV para repetibilidade foi sempre inferior a 5%. A concentração de flúor por ISE ficou abaixo do LOQ.

**Tabela 13.** Concentração antes e após a adição de halogênios e enxofre em unha com o CRM NIST 8435 ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

Elem.	Valor certificado ou informado	Valor adicionado	Valor Obtido	Recuperação, %	Valor Obtido	Recuperação, %
			IC-CD-MS		ICP-MS, ICP-OES ou ISE	
<b>Br</b>	20	0	10,1 ± 0,5		10,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	
		6,67	17,2 ± 0,9	106 ± 5	16,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	99 ± 5
<b>Cl</b>	8420	0	3.080 ± 225		3.020 ± 131 <sup>b</sup>	
		2.807	5.858 ± 260	99 ± 4	5.798 ± 260 <sup>b</sup>	99 ± 4
<b>F</b>	0,17	0	< 20 <sup>¥c</sup>		< 80 <sup>¥c</sup>	
		0,06	< 20 <sup>¥c</sup>	-	< 80 <sup>¥c</sup>	
<b>I</b>	2,3	0	2,68 ± 0,12		2,65 ± 0,11 <sup>a</sup>	
		0,77	3,39 ± 0,12	93 ± 4	3,41 ± 0,12 <sup>a</sup>	98 ± 5
<b>S</b>	2650	0	23.200 ± 1.200		23.050 ± 1.010 <sup>b</sup>	
		883	24.100 ± 501	102 ± 2	23.870 ± 501 <sup>b</sup>	98 ± 3

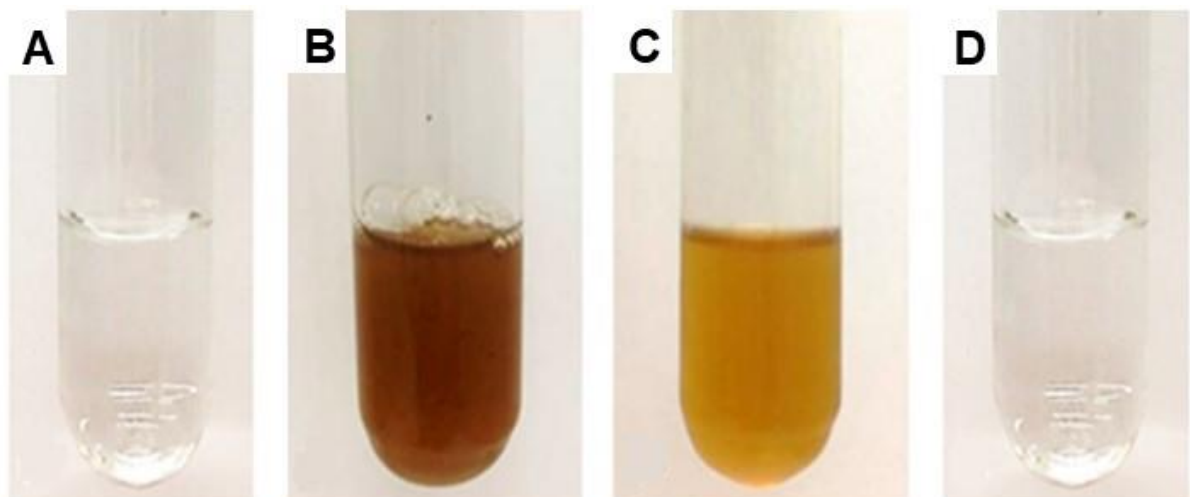
<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>ICP-OES, <sup>c</sup>ISE e <sup>¥</sup>LOQ.



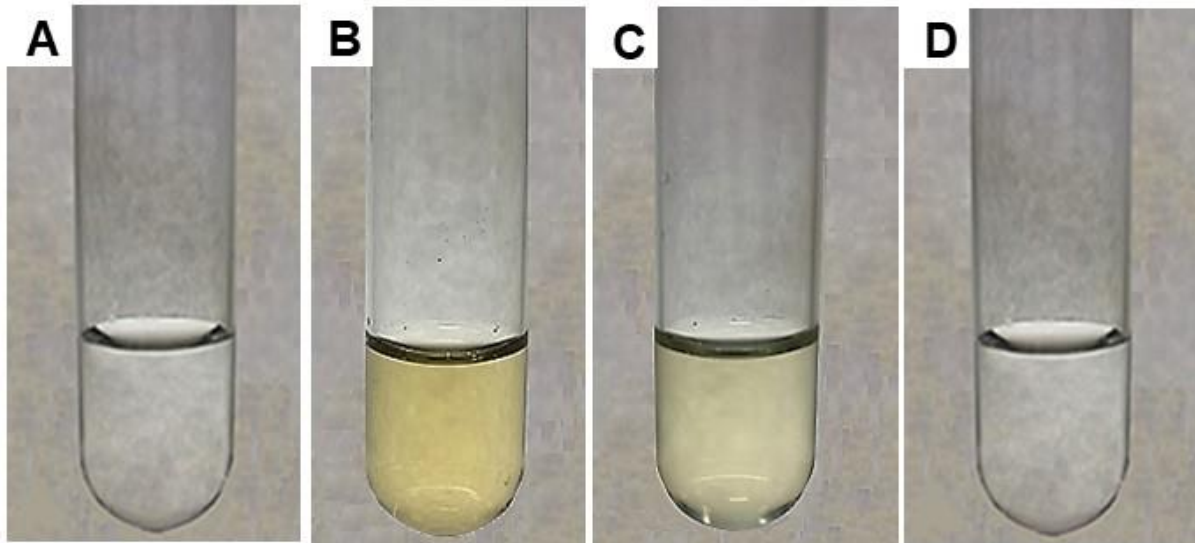
Diante desses resultados, foi possível observar que os métodos propostos se mostraram adequados para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha. Vale mencionar que a utilização de técnicas de determinação sensíveis e sistemas fechados de digestão para o preparo de amostras de cabelo e unha são características fundamentais para a determinação de halogênios e enxofre. A obtenção de uma solução compatível com diferentes técnicas de determinação e a obtenção de baixos valores de branco, torna a MIC uma ferramenta poderosa para o preparo de amostras de cabelo e unha visando à posterior determinação de halogênios e enxofre.

#### 5.2.2 Digestão assistida por radiação micro-ondas e extração assistida por radiação micro-ondas para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha por diferentes técnicas de determinação

Os métodos baseados na MAD e MAE foram investigados para avaliar o desempenho em comparação à MIC. Nesse sentido, a massa de amostra foi a mesma preparada por MIC e as soluções digestoras e extratoras selecionadas foram baseadas em trabalhos presentes na literatura (KNAPP *et al.*, 1998; NOBREGA *et al.*, 2006; SKALNY *et al.*, 2017). O aspecto das soluções obtidas após os métodos de preparo de amostras é mostrado nas Figuras 27 e 28.



**Figura 27.** Aspecto da solução após a preparação da amostra de cabelo por MAD A) utilizando  $14,4 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$ , por MAE utilizando B)  $110 \text{ mmol L}^{-1}$  de TMAH e C)  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e por D) MIC utilizando  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  como solução absorvedora.



**Figura 28.** Aspecto da solução após a preparação da amostra de unha por MAD A) utilizando  $14,4 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$ , por MAE utilizando B)  $110 \text{ mmol L}^{-1}$  de TMAH e C)  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e por D) MIC utilizando  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  como solução absorvedora.

Como pode ser observado na Figura 27 A e Figura 28 A, a solução obtida após a digestão de cabelo e unha por MAD apresentou um aspecto límpido sem a presença de material particulado, assim como a solução obtida após a digestão de cabelo e unha por MIC (Figura 27 D e Figura 28 D). As soluções apresentaram baixo carbono dissolvido ( $232 \pm 40 \text{ mg L}^{-1}$  para MAD e  $< 5 \text{ mg L}^{-1}$  para MIC para cabelo e  $273 \pm 72 \text{ mg L}^{-1}$  para MAD e  $< 5 \text{ mg L}^{-1}$  para MIC para unha). No entanto, a elevada acidez residual da solução obtida após a digestão de cabelo e unha por MAD necessitou uma etapa de diluição adicional e de ajuste de pH, previamente à etapa de determinação, o que não foi necessário para a solução obtida após a MIC.

Como pode ser visto na Figura 27 B e C e 28 B e C, a solução obtida após o preparo da amostra de cabelo e unha por MAE apresentou uma coloração marrom escura ou amarelada, devido à presença de compostos orgânicos da matriz em solução. A solução apresentou material em suspensão e elevado carbono dissolvido ( $2.138 \pm 233 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando  $110 \text{ mmol L}^{-1}$  TMAH e  $5.789 \pm 603 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para o cabelo e  $3.583 \pm 146 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando  $110 \text{ mmol L}^{-1}$  TMAH e  $4.605 \pm 867 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para a unha). A solução obtida

após a MAE precisou ser filtrada e diluída, previamente à etapa de determinação, o que não foi necessário para a solução obtida após a MIC.

### 5.2.3 Comparação entre os diferentes métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios e enxofre em cabelo

Uma amostra de cabelo foi selecionada aleatoriamente e preparada pelos diferentes métodos de preparo de amostras avaliados nesta tese. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Concentração de halogênios e enxofre em uma amostra de cabelo utilizada para a comparação da performance de diferentes ferramentas analíticas ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

Solução digestora ou extratora	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$				
	Br <sup>a</sup>	Cl <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	I <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>
HNO <sub>3</sub> 14,4 mol L <sup>-1</sup>	< 15 <sup>¥</sup>	-	-	< 1 <sup>¥</sup>	-
TMAH 110 mmol L <sup>-1</sup>	< 6 <sup>¥</sup>	< 900 <sup>¥</sup>	-	< 2 <sup>¥</sup>	450 ± 160
NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup>	< 6 <sup>¥</sup>	< 900 <sup>¥</sup>	-	< 2 <sup>¥</sup>	9.500 ± 322
Método proposto	1,32 ± 0,07	488 ± 31	< 8 <sup>¥</sup>	1,22 ± 0,05	47.200 ± 2.600

<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>IC-CD e <sup>¥</sup>LOQ.

Quando utilizada a MAD como método de preparo de amostras, a elevada acidez residual e o elevado teor de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos digeridos poderiam danificar e saturar a coluna cromatográfica durante a análise por IC-CD-MS. Essa solução não foi analisada por IC-CD-MS para evitar danos ao equipamento. Vale mencionar que a solução obtida após a MIC possibilitou a quantificação de bromo, cloro, iodo e enxofre quando o cabelo foi analisado por IC-CD-MS. Um ajuste de pH adicionando em torno de 500  $\mu\text{L}$  em 10 mL de NH<sub>4</sub>OH concentrado e um fator de diluição adicional de 20 vezes foram necessários para determinação de bromo e iodo por ICP-MS devido ao efeito de memória causado pela acidez da solução obtida após MAD. A concentração de bromo e iodo no cabelo analisado ficou abaixo do LOQ (Br: 15  $\mu\text{g g}^{-1}$  e I: 1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) que foi superior quando comparado ao obtido utilizando MIC associada à ICP-MS (Br: 0,06  $\mu\text{g g}^{-1}$  e I: 0,02  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Um ajuste de pH (adicionando NaOH) e a realização de um fator de diluição de cerca de 5 vezes também se fez necessário para a

determinação de flúor por ISE na solução obtida após MAD. Apesar disso, vale mencionar que a concentração de flúor ficou abaixo do LOQ mesmo utilizando a MIC associada à ISE ( $25 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e IC-CD ( $8 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Quando utilizada a MAE como método de preparo de amostras, além da etapa de filtração, a realização de uma etapa de diluição adicional (pelo menos 20 vezes) foi necessária previamente à etapa de determinação por IC-CD-MS. Flúor não foi possível de ser detectado devido à presença de interferências de matriz no tempo de retenção do  $\text{F}^-$ . A concentração de cloro, bromo e iodo ficou abaixo do LOQ (Cl:  $900 \mu\text{g g}^{-1}$  por IC-CD e Br:  $13 \mu\text{g g}^{-1}$  e I:  $7 \mu\text{g g}^{-1}$  por IC-MS), enquanto a concentração de enxofre foi significativamente inferior (99% utilizando  $110 \text{ mmol L}^{-1}$  HTMA e 80% utilizando  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ao valor obtido utilizando a IC-CD após a MIC. Isso pode estar relacionado à extração não quantitativa ou a extração em uma forma diferente da determinada. Uma etapa de diluição adicional (pelo menos 20 vezes) foi necessária previamente à determinação de bromo e iodo na solução obtida por MAE e analisada por ICP-MS. A concentração de carbono dissolvido superior a  $400 \text{ mg L}^{-1}$  e a presença de material particulado interferiram na determinação dos analitos por ICP-MS. A concentração de bromo ( $6 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e iodo ( $2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) no cabelo foi inferior ao LOQ. A realização de um fator de diluição de até 6 vezes também se fez necessário para a determinação de flúor por ISE visando minimizar o efeito do carbono dissolvido (MENDES *et al.*, 2020).

Nesse sentido, a MIC superou as desvantagens dos métodos convencionais de preparo de amostras baseados na MAD e MAE para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo. Utilizando a MIC, a baixa concentração de carbono dissolvido e utilização de uma solução alcalina diluída resultaram em baixos valores de branco e soluções totalmente compatíveis com diferentes técnicas de determinação (IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE). Na Tabela 15 é apresentado o LOQ para os analitos utilizando diferentes as estratégias avaliadas nesse trabalho.

**Tabela 15.** Limites de quantificação para os métodos avaliados visando à determinação de halogênios e enxofre em cabelo.

Métodos de preparo de amostras e solução utilizada	Carbono (mg L <sup>-1</sup> )	Técnica de determinação	Limite de quantificação (µg g <sup>-1</sup> )				
			Br	Cl	F	I	S
<b>MAD</b>							
HNO <sub>3</sub> 14,4 mol L <sup>-1</sup>	232 ± 40 <sup>b</sup>	IC-CD-MS	-	-	-	-	-
		ICP-MS, ICP-OES e ISE	15 <sup>a</sup>	1.000 <sup>b</sup>	700 <sup>c</sup>	1 <sup>a</sup>	1.300 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>							
HTMA 110 mmol L <sup>-1</sup> / NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup>	2.138 ± 233 <sup>b</sup> / 5.789 ± 603 <sup>b</sup>	IC-CD-MS	13	900	-	7	260
		ICP-MS, ICP-OES e ISE	6 <sup>a</sup>	300 <sup>b</sup>	40 <sup>c</sup>	2 <sup>a</sup>	150 <sup>b</sup>
<b>MIC</b>							
NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup>	< 5 <sup>¥b</sup>	IC-CD-MS	0,7	13	8	0,3	210
		ICP-MS, ICP-OES e ISE	0,06 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	25 <sup>c</sup>	0,02 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>ICP-OES, <sup>c</sup>ISE e <sup>¥</sup>LOQ.

### 5.2.4 Comparação entre os diferentes procedimentos de preparo de amostras para a determinação de halogênios e enxofre em unha

Uma amostra de unha foi selecionada aleatoriamente e preparada pelos diferentes métodos de preparo de amostras avaliados nesta tese. Os resultados estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Concentração de halogênios e enxofre em uma amostra de unha utilizada para a comparação da performance de diferentes ferramentas analíticas ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

Solução digestora ou extratora	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$				
	Br <sup>a</sup>	Cl <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	I <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>
HNO <sub>3</sub> 14,4 mol L <sup>-1</sup>	< 10 <sup>‡</sup>	-	-	1,01 ± 0,17	-
TMAH 110 mmol L <sup>-1</sup>	8,09 ± 1,7	3.904 ± 900	-	< 4 <sup>‡</sup>	23.725 ± 1.200
NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup>	8,70 ± 1,6	3.779 ± 939	-	< 4 <sup>‡</sup>	19.320 ± 1300
Método proposto	10,55 ± 0,84	3.080 ± 225	< 20 <sup>‡</sup>	2,73 ± 0,20	23.200 ± 1.200

<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>IC-CD e <sup>‡</sup>LOQ.

Quando utilizada a MAD como método de preparo de amostras, assim como para o cabelo, a solução não foi analisada por IC-CD-MS para evitar danos ao equipamento. Vale mencionar que a solução obtida após a MIC possibilitou a quantificação de bromo, cloro, iodo e enxofre na unha analisada por IC-CD-MS. Na ICP-MS, um ajuste de pH adicionando em torno de 500  $\mu\text{L}$  de NH<sub>4</sub>OH concentrado em 10 mL e um fator de diluição de 20 vezes foram realizados, previamente à determinação de bromo e iodo por ICP-MS. A concentração de bromo ficou abaixo do LOQ (10  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e a de iodo na unha analisada foi bastante inferior (cerca de 54%) ao valor obtido utilizando ICP-MS após a MIC. Isso pode estar relacionado com a instabilidade de algumas espécies em meio ácido. A combinação de HClO<sub>4</sub> e HNO<sub>3</sub> para converter iodeto em iodato (KNAPP, 1998) não foi avaliada em virtude dos riscos e das possíveis interferências durante a etapa de determinação, e também por ter o objetivo da determinação de cloro na solução. Um ajuste de pH e a realização de um fator de diluição (cerca de 5 vezes) foi realizado previamente à determinação de flúor por ISE. Entretanto, a concentração de flúor na amostra ficou abaixo do LOQ mesmo utilizando a MIC associada à ISE (80  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e IC-CD (20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

Quando utilizada a MAE como método de preparo de amostras, além da etapa de filtração, a realização de uma etapa de diluição adicional (pelo menos 20 vezes) foi necessária previamente à etapa de determinação por IC-CD-MS. Flúor não foi detectado devido a presença de interferência de matriz no tempo de retenção do F<sup>-</sup>. A concentração de bromo e iodo ficou abaixo do LOQ (Br: 40 µg g<sup>-1</sup> e I: 20 µg g<sup>-1</sup> por IC-MS), enquanto a concentração de cloro (3.904 ± 900 µg g<sup>-1</sup> utilizando 110 mmol L<sup>-1</sup> HTMA e 3.779 ± 939 µg g<sup>-1</sup> utilizando 100 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH) e de enxofre (23.725 ± 1.200 µg g<sup>-1</sup> utilizando 110 mmol L<sup>-1</sup> HTMA e 19.320 ± 1.300 µg g<sup>-1</sup> utilizando 100 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH) foi bastante concordante ao valor obtido utilizando a IC-CD após a MIC (Cl: 3.080 ± 225 µg g<sup>-1</sup> e S: 23.200 ± 1.200 µg g<sup>-1</sup>). No entanto, o CV para repetibilidade foi de até 30% e o LOQ para cloro (1.200 µg g<sup>-1</sup>) e enxofre (1.500 µg g<sup>-1</sup>) foi bastante superior ao obtido com a MIC associada à IC-CD (Cl: 40 µg g<sup>-1</sup> e S: 800 µg g<sup>-1</sup>). Uma etapa de filtração e uma diluição adicional (pelo menos 20 vezes) foram necessárias para a determinação de bromo e iodo em unha por ICP-MS após MAE. A concentração de bromo (8,09 ± 1,7 µg g<sup>-1</sup> utilizando 110 mmol L<sup>-1</sup> HTMA e 8,70 ± 1,6 µg g<sup>-1</sup> utilizando 100 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH) foi bastante concordante ao valor obtido utilizando a ICP-MS após a MIC (10,0 ± 0,5 µg g<sup>-1</sup>), enquanto a concentração de iodo ficou abaixo do LOQ (4 µg g<sup>-1</sup>). O CV do bromo para repetibilidade foi de até 15% e o LOQ para bromo (7 µg g<sup>-1</sup>) foi superior ao obtido com a MIC associada à ICP-MS (Br: 0,1 µg g<sup>-1</sup> e I: 0,03 µg g<sup>-1</sup>). A realização de um fator de diluição de até 5 vezes também se fez necessário para a determinação de flúor por ISE visando minimizar o efeito do carbono dissolvido (MENDES *et al.*, 2020).

Assim, a MIC superou as desvantagens dos métodos convencionais de preparo de amostras baseados na MAD e MAE para a posterior determinação de halogênios e enxofre em unha. Assim como para a digestão do cabelo, a baixa concentração de carbono dissolvido e utilização de uma solução alcalina diluída resultaram em baixos valores de branco e soluções totalmente compatíveis com diferentes técnicas de determinação (IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE). Na Tabela 17 é apresentado o LOQ para os analitos utilizando diferentes as estratégias avaliadas nesse trabalho.

**Tabela 17.** Limites de quantificação para os métodos avaliados visando à determinação de halogênios e enxofre em unha.

Métodos de preparo de amostras e solução utilizada	Carbono (mg L <sup>-1</sup> )	Técnica de determinação	Limite de quantificação (µg g <sup>-1</sup> )				
			Br	Cl	F	I	S
<b>MAD</b>							
HNO <sub>3</sub> 14,4 mol L <sup>-1</sup>	273 ± 72 <sup>b</sup>	IC-CD-MS	-	-	-	-	-
		ICP-MS, ICP-OES e ISE	10 <sup>a</sup>	1.000 <sup>b</sup>	2.000 <sup>c</sup>	1 <sup>a</sup>	300 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>							
HTMA 110 mmol L <sup>-1</sup> / NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup>	3.583 ± 146 <sup>b</sup> / 4.605 ± 867 <sup>b</sup>	IC-CD-MS	40	1.200	-	20	1.500
		ICP-MS, ICP-OES e ISE	7 <sup>a</sup>	600 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	4 <sup>a</sup>	800 <sup>b</sup>
<b>MIC</b>							
NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup>	< 5 <sup>¥b</sup>	IC-CD-MS	3	40	20	1	800
		ICP-MS, ICP-OES e ISE	0,1 <sup>a</sup>	120 <sup>b</sup>	80 <sup>c</sup>	0,03 <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>ICP-MS; <sup>b</sup>ICP-OES, <sup>c</sup>ISE e <sup>¥</sup>LOQ.



### 5.2.5 Determinação de halogênios e enxofre em cabelo e unha

Os métodos propostos, que envolvem a digestão das amostras de cabelo e unha por MIC e a subsequente determinação de halogênios e enxofre por várias técnicas de determinação foram aplicados para a análise de dez amostras de cabelo e unha oriundos de diversos doadores. Como pode ser observado nas Tabelas 18 e 19, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os resultados para todas as concentrações de analitos no cabelo e na unha, utilizando diferentes técnicas de determinação após a MIC. O CV para repetibilidade e precisão intermediária para a análise do cabelo e unha foi sempre inferior a 10%. As variações de concentração nas amostras de cabelo e unha analisadas podem estar associadas aos hábitos, exposição ambiental e condições de cada organismo. A concentração de flúor em todas as amostras de cabelo e unha ficou abaixo do LOQ (com exceção do CRM de cabelo, apresentado na Tabela 12, e dos ensaios de recuperação, apresentados na Tabelas 10 e 11).

Vale mencionar que existe uma demanda por informações e estudos voltados para a determinação de halogênios e enxofre em amostras biológicas. Os desafios analíticos associados a esse tema limitam essas avaliações nos campos nutricional, ambiental, medicinal e dentre outros. O estado clínico dos voluntários não foi avaliado neste estudo, mas os métodos propostos podem ser uma ferramenta poderosa para essa finalidade, considerando que foi possível determinar a concentração dos elementos com exatidão e precisão satisfatória. As estratégias analíticas propostas nesta tese podem ser eficientes ferramentas para a determinação de halogênios e enxofre em cabelos e unha para diferentes áreas do conhecimento.

**Tabela 18.** Concentrações de halogênios e enxofre em cabelo: combustão iniciada por micro-ondas, 300 mg da amostra e 100 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora. Determinação por diferentes técnicas ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=5).

Amostra	IC-CD-MS					ICP-MS		ICP-OES	
	Condutividade			MS		Br	I	Cl	S*
Cabelo	Cl	F	S*	Br	I				
C1	1.112 ± 43	< 8 <sup>¥</sup>	57,6 ± 3,3	2,20 ± 0,20	1,30 ± 0,12	2,47 ± 0,15	1,27 ± 0,12	1.025 ± 55	53,2 ± 3,1
C2	646 ± 16	< 8 <sup>¥</sup>	52,5 ± 2,1	4,10 ± 0,32	2,70 ± 0,25	4,17 ± 0,40	2,88 ± 0,27	635 ± 25	48,2 ± 2,4
C3	107 ± 8	< 8 <sup>¥</sup>	50,7 ± 1,5	< 0,7 <sup>¥</sup>	0,85 ± 0,08	0,41 ± 0,04	0,90 ± 0,09	115 ± 8	48,4 ± 3,0
C4	784 ± 49	< 8 <sup>¥</sup>	51,9 ± 1,2	1,21 ± 0,12	0,71 ± 0,07	1,31 ± 0,07	0,66 ± 0,05	720 ± 23	53,6 ± 2,1
C5	120 ± 12	< 8 <sup>¥</sup>	53,7 ± 0,6	0,98 ± 0,08	1,30 ± 0,11	1,07 ± 0,04	1,19 ± 0,02	128 ± 12	52,1 ± 2,4
C6	56,1 ± 2,4	< 8 <sup>¥</sup>	47,1 ± 0,6	< 0,7 <sup>¥</sup>	0,61 ± 0,06	0,24 ± 0,02	0,56 ± 0,02	53,9 ± 3,8	45,0 ± 2,2
C7	647 ± 51	< 8 <sup>¥</sup>	51,6 ± 2,4	2,91 ± 0,30	1,90 ± 0,18	2,69 ± 0,10	1,98 ± 0,12	645 ± 41	48,8 ± 2,5
C8	1.039 ± 60	< 8 <sup>¥</sup>	56,1 ± 1,5	3,59 ± 0,32	10,1 ± 0,9	3,50 ± 0,33	9,41 ± 0,61	1.043 ± 68	54,1 ± 2,6
C9	1.190 ± 56	< 8 <sup>¥</sup>	61,2 ± 0,9	3,21 ± 0,30	2,19 ± 0,21	3,41 ± 0,26	2,29 ± 0,20	1.182 ± 71	62,0 ± 1,5
C10	697 ± 42	< 8 <sup>¥</sup>	53,4 ± 0,9	3,70 ± 0,25	2,20 ± 0,21	3,82 ± 0,27	2,18 ± 0,16	650 ± 50	50,2 ± 3,2

\* mg g<sup>-1</sup> e <sup>¥</sup> LOQ.

**Tabela 19.** Concentrações de halogênios e enxofre em unha: combustão iniciada por micro-ondas, 15 a 100 mg de amostra e 50 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora. Determinação por diferentes técnicas ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ , n=5).

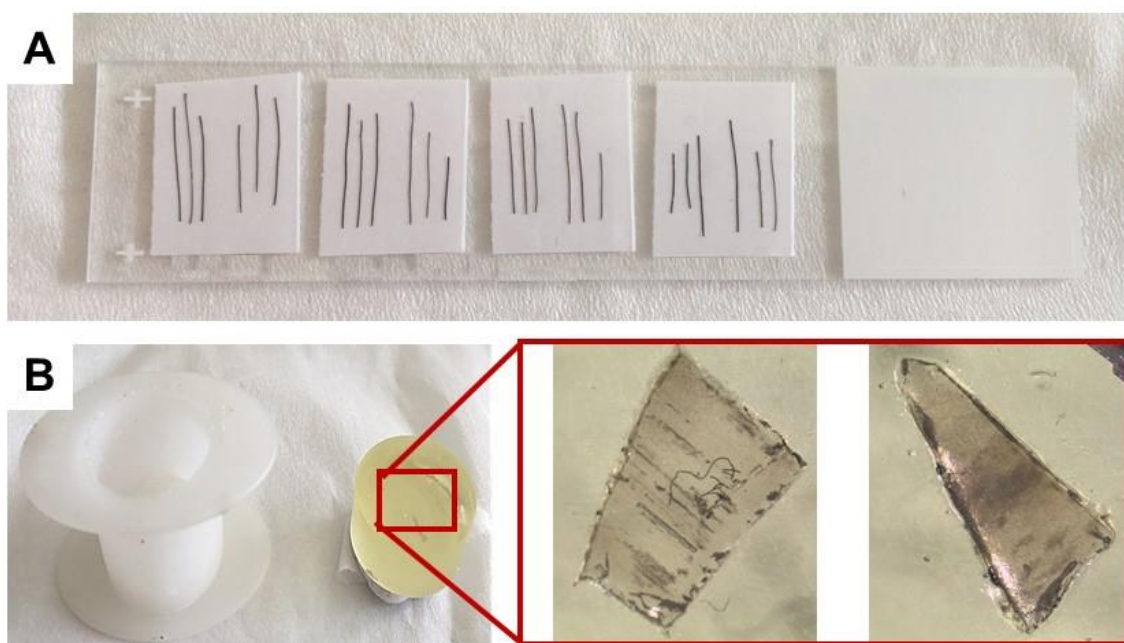
Amostra	IC-CD-MS					ICP-MS		ICP-OES	
	Condutividade			MS		Br	I	Cl	S*
Unha	Cl	F	S*	Br	I				
U1 <sup>a</sup>	713 ± 9	< 30 <sup>¥</sup>	27,0 ± 1,8	< 5 <sup>¥</sup>	< 2 <sup>¥</sup>	1,17 ± 0,09	0,27 ± 0,02	731 ± 20	25,0 ± 2,1
U2 <sup>b</sup>	750 ± 9	< 70 <sup>¥</sup>	33,6 ± 0,9	< 10 <sup>¥</sup>	< 3 <sup>¥</sup>	1,75 ± 0,09	0,23 ± 0,01	780 ± 40	32,2 ± 2,1
U3 <sup>b</sup>	657 ± 48	< 70 <sup>¥</sup>	32,2 ± 0,2	< 10 <sup>¥</sup>	< 3 <sup>¥</sup>	2,92 ± 0,24	0,72 ± 0,07	673 ± 39	32,9 ± 0,9
U4 <sup>b</sup>	589 ± 35	< 70 <sup>¥</sup>	33,7 ± 1,1	< 10 <sup>¥</sup>	< 3 <sup>¥</sup>	1,80 ± 0,14	0,33 ± 0,02	601 ± 40	33,1 ± 1,0
U5 <sup>a</sup>	671 ± 25	< 30 <sup>¥</sup>	33,4 ± 1,1	< 5 <sup>¥</sup>	< 2 <sup>¥</sup>	2,04 ± 0,16	0,53 ± 0,04	651 ± 15	32,9 ± 0,9
U6 <sup>c</sup>	793 ± 79	< 130 <sup>¥</sup>	32,9 ± 2,4	< 20 <sup>¥</sup>	< 7 <sup>¥</sup>	1,64 ± 0,12	0,36 ± 0,03	783 ± 49	32,4 ± 1,4
U7 <sup>b</sup>	772 ± 45	< 70 <sup>¥</sup>	30,0 ± 0,1	< 10 <sup>¥</sup>	< 3 <sup>¥</sup>	2,18 ± 0,08	0,22 ± 0,01	729 ± 45	29,8 ± 0,7
U8 <sup>b</sup>	754 ± 73	< 70 <sup>¥</sup>	30,6 ± 0,9	< 10 <sup>¥</sup>	< 3 <sup>¥</sup>	1,89 ± 0,15	0,41 ± 0,03	714 ± 43	30,2 ± 0,4
U9 <sup>b</sup>	719 ± 21	< 70 <sup>¥</sup>	29,1 ± 1,0	< 10 <sup>¥</sup>	< 3 <sup>¥</sup>	1,91 ± 0,10	0,31 ± 0,03	720 ± 11	28,7 ± 1,0
U10 <sup>b</sup>	752 ± 35	< 70 <sup>¥</sup>	32,1 ± 1,8	< 10 <sup>¥</sup>	< 3 <sup>¥</sup>	2,02 ± 0,15	0,51 ± 0,03	731 ± 25	32,4 ± 0,9

Utilizando massas de <sup>a</sup>60 mg; <sup>b</sup>30 mg; <sup>c</sup>15 mg; \* mg g<sup>-1</sup> e <sup>¥</sup>LOQ.

### 5.3 Determinação e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS

#### 5.3.1 Avaliações preliminares

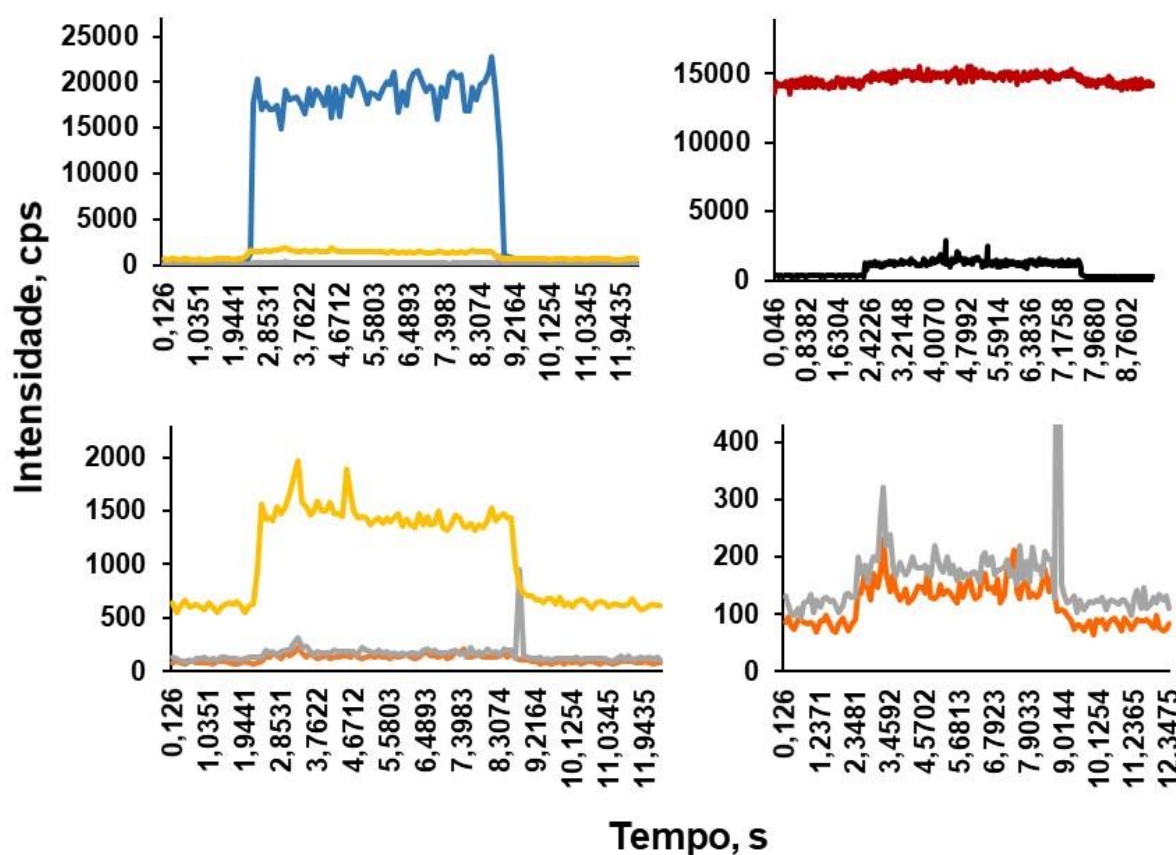
Inicialmente foi avaliada a forma de introdução das amostras na câmara de ablação. Conforme pode ser observado na Figura 29 A, os fios de cabelos foram introduzidos na câmara de ablação fixados em uma fita adesiva do tipo dupla face e, conforme pode ser observado na Figura 29 B, as unhas foram introduzidas na câmara de ablação embebidas em resina epóxi. A forma de introdução foi previamente selecionada de acordo com a característica de fixação das amostras e a baixa concentração dos analitos na fita dupla face e na resina epóxi. A análise direta de cabelo e unha por LA-ICP-MS confere várias vantagens em relação à simplicidade na etapa de pré-tratamento e a possibilidade da obtenção de informações em relação à contaminação temporal. Para a realização das análises por LA-ICP-MS, inicialmente, uma amostra de concentração conhecida foi utilizada para as otimizações iniciais.



**Figura 29.** Forma de introdução das amostras na câmara de ablação. A) fios de cabelo fixados em fita adesiva dupla face e B) unhas embebidas em resina epóxi.

### 5.3.1.1 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo

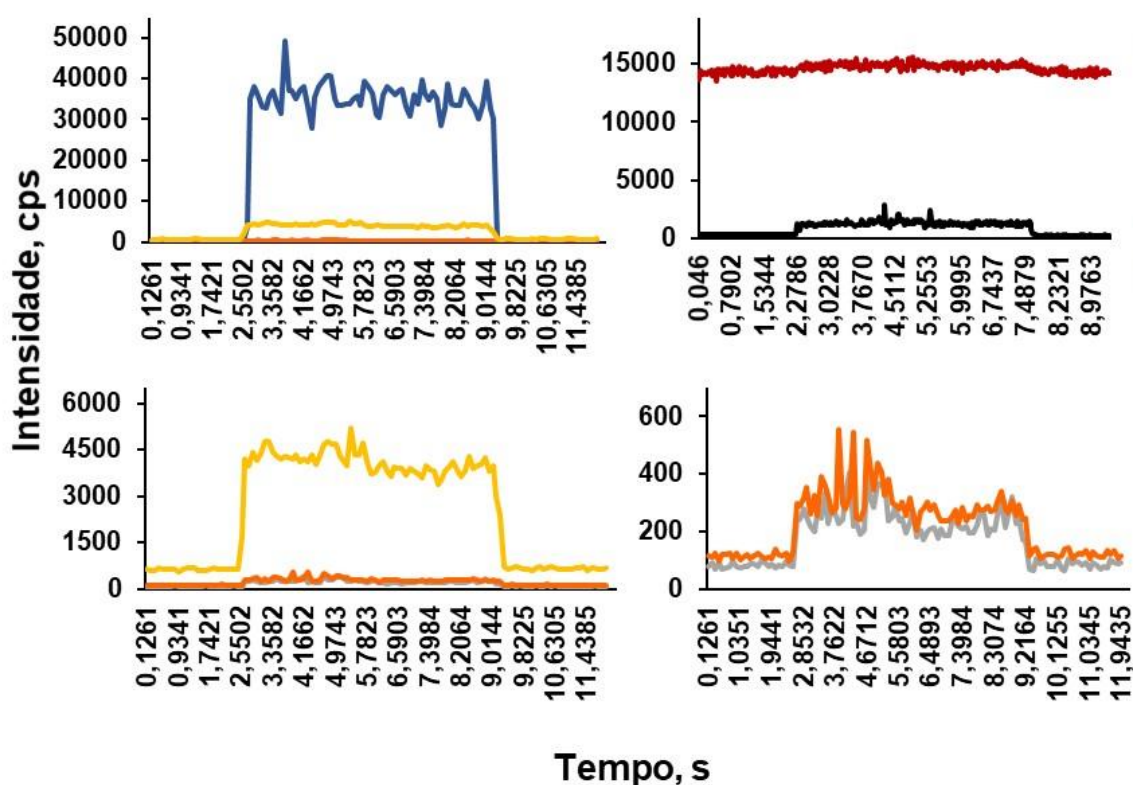
O cabelo foi selecionado para as avaliações preliminares e condições brandas de ablação foram inicialmente utilizadas visando minimizar a introdução de partículas grandes no espectrômetro e evitar picos intensos positivos de sinal e até mesmo a obstrução do tubo de transporte do aerossol. O diâmetro do *spot* foi de 10  $\mu\text{m}$  e a densidade de energia foi de 0,33  $\text{J cm}^{-2}$ . A intensidade do sinal para os analitos é apresentada na Figura 30.



**Figura 30.** Intensidade de sinal para os isótopos (—)  $^{79}\text{bromo}$ , (—)  $^{81}\text{bromo}$ , (—)  $^{35}\text{cloro}$ , (—)  $^{37}\text{cloro}$ , (—)  $^{127}\text{iodo}$  e (—)  $^{34}\text{enxofre}$  por LA-ICP-MS (10  $\mu\text{m}$  de diâmetro do *spot* e 0,33  $\text{J cm}^{-2}$  de densidade de energia). Cabelo com 3,50  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo, 1.000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro; 10,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de iodo e 56,0  $\text{mg g}^{-1}$  de enxofre - amostra C8.

Com o intuito de aumentar a intensidade do sinal para os analitos e a razão sinal/ruído, o diâmetro do *spot* e a densidade de energia do *laser* foram aumentados de 10  $\mu\text{m}$  e 0,33  $\text{J cm}^{-2}$  para 35  $\mu\text{m}$  e 1,50  $\text{J cm}^{-2}$ . O aumento nas condições de ablação

não causou a desintegração do cabelo e proporcionou um aumento significativo da intensidade do sinal para o sinal de bromo, iodo e enxofre, como pode ser observado na Figura 31. Vale mencionar que a intensidade do sinal para cloro manteve-se estável mesmo com o aumento do diâmetro do *spot* e da densidade de energia.



**Figura 31.** Intensidade de sinal para os isótopos (—)  $^{79}\text{bromo}$ , (—)  $^{81}\text{bromo}$ , (—)  $^{35}\text{cloro}$ , (—)  $^{37}\text{cloro}$ , (—)  $^{127}\text{iodo}$  e (—)  $^{34}\text{enxofre}$  por LA-ICP-MS (35  $\mu\text{m}$  de diâmetro do *spot* e 1,50  $\text{J cm}^{-2}$  de densidade de energia). Cabelo com 3,50  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo, 1.000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro; 10,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de iodo e 56,0  $\text{mg g}^{-1}$  de enxofre - amostra C8.

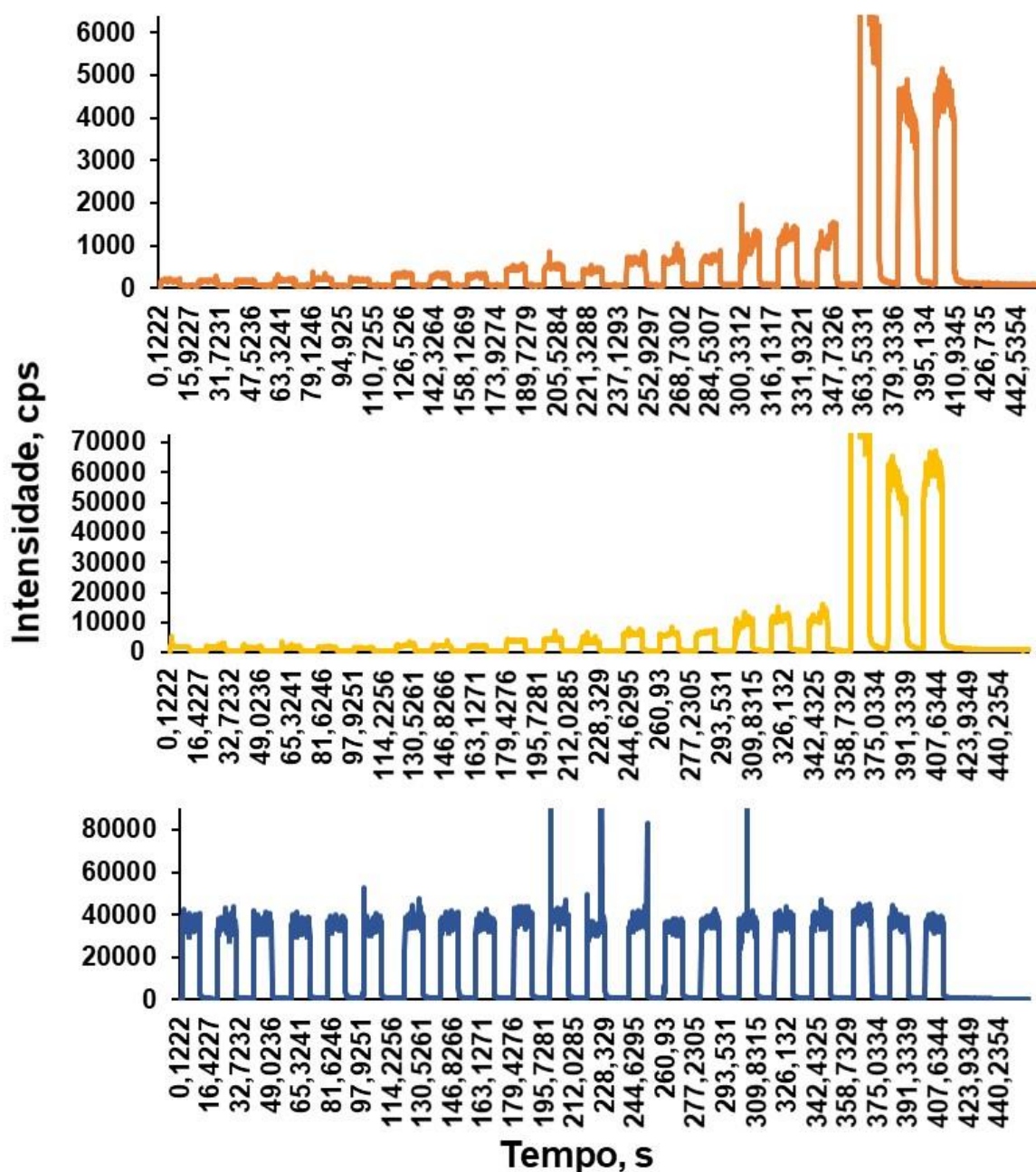
Nesse sentido, o diâmetro do *spot* de 35  $\mu\text{m}$  e a densidade de energia de 1,50  $\text{J cm}^{-2}$  foram selecionados. Os isótopos utilizados nas avaliações subsequentes foram  $^{79}\text{Br}$ ,  $^{35}\text{Cl}$  e  $^{127}\text{I}$  e o isótopo  $^{34}\text{S}$  foi avaliado como padrão interno. A utilização de uma câmara de ablação ultrarrápida resultou em uma limpeza (definida como a largura do pulso em 0,1% do máximo do pulso) de 30-40 ms. Além disso, para obter uma intensidade de sinal estável para os elementos, a taxa de repetição do *laser* foi de 100 Hz. A combinação do aumento do diâmetro do *spot* (35  $\mu\text{m}$ ) e da elevada taxa de repetição (100 Hz) necessitou de uma quantidade de 40 disparos por posição para

cumprir a velocidade de translação dos estágios da câmara de ablação e manter as varreduras de linhas mais curtas. Isso possibilitou uma elevada frequência de análise e a manutenção de uma boa resolução espacial.

#### 5.3.1.1.1 Utilização dos fios de cabelo fortificados com halogênios como estratégia de calibração para a determinação de bromo, cloro e iodo por LA-ICP-MS

Inicialmente, a concentração de bromo, cloro e iodo foi determinada nos fios de cabelo fortificados com halogênios por ICP-MS e IC-CD após a digestão das amostras por MIC, métodos de análise previamente otimizados e propostos durante o desenvolvimento desta tese (MESKO *et al.*, 2019; NOVO *et al.*, 2019c). A concentração de bromo (1,54 a 84,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e iodo (1,85 a 163  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos fios de cabelo fortificados foi proporcional ao aumento da concentração dos elementos na solução padrão (0,025 a 20,0  $\text{mg L}^{-1}$  de bromo e iodo). Por outro lado, a concentração de cloro nos fios de cabelo fortificados manteve-se estável (500  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) mesmo com o aumento da concentração dos elementos na solução padrão (1,0 a 100  $\text{mg L}^{-1}$  de cloro). Apesar de impossibilitar a determinação de cloro, a utilização de fios de cabelo fortificados com halogênios com estratégia de calibração possibilita a determinação de bromo e iodo em cabelo por LA-ICP-MS.

A homogeneidade de bromo e iodo (analitos adicionados ao fio) e de enxofre (padrão interno já presente na matriz) foi avaliada na seção longitudinal dos fios de cabelo fortificados com halogênios. Para isso, os sete fios de cabelo utilizados como padrão foram fixados em paralelo em fita adesiva dupla face (cerca de 2 cm de fio de cabelo considerando 3 fios para cada padrão), depositada em lâminas de microscópio e introduzida na câmara de ablação. Nessas avaliações, foram feitas ablações de um total de três linhas para cada padrão, com comprimento de 650  $\mu\text{m}$  para cada linha. Na Figura 32 é apresentada a intensidade do sinal para bromo, iodo e enxofre nos fios de cabelo utilizados como padrão, na seção longitudinal.



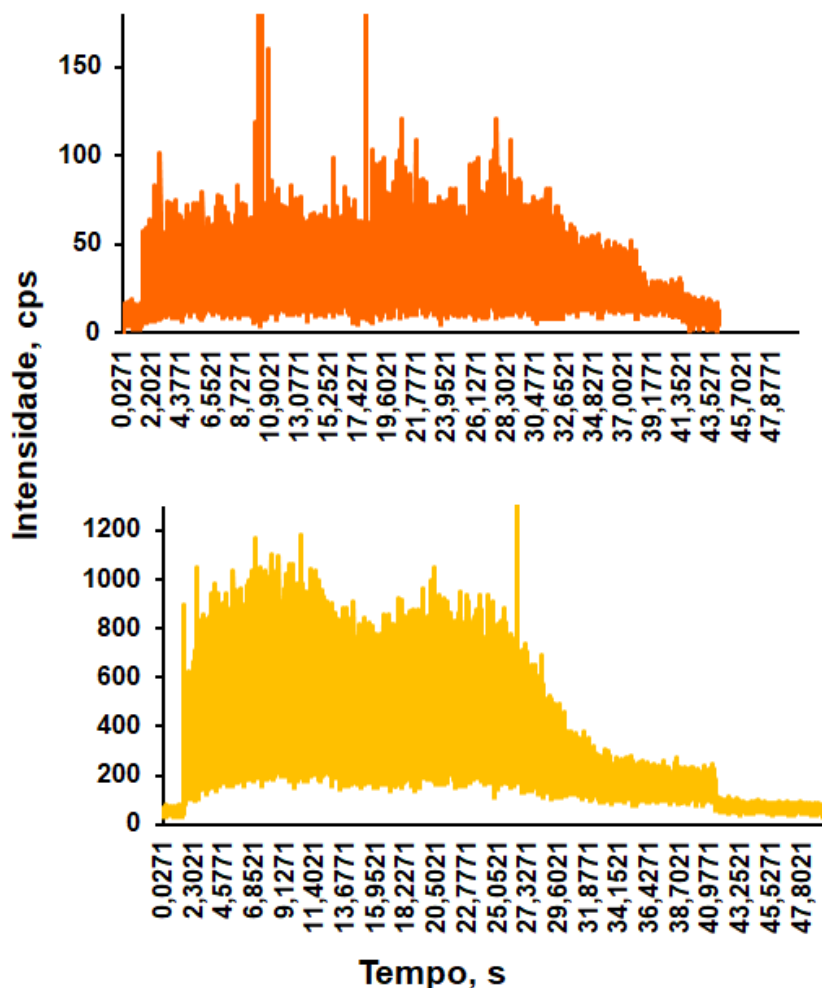
**Figura 32.** Intensidade do sinal para os isótopos (—)  $^{79}\text{bromo}$ , (—)  $^{127}\text{iodo}$  e (—)  $^{34}\text{enxofre}$  nos fios de cabelo fortificados com halogênios. Utilizando três varreduras em linha para cada padrão.

Como pode ser observado na Figura 32, houve um aumento proporcional na intensidade do sinal para bromo e iodo com o aumento da concentração dos analitos nos fios de cabelo fortificados (considerando três varreduras por padrão). Enxofre manteve-se estável na seção longitudinal para todos os padrões, o que indica que esse elemento está distribuído homogeneamente na matriz e pode ser utilizado como



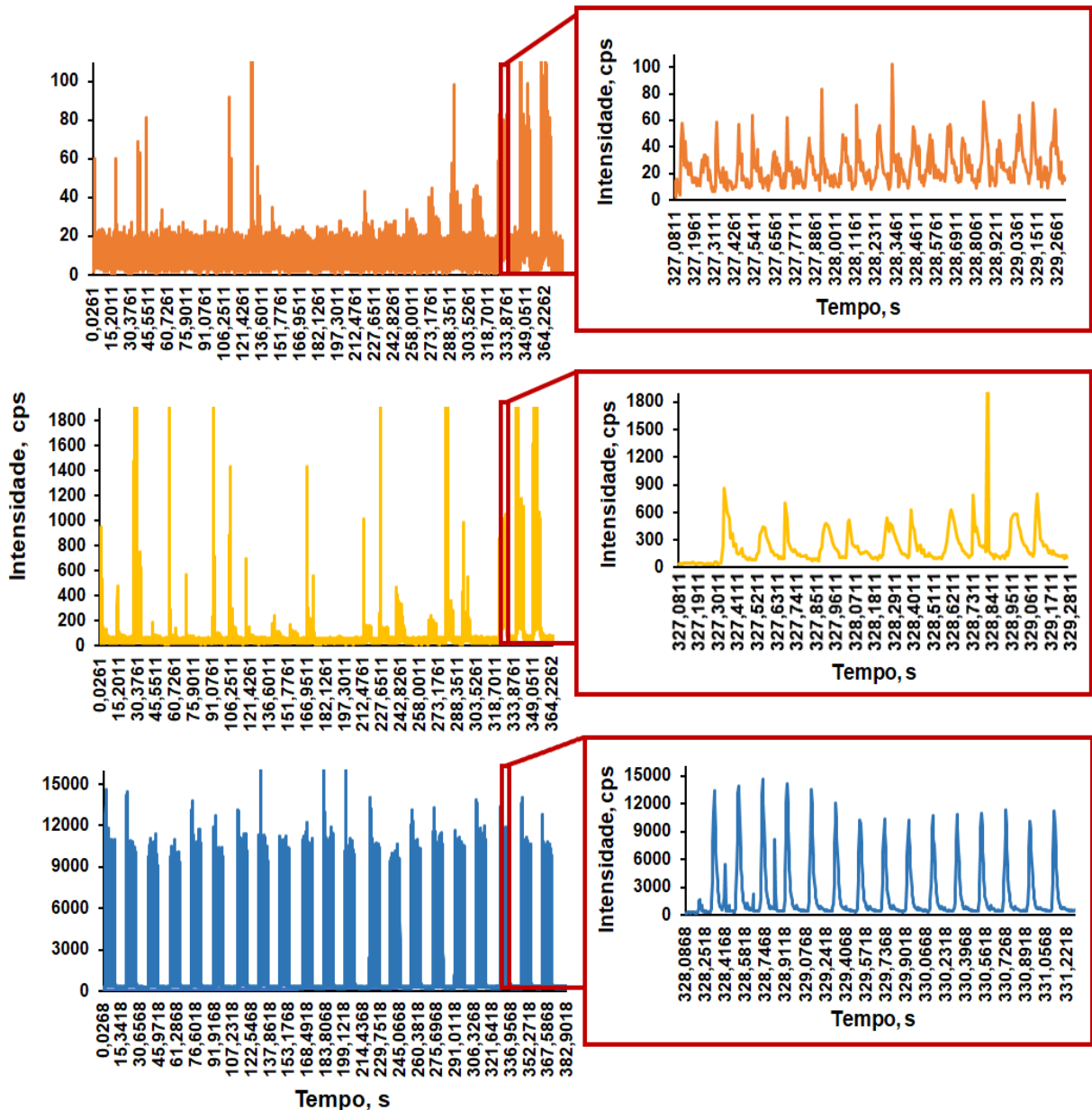
padrão interno para corrigir variações no transporte, rendimento de ablação e heterogeneidade da amostra. Assim, os padrões foram considerados homogêneos na seção longitudinal e resultaram em um CV de 2 a 8% para bromo e iodo e de 1 a 3% para enxofre.

A homogeneidade e a incorporação dos analitos nos fios de cabelo fortificados com halogênios utilizados como padrão foram também avaliadas na seção transversal através de 200 disparos na mesma posição do cabelo, compreendendo o diâmetro total. Nesse ensaio, a taxa de repetição do *laser* foi fixada em 5 Hz, enquanto o período de amostragem foi fixado em 5 ms. Na Figura 33 é apresentada a intensidade do sinal para bromo e iodo nos fios de cabelo utilizados como padrão, na seção vertical compreendendo o diâmetro total.



**Figura 33.** Intensidade do sinal para os isótopos ( $^{79}\text{Br}$ ) e ( $^{127}\text{I}$ ) no fio de cabelo. Ensaio de profundidade com ablação total do fio de cabelo utilizando o padrão 5.

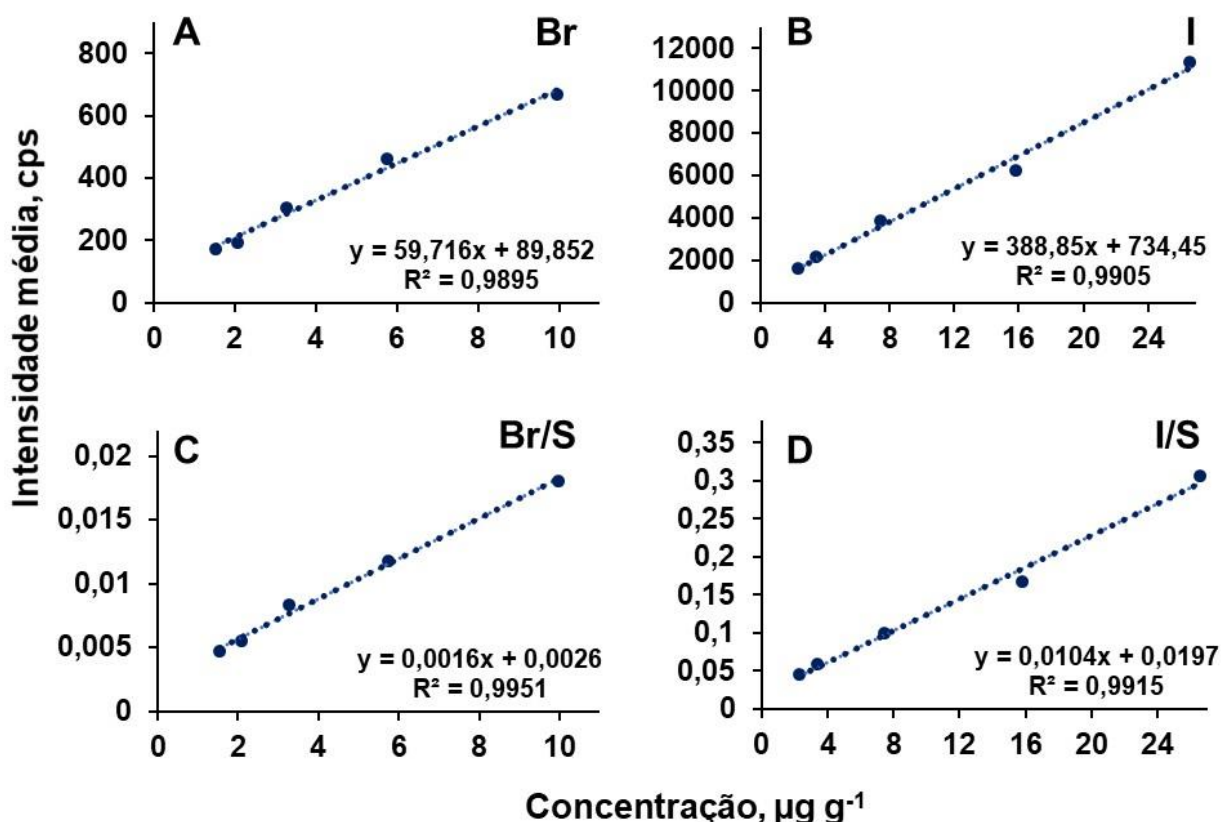
Como pode ser visto na Figura 33, apesar de alguns picos aumentados, a intensidade do sinal para bromo e iodo permanece estável mesmo com o aumento da profundidade do cabelo, o que indica que o elemento foi aderido pela matriz. A homogeneidade de bromo, iodo e enxofre na seção vertical foi também avaliada pela análise dos sete padrões fixados em paralelo em fita adesiva dupla face (cerca de 2 cm de fio de cabelo considerando 3 fios para cada padrão), depositados em lâminas de microscópio e introduzidos na câmara de ablação, e na Figura 34 são apresentados os resultados. A taxa de repetição do *laser* foi fixada em 5 Hz, o período de amostragem em 5 ms e o número de disparos por posição em 40.



**Figura 34.** Intensidade do sinal para os isótopos (—)  $^{79}\text{bromo}$ , (—)  $^{127}\text{iodo}$  e (—)  $^{34}\text{enxofre}$  nos fios de cabelo fortificados com halogênios. Utilizando três varreduras em profundidade para cada padrão.

Como pode ser visto na Figura 34, houve um aumento proporcional na intensidade do sinal de bromo e iodo com o aumento da concentração dos analitos nos fios de cabelo fortificados (considerando três varreduras para cada padrão). Assim como para a seção longitudinal, enxofre manteve-se estável para todos os padrões. Nesse sentido, os resultados indicam que bromo e iodo foram incorporados de maneira homogênea e que enxofre permanece homogêneamente distribuído na seção longitudinal e transversal no cabelo. Assim, a amostragem realizada utilizando 40

disparos por posição é bastante representativa. Com base nesse resultado, os sete fios de cabelo fortificados com halogênios foram analisados por LA-ICP-MS no modo de varredura de linha e as curvas de calibração foram construídas plotando a intensidade média dos elementos em relação à concentração determinada por ICP-MS após a digestão da amostra por MIC. As curvas de calibração para bromo e iodo (intensidade do sinal para os analitos não normalizada e normalizada com a intensidade do sinal para o padrão interno) estão apresentadas na Figura 35.



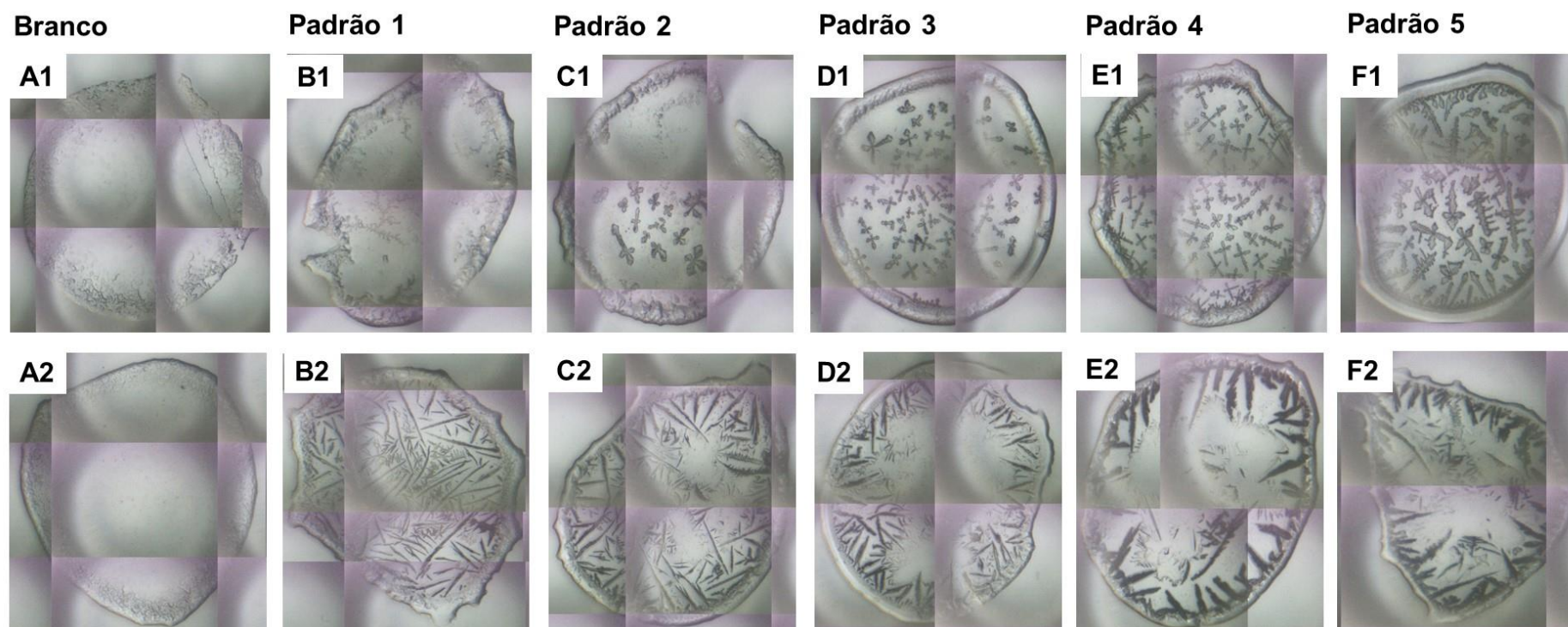
**Figura 35.** Curvas de calibração para A) bromo e B) iodo com o sinal não normalizado com padrão interno e para C) bromo e D) iodo com o sinal normalizado com padrão interno. Utilizando varreduras de linha de 8 s.

Como pode ser observado na Figura 35, a realização de três varreduras de três fios de cabelo enriquecidos para cada padrão forneceu um CV de 2 a 8% para bromo e iodo e de 1 a 3% para enxofre (exceto para o padrão mais baixo próximo ao LOQ). As curvas de calibração resultaram em uma boa linearidade ( $R^2 > 0,98$  para bromo e  $R^2 > 0,99$  para iodo). O LOD e o LOQ calculado utilizando três vezes, para o LOD, e dez vezes, para o LOQ, o desvio padrão dos analitos para o sinal de fundo foi de 0,5

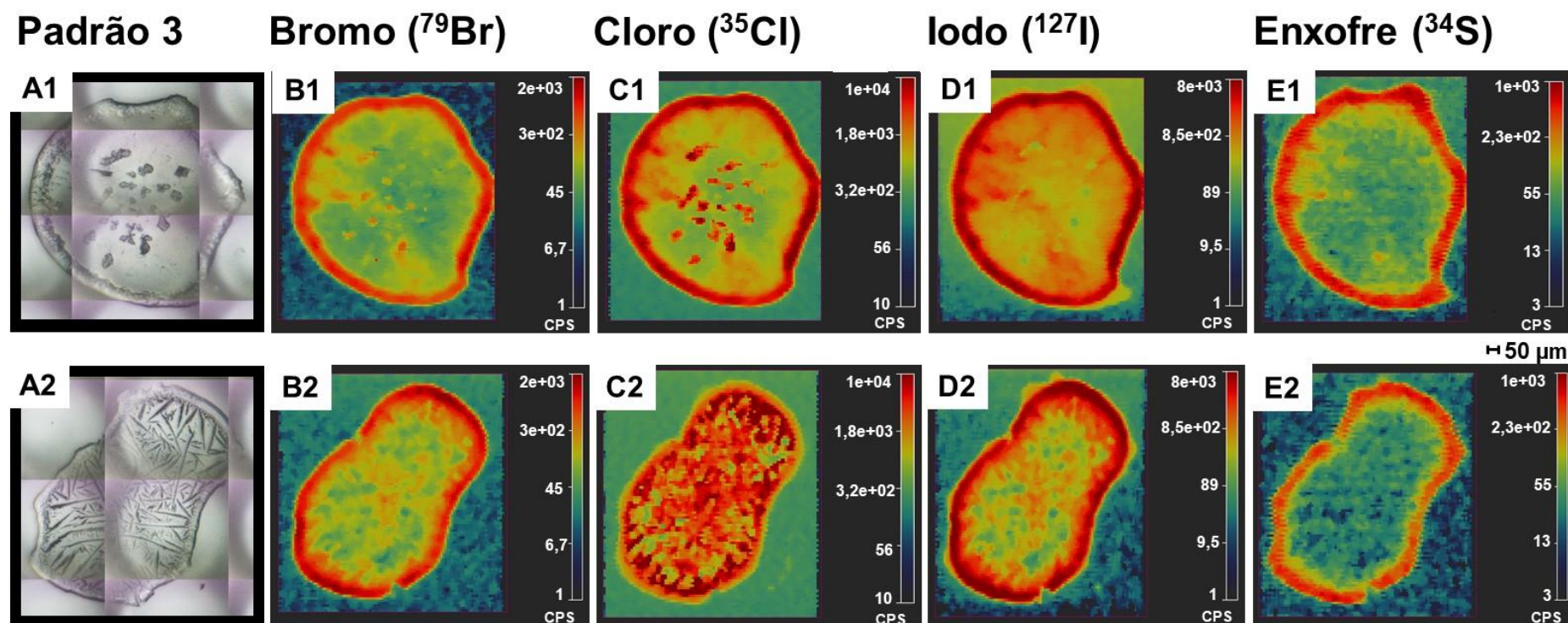
e  $1,1 \mu\text{g g}^{-1}$  para bromo e  $0,2$  e  $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$  para iodo, respectivamente. Nesse sentido, a utilização dos fios de cabelo fortificados com halogênios analisados por ICP-MS após a digestão da amostra por MIC pode ser uma estratégia de calibração para a determinação de bromo e iodo em cabelo por LA-ICP-MS. Existem poucos trabalhos na literatura que propõem alternativas eficientes para essa finalidade. Os métodos analíticos otimizados e propostos durante esta tese, podem ser utilizados para ampliar a gama de estudos sobre esses elementos em amostras biológicas.

#### 5.3.1.1.2 Utilização de queratina extraída de cabelo como estratégia de calibração para determinação de bromo, cloro e iodo por LA-ICP-MS

Considerando que um dos maiores desafios da utilização da LA-ICP-MS para a quantificação de elementos, em especial de halogênios, é a etapa de calibração, outra estratégia para esta finalidade foi estudada. Assim, a calibração baseada na preparação de gotas de queratina fortificadas, extraída do cabelo, foi investigada para a determinação de bromo, cloro e iodo por LA-ICP-MS. A homogeneidade e a incorporação dos analitos nas gotas de queratina foram avaliadas e, para isso, bromo, cloro e iodo foram adicionados em diferentes espécies ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$  e  $\text{IO}_3^-$ ). A distribuição espacial dos elementos foi avaliada através de imagens qualitativas, utilizando  $10 \mu\text{m}$  de diâmetro do *spot* e a taxa de repetição foi sincronizada com o período de amostragem do espectrômetro de massa (taxa de aquisição de dados). O aspecto microscópico das gotas de queratina e a distribuição espacial dos elementos nas gotas de queratina são apresentados nas Figuras 36 e 37.



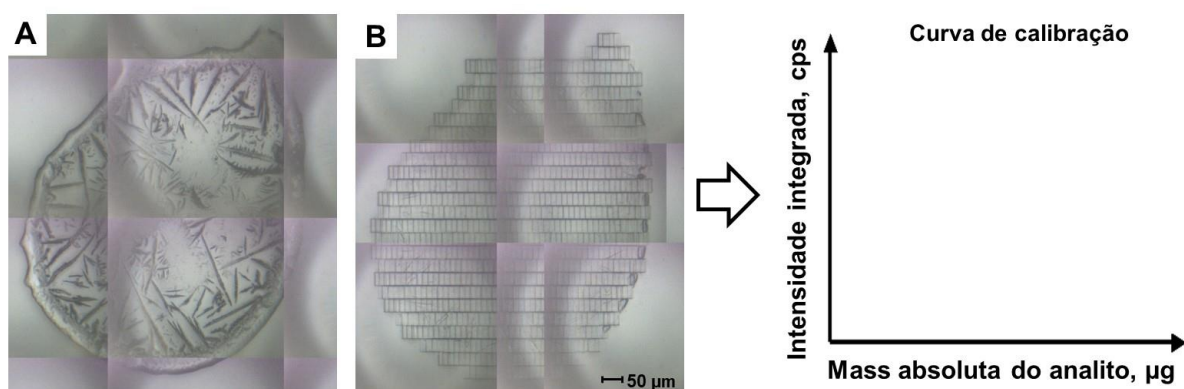
**Figura 36.** Aspecto microscópico das gotas de queratina. A1-F1 adição dos analitos na forma de brometo, cloreto e iodeto. A2-F2 adição dos analitos na forma de bromato, clorato e iodato. Concentração dos elementos adicionada na queratina: A1-2) 0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro, bromo e iodo, B1-2) 250  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro e 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo e iodo, C1-2) 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro e 2,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo e iodo, D1-2) 750  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro e 5,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo e iodo, E1-2) 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro e 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo e iodo e F1-2) 2500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro e 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo e iodo.



**Figura 37.** Aspecto microscópico (A1 e A2) e distribuição de bromo (B1 e B2), cloro (C1 e C2), iodo (D1 e D2) e enxofre (E1 e E2) nas gotas de queratina. A1-E1 adição dos analitos na forma de brometo, cloreto e iodeto. A2-E2 adição dos analitos na forma de bromato, clorato e iodato. Concentração dos elementos adicionada na queratina (padrão 3):  $750 \mu\text{g g}^{-1}$  de cloro e  $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$  de bromo e iodo.

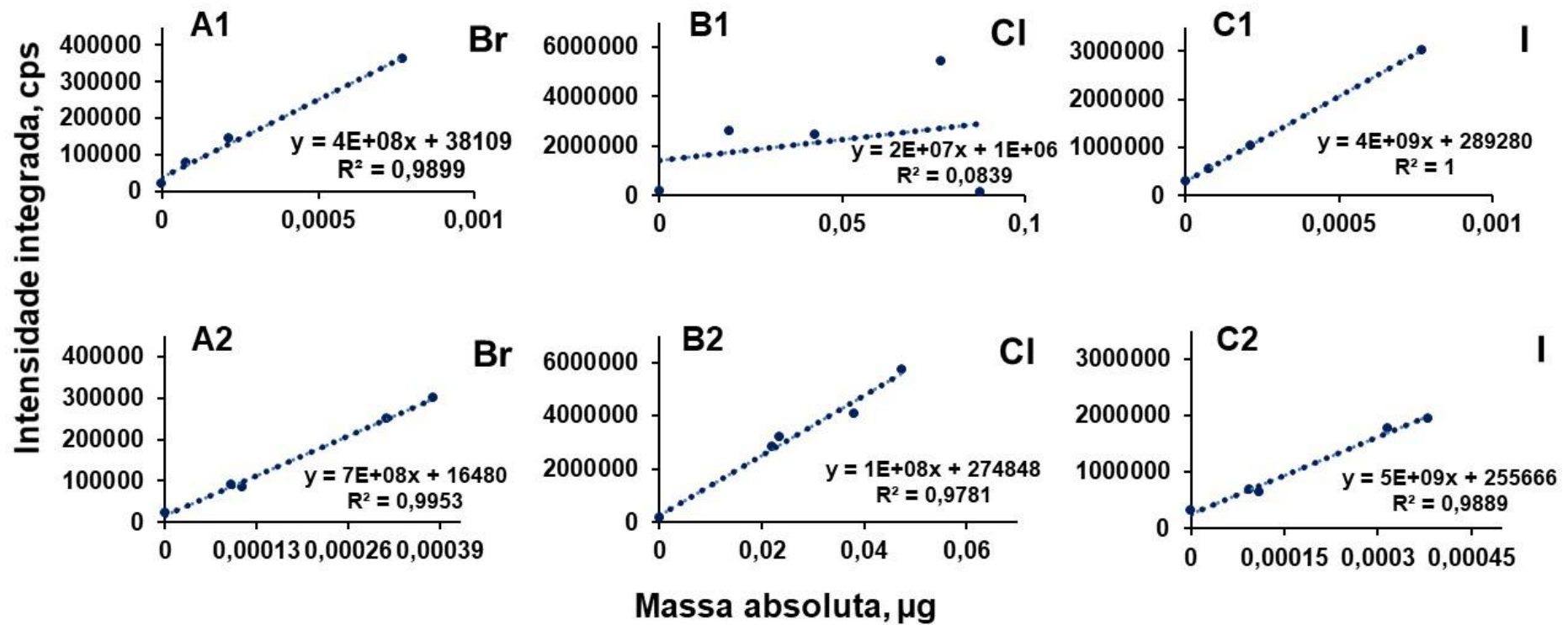
Como pode ser observado na Figura 36, a gota de queratina sofreu uma cristalização severa, após a adição dos analitos, fazendo com que os elementos fossem deslocados para as extremidades da gota, como pode ser observado na Figura 37. A heterogeneidade dos padrões pode estar relacionada com a interação dos analitos com compostos da matriz (imagem com concentrações mais elevadas nas bordas) ou a efeitos de tensão superficial (imagem com concentrações mais elevadas no centro) após a etapa de secagem (SALA, SELIH, VAN ELTEREN, 2017). A heterogeneidade dos padrões desempenha um papel crítico na distribuição longitudinal e transversal dos elementos. Alguns procedimentos de preparação habitual dos padrões vêm sendo modificados para produzir um padrão de calibração com elevada homogeneidade para vários elementos. A alternativa proposta é a inclusão de uma etapa de aquecimento (SALA, SELIH, VAN ELTEREN, 2017). Contudo, a inclusão dessa etapa poderia causar perdas por volatilização.

Tendo em vista a distribuição heterogênea de bromo, cloro e iodo nas gotas de queratina fortificadas, uma nova alternativa para a calibração baseada na ablação total do padrão foi realizada. A curva de calibração na ablação total é construída através da intensidade integrada do sinal e a massa absoluta do analito (obtida através da concentração e da massa total do padrão), conforme pode ser apresentado na Figura 38 (VAN ACKER *et al.*, 2016). Nessa abordagem, os fatores relacionados à heterogeneidade dos analitos não são considerados tendo em vista que o padrão é totalmente analisado. Na Figura 39 são apresentadas as curvas de calibração para os analitos utilizado a abordagem da ablação total.



**Figura 38.** A) aspecto microscópico da gota de queratina e B) da gota após a ablação total. Representação esquemática para a curva de calibração utilizando a abordagem da a ablação total.

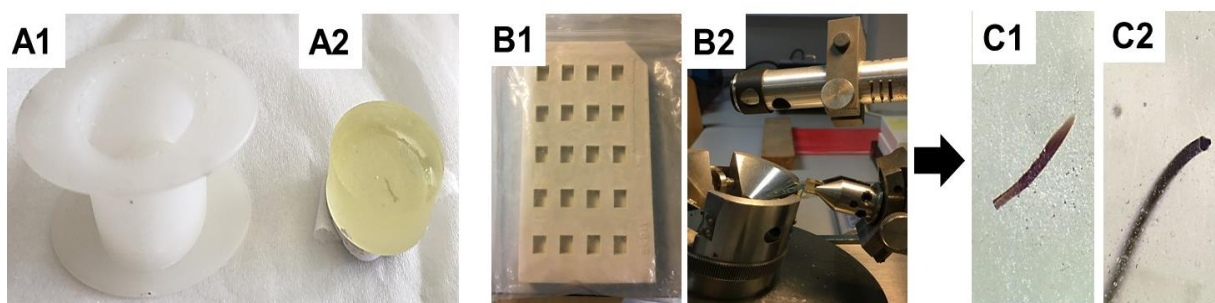




**Figura 39.** Curvas de calibração para bromo, cloro e iodo utilizando as gotas de queratina fortificadas. A1-C1 adição dos analitos na forma de brometo, cloreto e iodeto. A2-C2 adição dos analitos na forma de bromato, clorato e iodato.

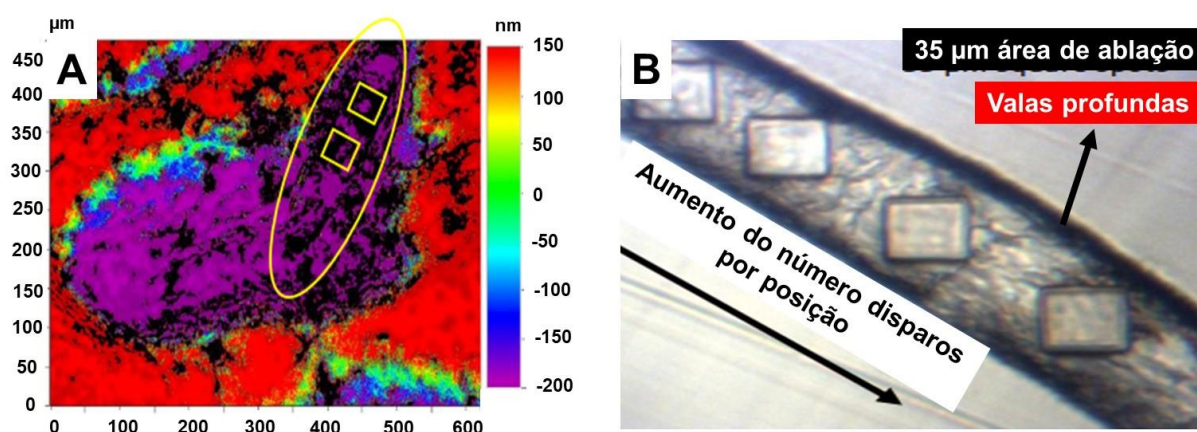
Como pode ser observado na Figura 39, as curvas de calibração para bromo e iodo utilizando a ablação total resultaram em uma linearidade razoável ( $R^2 > 0,98$ ) quando realizada a adição dos elementos na forma de  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$  e  $\text{IO}_3^-$ . Uma linearidade inferior ( $R^2 > 0,97$ ) foi obtida para cloro quando realizada a adição na forma de  $\text{ClO}_3^-$  e uma linearidade ruim ( $R^2 < 0,1$ ) quando realizada a adição na forma de  $\text{Cl}^-$ . Provavelmente, perdas dos elementos podem estar ocorrendo durante a etapa de secagem da gota mesmo a temperatura ambiente. As perdas nos elementos poderiam ser confirmadas através da análise da gota ou dos fios de cabelo fortificados com halogênios. Entretanto, a concentração absoluta deve ser relacionada com a concentração do analito na amostra e, para isso, a quantidade de material removido durante a ablação do cabelo deve ser estabelecida.

Para avaliar a quantidade de material removida durante a ablação do cabelo, foi feita duas avaliações: 1) o cabelo foi embebido na resina epóxi na seção transversal e longitudinal com o molde apresentado na Figura 40 A1 e, após a cura, o material foi polido em equipamento de polir para a obtenção de uma superfície plana ou 2) o cabelo foi embebido na resina epóxi na seção transversal e longitudinal com o molde apresentado na Figura 40 B1 e cortado em finas seções com um piramitome equipado com faca de vidro ideal para o corte de amostras rígidas apresentado na Figura 40 B2 com o intuito de obter uma superfície plana. Posteriormente, foi realizada a ablação do cabelo com diâmetro do *spot* de 35  $\mu\text{m}$  e aumentos gradativos de disparos por posição e a superfície do material foi analisada por perfilometria óptica. Na Figura 40 é demonstrado um resumo dos procedimentos realizados.



**Figura 40.** Experimentos para avaliar a quantidade de material removido durante a ablação do cabelo. A1 e B1 moldes utilizados para embeber o cabelo em resina epóxi, A2 cabelo embebido em resina epóxi polida e B2) cortada em piramitome com faca de vidro. Cabelo embebido em resina epóxi na seção C1) longitudinal e C2) transversal.

Muitas técnicas de perfilometria óptica exigem que a superfície analisada seja lisa e permita uma boa focalização para a aquisição dos dados. Na Figura 41 são apresentados os resultados para a análise da superfície da resina epóxi com cabelo embebido polida em equipamento de polir (Figura 41 A) ou cortada em piramitome com faca de vidro (Figura 41 B) e analisadas por perfilometria óptica.



**Figura 41.** A) mapa de superfície 2D da seção longitudinal do fio de cabelo embebido em resina epóxi destacado em amarelo. B) Aspecto microscópico da seção longitudinal (10 µm de espessura) do fio de cabelo embebido em resina epóxi cortada com piramitome e faca de vidro. Diâmetro do *spot* de 35 µm e aumentos gradativos de disparos por posição ao longo do fio.

Como pode ser observado na Figura 41 A, a superfície polida apresentou-se bastante áspera o que impossibilitou a aquisição de dados confiáveis - as irregularidades da superfície codificadas por cores indicam as zonas pretas fora da faixa vertical. Não obstante, apesar da obtenção de seções extremamente lisas e planas (10 µm) da resina epóxi cortada por piramitome equipado com faca de vidro, a fraca interação do cabelo com a resina epóxi utilizada durante essas avaliações também impossibilitou a aquisição de dados confiáveis. Como pode ser observado na Figura 41 B, valas profundas ao redor da amostra comprometeram a caracterização do poço de ablação através da análise da superfície por perfilometria óptica. Apesar de comumente utilizada para incorporar diferentes materiais, caracterizada por boa aderência e propriedades mecânicas, a resina utilizada mostrou uma baixa aderência para o cabelo, provavelmente relacionada à camada lipídica externa da amostra.

Nesse sentido, até o momento, a caracterização da profundidade do poço de ablação durante a análise do cabelo ainda é desconhecida e outras alternativas devem ser investigadas. A ablação total do cabelo poderia ser uma delas para comparação dos resultados, mas acarretaria em uma baixa frequência de análise e levaria uma quantidade significativa de material para o sistema podendo até mesmo comprometer a operação do equipamento. A correlação da concentração do enxofre nas gotas de queratina e no cabelo com a concentração de bromo, cloro e iodo no cabelo pode ser outra possibilidade a ser avaliada. Vale mencionar que essas avaliações não foram realizadas tendo em vista o término do período de doutorado sanduíche. Entretanto, a utilização dos fios de cabelo enriquecidos e analisados por ICP-MS após o preparo das amostras por MIC, foram utilizados como estratégia de calibração para determinação e distribuição de bromo e iodo em cabelo por LA-ICP-MS.

#### 5.3.1.1.3 Determinação e distribuição de bromo e iodo em cabelo por LA-ICP-MS

As condições de ablação previamente otimizadas e os fios de cabelo fortificados com halogênios como estratégia de calibração foram utilizadas para a determinação de bromo e iodo em cabelo. Inicialmente, para a comparação dos resultados, quatro fios de cabelo foram analisados por ICP-MS após a digestão das amostras por MIC e por LA-ICP-MS. Como pode ser observado na Tabela 20, a concentração de bromo e iodo não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) utilizando ambas as ferramentas analíticas. Entretanto, vale mencionar que o CV para os analitos obtido por LA-ICP-MS foi bastante superior quando comparado ao obtido por ICP-MS após a digestão das amostras por MIC. O CRM NCS DC73347a de cabelo não foi analisado por LA-ICP-MS por possuir características físicas diferentes do fio. A ablação desse material poderia causar também interferência física no tubo de transporte de aerossol.

**Tabela 20.** Concentrações de bromo e iodo em cabelo por ICP-MS após a MIC e LA-ICP-MS ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=5$ ).

Amostra	Br	I	Br	I
	MIC+ICP-MS		LA-ICP-MS	
CF1	1,81 $\pm$ 0,04	6,41 $\pm$ 0,41	1,79 $\pm$ 0,49	5,16 $\pm$ 1,06
CF2	1,34 $\pm$ 0,14	7,62 $\pm$ 0,73	1,53 $\pm$ 0,63	6,71 $\pm$ 1,78
CF3	1,20 $\pm$ 0,05	3,98 $\pm$ 0,19	1,29 $\pm$ 0,33	3,71 $\pm$ 0,24
CF4	1,31 $\pm$ 0,07	2,98 $\pm$ 0,30	1,33 $\pm$ 0,43	3,77 $\pm$ 0,44
CRM NCS DC73347a	1,13 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,04	-	-

Na Tabela 21, são apresentados os resultados para as 23 amostras analisadas por LA-ICP-MS. A concentração de bromo e iodo variou em uma ampla faixa nas amostras analisadas. Vale destacar que os voluntários sob a administração de hormônios tireoidianos sintéticos apresentaram maior concentração de iodo no fio de cabelo (variando de 2,87 a 24,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) quando comparado com os demais voluntários. Entretanto, é válido destacar que a concentração de iodo, assim como a concentração do bromo, pode estar relacionada a vários efeitos, tais como hábitos, exposição ambiental, condição do organismo e etc. O estado clínico dos voluntários não foi avaliado neste estudo e maiores estudos nesse sentido devem ser realizados. Os métodos de análise otimizados e propostos durante esta tese abrem portas para esse tipo de avaliação.

**Tabela 21.** Concentrações de bromo e iodo em cabelo: média de três fios de cabelo para cada voluntário e três linhas de ablação em diferentes posições. Determinação por LA-ICP-MS ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n=5$ ).

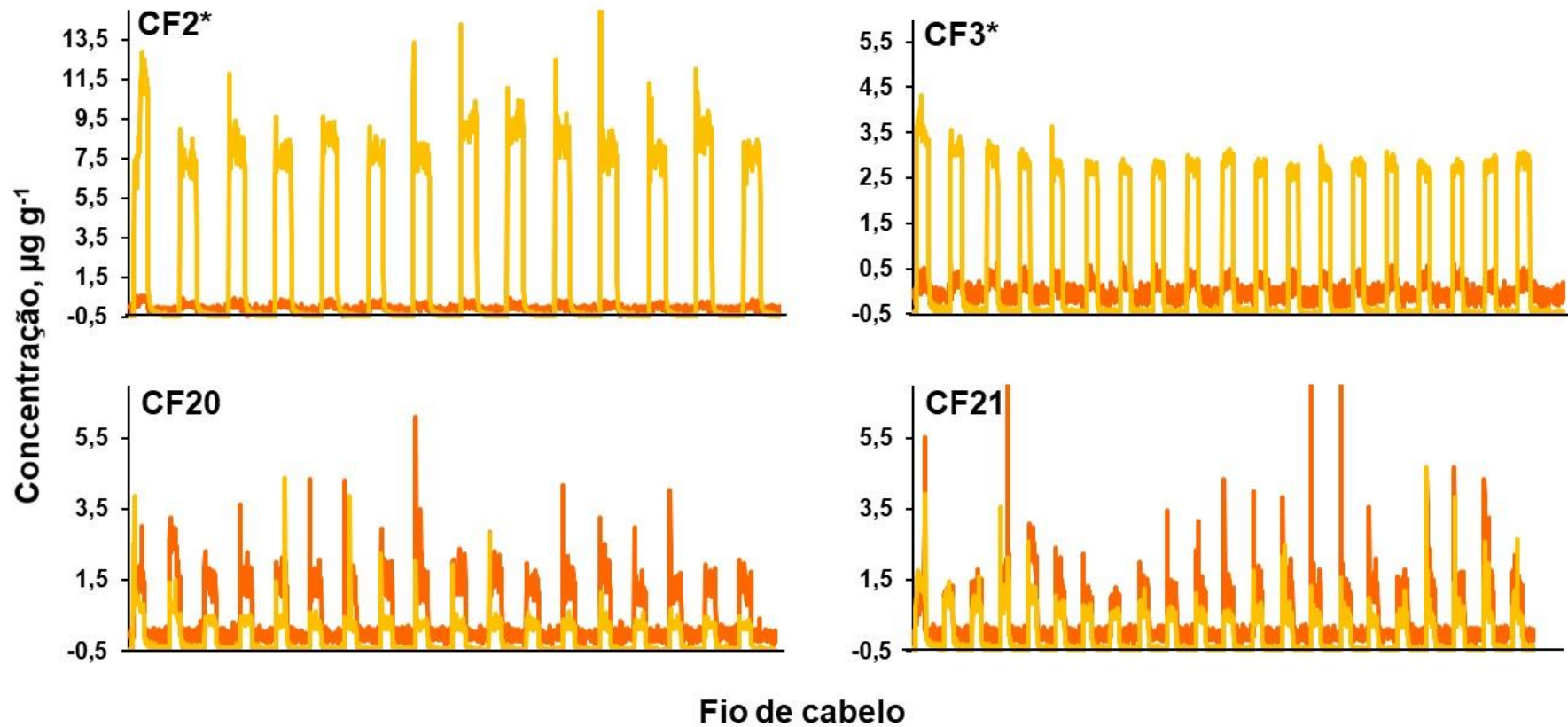
<b>Amostras</b>	<b>Br</b>	<b>I</b>
CF1*	1,79 $\pm$ 0,49	5,16 $\pm$ 1,06
CF2*	1,53 $\pm$ 0,63	6,71 $\pm$ 1,78
CF3*	1,29 $\pm$ 0,33	3,71 $\pm$ 0,24
CF4*	1,33 $\pm$ 0,43	3,77 $\pm$ 0,44
CF5*	< 0,5 <sup>‡</sup>	2,87 $\pm$ 1,35
CF6*	< 0,5 <sup>‡</sup>	24,1 $\pm$ 5,71
CF7	0,91 $\pm$ 0,19	1,42 $\pm$ 0,07
CF8	0,85 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,19
CF9	0,97 $\pm$ 0,21	1,46 $\pm$ 0,13
CF10	0,77 $\pm$ 0,15	1,47 $\pm$ 0,63
CF11	< 0,5 <sup>‡</sup>	0,59 $\pm$ 0,38
CF12	0,83 $\pm$ 0,16	1,43 $\pm$ 0,18
CF13	0,96 $\pm$ 0,18	1,12 $\pm$ 0,47
CF14	0,42 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,11
CF15	0,40 $\pm$ 0,22	1,57 $\pm$ 0,05
CF16	1,06 $\pm$ 0,34	1,90 $\pm$ 0,29
CF17	0,78 $\pm$ 0,07	1,81 $\pm$ 0,36
CF18	< 0,5 <sup>‡</sup>	0,40 $\pm$ 0,13
CF19	< 0,5 <sup>‡</sup>	0,40 $\pm$ 0,22
CF20	1,17 $\pm$ 0,23	0,46 $\pm$ 0,05
CF21	1,17 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,31
CF22	< 0,5 <sup>‡</sup>	1,65 $\pm$ 0,26
CF23	< 0,5 <sup>‡</sup>	0,40 $\pm$ 0,22

\* Voluntários sob a administração de hormônios tireoidianos sintéticos e <sup>‡</sup>LOD.

LOQ: 1,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  para bromo e 0,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  para iodo.

A distribuição de bromo e iodo em regiões do cabelo de quatro voluntários foi realizada com o intuito de demonstrar a versatilidade da LA-ICP-MS para esse tipo de avaliação. Para isso, foram analisados cerca de 2 cm de fio, com ablação de linhas de 650  $\mu\text{m}$ . Entretanto, vale mencionar que não havia informações em relação às

regiões específicas do cabelo devido a amostragem feita. Como pode ser observado na Figura 42, a concentração desses elementos permaneceu estável ao longo das regiões do cabelo. Vale mencionar que a determinação e a distribuição de bromo e iodo em regiões do cabelo pode auxiliar a esclarecer fatores relacionados ao metabolismo desses elementos no organismo que, ainda hoje, segue uma incógnita para a comunidade científica, do acompanhamento do quadro evolutivo de doenças como a fibrose cística e do consumo de alguns medicamentos como os utilizados para o tratamento das disfunções da glândula tireoide.



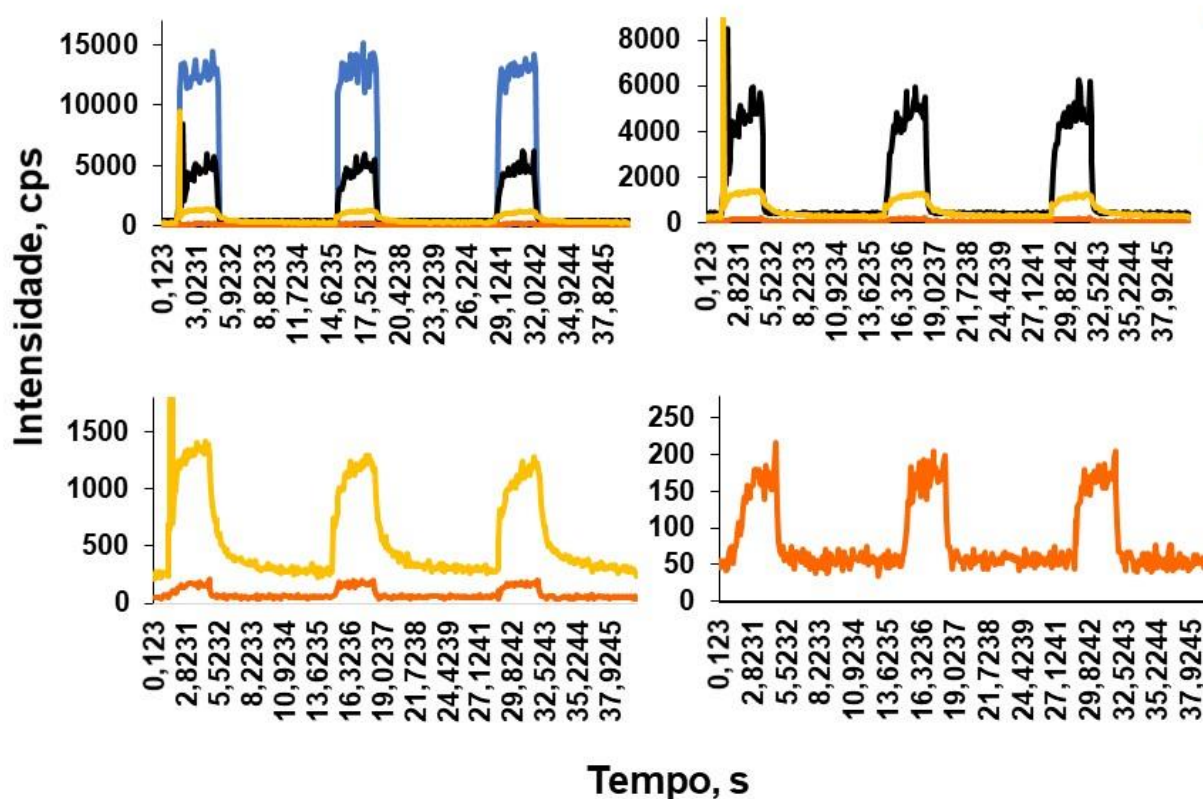
**\* Voluntários sob a administração de hormônios tireoidianos sintéticos**

**Figura 42.** Distribuição de (—) <sup>79</sup>bromo e (—) <sup>127</sup>iodo em regiões do cabelo.



### 5.3.1.2 Determinação de bromo, cloro, iodo e enxofre em unha

Uma amostra de concentração conhecida foi utilizada para avaliar a adequabilidade da LA-ICP-MS para determinar e observar a distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em unha. Com esse intuito, foi realizada apenas a determinação qualitativa utilizando as condições previamente otimizadas para o cabelo. Vale mencionar que, assim como para o cabelo, não havia informações em relação às regiões específicas da unha devido a amostragem feita. A intensidade do sinal para os analitos é apresentada na Figura 43.



**Figura 43.** Intensidade de sinal para os isótopos (—)  $^{79}\text{bromo}$ , (—)  $^{35}\text{cloro}$ , (—)  $^{127}\text{iodo}$  e (—)  $^{34}\text{enxofre}$  por LA-ICP-MS (35  $\mu\text{m}$  de diâmetro do *spot* e 1,50  $\text{J cm}^{-2}$  de densidade de energia). Unha com 1,00  $\mu\text{g g}^{-1}$  de bromo, 700  $\mu\text{g g}^{-1}$  de cloro; 0,27  $\mu\text{g g}^{-1}$  de iodo e 25,0  $\text{mg g}^{-1}$  de enxofre - amostra U1.

Como pode ser observado na Figura 43, a intensidade de sinal para os isótopos  $^{79}\text{bromo}$ ,  $^{81}\text{bromo}$ ,  $^{35}\text{cloro}$ ,  $^{37}\text{cloro}$ ,  $^{127}\text{iodo}$  e  $^{34}\text{enxofre}$  por LA-ICP-MS resultou em uma adequada razão sinal/ruído, considerando a faixa de concentração na amostra

selecionada para essa avaliação. Nesse sentido, assim como para cabelo, a LA-ICP-MS pode ser uma alternativa para determinação e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em unha. As estratégias de calibração, como as baseadas na preparação de unhas fortificadas e analisada por ICP-MS após a digestão por MIC ou na preparação de gotas de queratina fortificadas, podem ser ferramentas para a análise de unha por LA-ICP-MS. Apesar do cabelo apresentar uma composição química majoritária muito semelhante à da unha, a interação do *laser* com cada uma das amostras é distinta. Isso deve ser considerado durante a etapa de calibração para evitar possíveis erros durante a obtenção dos resultados. As estratégias de calibração não foram avaliadas para a análise da unha tendo em vista o término do período de doutorado sanduíche.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos durante o desenvolvimento desse trabalho, foi possível estabelecer a MIC como um método de preparo de amostras que possibilitou a determinação de halogênios e de enxofre em cabelo e unha por várias técnicas de determinação (IC-CD-MS, ICP-MS, ICP-OES e ISE) com valores de LOQ muito baixos. Ao contrário dos métodos convencionais de digestão e extração avaliados neste trabalho, a MIC resultou em uma solução totalmente compatível com as várias técnicas de determinação. A baixa concentração de carbono dissolvido para a digestão de cabelo (300 mg) e unha (100 mg) e a utilização de soluções alcalinas diluídas para absorver os elementos ( $\text{NH}_4\text{OH}$  100  $\text{mmol L}^{-1}$  para a digestão de cabelo e  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  para a digestão de unha) eliminou etapas adicionais previamente à determinação que são comumente utilizadas buscando a compatibilidade da solução final com a técnica de determinação e a redução e interferências. O LOQ obtido para os elementos foi considerado adequado mesmo utilizando pequenas massas de amostra tendo em vista que os valores de branco foram negligenciáveis e fatores de diluição não foram necessários. Essa vantagem é extremamente importante para amostras que possuem uma disponibilidade relativamente baixa para a realização da análise, como é o caso do cabelo e da unha. A MIC associada com as várias técnicas de determinação apresenta relativa elevada frequência de análise e baixa geração de resíduos.

Algumas avaliações sistemáticas estabeleceram condições ótimas em relação às ferramentas analíticas utilizadas nesta tese. A determinação de halogênios e enxofre em uma única corrida cromatográfica utilizando a IC-CD-MS foi proposta pela primeira vez para uma amostra sólida provinda da realização de uma etapa de preparo de amostras. Alguns parâmetros da técnica como eluição por gradiente, voltagem do cone, voltagem da agulha e temperatura da sonda foram otimizados e propostos na literatura pela primeira vez. A determinação adicional de bromo e iodo utilizando a MS acoplada à IC-CD é uma alternativa bastante interessante e promissora pois oferece vantagens relacionadas à seletividade, sensibilidade e custo de manutenção quando comparada com técnicas espectrométricas baseadas em plasma. A demanda mundial em relação à determinação de flúor em amostras biológicas em virtude da relevância e dos desafios analíticos associados a esse tema foi suprida com as ferramentas analíticas propostas durante esta tese.

O efeito de memória causado pelo meio ácido e o efeito do carbono dissolvido durante a determinação de bromo e iodo por ICP-MS foram avaliados. Alguns parâmetros e limitações em relação à determinação de cloro e enxofre por ICP-OES e de flúor por ISE também foram avaliados. A LA-ICP-MS foi também proposta para a determinação e distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha. A utilização dos fios de cabelo fortificados com halogênios analisados por ICP-MS após a digestão da amostra por MIC foi uma estratégia eficiente para a calibração para a determinação de bromo e iodo em cabelo por LA-ICP-MS. Algumas condições instrumentais adequadas foram alcançadas para avaliar a concentração e a distribuição de bromo, cloro, iodo e enxofre em cabelo e unha por LA-ICP-MS.

Em relação à aplicabilidade dos métodos propostos, as variações de concentração nas amostras de cabelo e unha podem estar associadas aos hábitos, exposição ambiental e condições de cada organismo. Existe uma carência de informações e de estudos voltados para halogênios e enxofre em amostras biológicas. Os desafios analíticos associados a esse tema limitam as avaliações para esses elementos nos campos nutricional, ambiental, medicinal e dentre outros. A estratégia analítica proposta no presente trabalho pode ser uma eficiente ferramenta para a determinação de halogênios e enxofre em cabelos e unha nas mais variadas áreas do conhecimento, podendo auxiliar a esclarecer fatores relacionados ao metabolismo no organismo, ainda hoje uma incógnita para a comunidade científica. Os métodos desenvolvidos podem ser utilizados para o acompanhamento do quadro evolutivo de doenças, como fibrose cística, e o consumo de alguns medicamentos, como os utilizados para o tratamento das disfunções da glândula tireoide.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. R. **Aplicação do método de análise por ativação com nêutrons à determinação de elementos traço em unha humana**. 2001. 131 f. Dissertação (Mestre em Ciências em Tecnologia Nuclear) - Programa de Tecnologia Nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ARAÚJO, J. A.; DA SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, C. B.; DE OLIVEIRA, E. R. A. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 2, p. 53-60, 2008.

ARNOLD, W.; SACHS, H. Hair analysis for medicaments — the best proof for a drug career. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 348, p. 484-489, 1994.

BANK H. L.; ROBSON, J; BIGEOLW, J. B.; MORRISON, J.; SPELL, L. H.; KANTOR, R. Preparation of fingernails for trace elements analysis. **Clinical Chimica Acta**, v. 116, p. 179-190, 1981.

BARBOSA JUNIOR, F.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F.; PARSONS P. J. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 1669-1674, 2005.

BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 4547-4566, 2016.

BARRON, L.; GILCHRIST, E. Ion chromatography-mass spectrometry: A review of recent technologies and applications in forensic and environmental explosives analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 806, p. 27-54, 2014.

BARRON, L.; NESTERENKO, P.N.; PAULL, B. Use of temperature programming to improve resolution of inorganic anions, haloacetic acids and oxyhalides in drinking water by suppressed ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, p. 207-215, 2005.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; NUNES, J. A.; TORMEN, L.; CURTIUS A. J.; BARBOSA JUNIOR, F. Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS. **Talanta**, v. 76, p. 575–579, 2008.

BENCZE, K. What contribution can be made to biological monitoring by hair analysis? **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 337, p. 867-876, 1990.

BLAKE, J. S.; MUNOZ, K.; VOLPE, S. **Nutrition: from science to you**. 1. Ed., EUA: Benjamin Cummings, 2009.

BOZSAI, G. Quality control and assurance in hair analysis. **Microchemical Journal**, v. 46, p. 159-166, 1992.

BREITBACH, Z. S.; BERTHOD, A.; HUANG, K.; ARMSTRONG, D. W. Mass spectrometric detection of trace anions: The evolution of paired- ion electrospray ionization (PIESI). **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, p. 201-218, 2016.

BU, X.; WANG, T.; HALL, G. Determination of halogens in organic compounds by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, p. 1443-1451, 2003.

CARMO, I. **Equilíbrio vital: vitaminas e minerais**. Lisboa: Publicações D. Quixote, 2011.

CAROLI, S.; SENOFONTE, O.; VIOLANTE, N.; FORNARELLI, L.; POWAR, A.; Assessment of reference values for elements in hair of urban normal subjects. **Microchemical Journal**, v. 46, p. 174-183. 1992.

CARRENO, N. L. V.; DEON, V. G.; SILVA, R. M.; SANTANA, L. R.; PEREIRA, R. M.; ORLANDI, M. O.; VENTURA, W. M.; DIAS, A.; TAYLOR, J. G.; FAJARDO, H. V.; MESKO, M. F. Feasible and Clean Solid-Phase Synthesis of LiNbO by Microwave-Induced Combustion and Its Application as Catalyst for Low-Temperature Aniline Oxidation. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, p. 1680-1691, 2018.

CHAPMAN, A. L.; FEGLEYE, B.; CHO, C. H. T. X ray microanalysis of chloride in nails from cystic fibrosis and control patients. **European Journal of Respiratory Diseases**, v. 66, p. 218-233, 1985.

CHATT, A.; KATZ, S. A. **Hair analysis, applications in the biomedical and environmental sciences**. New York: VCH Publishers, 1988.

CHAUDHARY, K.; EHMANN, W. D.; RENGAN, K.; MARKESBERRY, W. R. Trace element correlations with age and sex in human fingernails. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 195, p. 51-56, 1995

CHEAJESADAGUL, P.; Wananukul, W.; Siripinyanond, A.; Shiowatana, J. Metal doped keratin film standard for LA-ICP-MS determination of lead in hair samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, p. 493- 498, 2011.

CHEN, Z. F.; DARVELL, B. W.; LEUNG, V. W. H. Human salivary anionic analysis using ion chromatography. **Archives of Oral Biology**, v. 49, p. 863-869, 2004.

CHENG, T. P.; MORRIS, J. S.; KOIRTYOHANN, S. R.; SPATE, V. L.; BASKETT, C. K. The analysis of human nails for 24 elements via Ko and cyclic neutron activation analysis. **Instruments and Methods in Physics Research**, v. 353, p. 457-460, 1994.

CHIKAWA, J. -I.; YAMADA, K.; AKIMOTO, T.; SAKURAI, H.; YASUI, H.; YAMAMOTO, H.; OKABE, S.; EBARA, M. The universal concentrations and cancer signs of trace elements in hair observed by X-ray fluorescence analysis. **Journal of X-Ray Science and Technology**, v. 15, p. 109–129, 2007.

COELHO JUNIOR, G. S.; PEREIRA, R. M.; HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G.; COSTA, V. C.; PEREIRA, C. M. P.; MESKO, M. F. Determination of Cl and S in edible seaweed by ion chromatography after decomposition by microwave-induced combustion. **Revista Virtual De Química**, v. 9, p. 492-501, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

COMBS, D. K. Hair analysis as an indicator of mineral status of livestock. **Journal of Animal Science**, v. 65, p. 1753-1758, 1987.

COSTA, V. C.; PICOLOTO, R. S.; HARTWIG, C. A.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 7957-7964, 2015.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4 Ed., Barueri: Manole, 2012.

CUENCA, R. E.; PORIES, W. J.; BRAY, J. Bromine levels in human serum, urine, hair. **Biological Trace Element Research**, v. 16, p. 151-154, 1988.

DEMKOWSKA, I.; POLKOWSKA, Ż.; NAMIEŚNIK, J. Application of ion chromatography for the determination of inorganic ions, especially thiocyanates in human saliva samples as biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 419-426, 2008.

DEVOUGE-BOYER, C.; MOUDA, S.; GUEGUEN, O.; MARCOTTE, S. Determination of iodine in polyamide by inductively-coupled plasma/mass spectrometry. **Talanta**, v. 189, p. 568-572, 2018.

DEVER, M.; BRESEE, R. R. Enriched copper isotope tracer for dietary copper incorporation into hair using neutron activation analysis in conjunction with direct-current argon plasma spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 225, p. 185-192.1989.

DIMESKI, G.; BADRICK, T.; JOHN, A. S. Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences--a review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 309-317, 2010.

DIONEX, THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Determination of Common Anions and Organic Acids Using Ion Chromatography-Mass Spectrometry**. Application Note 243. 4 p. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-243-ICAnions-Organic-Acids-LPN2374-EN.pdf>. Acessado em 22 de janeiro de 2020.

DRESSLER, V. L.; POZEBON, D.; MESKO, M. F.; MATUSCH, A.; KUMTABTIM, U.; WU, B.; BECKER, J. S. Biomonitoring of essential and toxic elements in single hair using on-line solution-based calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, p. 1770-1777, 2010.



EKAMBARAM, M.; ITTHAGARUN, A.; KING, N. M. Ingestion of fluoride from dentifrices by young children and fluorosis of the teeth - a literature review. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 36. p. 111-121, 2011.

ERHART, E. A. **Elementos de anatomia humana**. São Paulo: Atheneu, 1976.

EURACHEM, **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 2nd ed., ISBN 978-91-87461-59-0, 2014, <http://www.eurachem.org>. Acessado em 22 de janeiro de 2020.

EVANS, R. B. Chlorine: state of the art. **Lung**, v. 183, p.151–167, 2005.

FAGHIHIAN, H.; RAHBARNIA, H. Determination of trace elements in hair of some local population in Iran by instrumental neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 251, p. 427–430, 2002.

FAO/WHO - **Expert consultation on human vitamin and mineral requirements**. 2. Ed., Geneva: World Health Organization & Rome; Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004.

FENG, S.; POW, E. H.; LAM, O. L.; MAI, S.; WANG, H. Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography. **Clinica Chimica Acta**, v. 438, p. 231-235, 2015.

FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T.; NETO, G. O. Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química Nova**, v. 24, p. 120-130, 2001.

FLORES, E. M. M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis**, 1 Ed., Amsterdam: Elsevier, 2014.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels – a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B**, v.62, p. 1051-1064, 2007.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 3525-3529, 2004.

FLORES, E. M. M.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KRUG, F. J. **Digestão de materiais orgânicos por combustão**. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de preparo de amostrass para análise elementar. 2 Ed. São Paulo: *EditSBQ*, p. 387-451, 2016.

FLORES, E. M. M.; MELLO, P. A.; KRZYZANIAK, S. R.; CAUDURO, V.H.; PICOLOTO, R. S. Challenges and Trends for Halogen Determination by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Review. **Rapid Communication in mass spectrometry**, in press, 2020.

FUJITA, M.; TAKEDA, Y.; TERAQ, T.; HOSHINO, O.; UKITA T. Microdetermination of mercury by the oxygen bomb combustion method. **Analytical Chemistry**, v. 40, p. 2042-2043, 1968

GARLAND, M.; MORRIS, J. S.; ROSNER, B. A.; STAMPFER, M.; SPATE, V. L.; BASKETT, C. J.; WILLETT, W. C.; HUNTER, D. J. Toenail trace element levels as biomarkers: reproducibility over a 6-year period. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 2, p. 493-497, 1993.

GREER, M. A.; GOODMAN, G.; PLEUS, R. C.; GREER S.E. Health effects assessment for environmental perchlorate contamination: the dose response for inhibition of thyroidal radioiodine uptake in humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 927-937, 2002.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGT, M.; VANHAECKE, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 86, p. 42-49, 2013.

GU, W., ZHOU, C. Y., WONG, M. K., GAN L. M. Orthogonal array design (OAD) for the optimization of mercury extraction from soils by dilute acid with microwave heating. **Talanta**, v. 46, p. 1019-1029, 1998.

GUARDA, A.; ARAMENDÍA, M.; ANDRÉS, I.; GARCÍA-RUIZ, E.; NASCIMENTO, P.C.; RESANO, M. Determination of chlorine via the CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. **Talanta**, v. 162, p. 354–361, 2017.

HAC, E.; CZARNOWSKI, W.; GOS, T.; KRECHNIAK, J. Lead and fluoride content in human bone and hair in the Gdafisk region. **The Science of the Total Environment**, v. 206, p. 249-254, 1997.

HANNA, **Manual Eletrodo de Íon Seletivo de Fluoreto – HI4010/HI4110**. <https://hannainst.com.br/productos/electrodos-e-sondas/electrodo-ise-combinado-para-fluoreto/>. Acessado em 22, 01, 2020.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**, 6 Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2006.

HE, X.; MEI, Y.; WANG, Y.; SUN, W.; SHEN, M. Determination of inorganic anions in the whole blood by ion chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 163, p. 58-63, 2019.

HE, X.; MEI, Y.; WANG, Y.; SUN, W.; SHEN, M. Determination of inorganic anions in the whole blood by ion chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 163, p. 58-63, 2019.

HEDMAN, J.; SJÖMAN, R.; SJÖSTRÖM, I.; TWETMAN, S. Fluoride concentration in saliva after consumption of a dinner meal prepared with fluoridated salt. **Caries Research**, v. 40, p. 158–162, 2006.

HOU, X.; CHAI, C.; QIAN, Q.; LI, C.; CHEN, Q. Determination of bromine and iodine in normal tissues from Beijing healthy adults. **Biological Trace Element Research**, v. 56, p. 225-230, 1997.

IAEA, International Atomic Energy Agency. **Health-related monitoring of trace element pollutants using nuclear techniques**. Vienna: IAEA; 1985. 224 p. [https://guides.lib.monash.edu/ld.php?content\\_id=14570618](https://guides.lib.monash.edu/ld.php?content_id=14570618). Acessado em 22 de janeiro de 2020.

IARC, International Agency For Research On Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some chemicals that cause tumors of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances: potassium bromate (group 2B)**, Geneva: World Health Organization, 1999.

IYENGAR, V.; WOITTIEZ J. Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 474-481, 1988.

JAMARI, N. L. J.; DOHMANN, J. F.; RAAB, A.; KRUPP, E. M.; FELDMANN, J. Novel non-target analysis of fluorine compounds using ICPMS/MS and HPLC-ICPMS/MS. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, p. 942-950, 2017.

JUGAN, M. L.; OZIOL, L.; BIMBOT, M.; HUTEAU, V.; TAMISIER-KAROLAK, S.; BLONDEAU, J. P.; LÉVI, Y. In vitroassessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewatertreatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3579–3587, 2009.

KLEVAY, M. L.; BISTRAN, B. R.; FLEMING, C. R. Hair analysis in clinical and experimental medicine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 233-236, 1987.

KNAPP, G.; MAICHIN, B.; FECHER, P.; HASSE, S.; SCHRAMEL, P. Iodine determination in biological materials - options for sample preparation and final determination. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 362, p. 508-513, 1998.

KOHLMEIER, M. **Nutrient Metabolism**. Amsterdam: Academic press. 2003.

KONOL, K.; YOSHIDA, Y.; WATANABEL, M.; WATANABEL, H.; INOUE, S.; MURAOL, M.; DOI, K. Elemental analysis of hair among hydrofluoric acid exposed workers. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 62, p. 85-88, 1990.

KOVÁCSA, M.; MAGARINI, R.; HALMOS, P. Automated indirect fluoride determination by ICP-OES using discontinuous flow analysis. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 91, p. 1217-1227, 2009.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostrass; fundamentos sobre preparo de amostrass orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 2 Ed., São Paulo: *EditSBQ*, 2016.

LEVINE, K. E.; ESSADER, A. S.; WEBER, F. X.; PERLMUTTER, J. M.; MILSTEIN, L. S.; FERNANDO, R. A.; LEVINE, M. A.; COLLINS, B. J.; ADAMS, J. B.; GROHSE, P. M. Determination of iodine in low mass human hair samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, p. 401-404, 2007.

MCCALL, A. S.; CUMMINGS, C. F.; BHAVE, G.; VANACORE, R.; PAGE-MCCAW, A.; HUDSON, B. G. Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture, **Cell**, v.157, p.1380-1392, 2014.

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; DUARTE, F. A.; BIZZI, C. A.; DIEHL, L. O.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7615-7642, 2013.

MENDES, A. L. G.; NASCIMENTO, M. S.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; MELLO, P. A. A sample preparation method for fluoride detection by potentiometry with ion-selective electrode in medicinal plants. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 231, p. 109459, 2020.

MENEZES, M. Â. B. C.; MAIA, E. C. P.; ALBINATI, C. C. B.; SABINO, C. V. S.; BATISTA, J. R. How suitable are scalp hair and toenail as biomonitors?. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 259, p. 81-86, 2004.

MESKO, M. F. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímico e alimentos após combustão iniciada por microondas**. 2008. 156 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MESKO, M. F.; CRIZEL, M. G.; NOVO, D. L. R.; RONDAN, F. S.; HARTWIG, C. A.; BIZZI, C. A. New and Feasible Method for Total Phosphorus and Sulfur Determination in Dietary Supplements by Ion Chromatography. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 2076-2083, 2020.

MESKO, M. F.; PEREIRA, R. M.; SCAGLIONI, P. T.; NOVO, D. L. R. Single analysis of human hair for determining halogens and sulfur after sample preparation based on combustion reaction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 4873-4881, 2019.

MESKO, M. F.; COSTA, V. C. ; PICOLOTO, R. S. ; C. A. BIZZI ; MELLO, P. A. Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: challenges and trends of sample preparation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v 31, p. 1243-1261, 2016.

MICHALKE, B.; SCHRAMEL, P.; WITTE, H. Method Developments for Iodine Speciation by Reversed-Phase Liquid Chromatography–ICP–Mass Spectrometry. **Biological Trace Element Research**, v. 78 p. 67-79, 2000.

MOMCILOVIC, B.; PREJAC, J.; VISNJEVIC, V.; SKALNAYA, M.; GMIMICA, N.; DRMIC, S.; SKALNY, A. V. Retraction of hair iodine for human iodine status assessment. **Thyroid**, v. 24, p. 1018-1026, 2014.

MONTASER, A. **Inductively coupled plasma mass spectrometry**. 2 Ed., New York: Wiley-VCH, 1998.

MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; MESKO, M. F.; DRESSLER, V. L.; PANIZ, J. N. G.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Evaluation of sample preparation methods for elastomers digestion for further halogens determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 563-570, 2010.

MORI, M.; YAMAMOTO, T.; KASEDA, M.; YAMADA, S.; ITABASHI, H. Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of background electrolyte. **Journal of Chromatography B**, v. 887– 888, p. 1– 7, 2012.

NOBREGA, J. A.; GELINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES R. M. Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry. **Journal Analytical Atomic Spectrometry** v. 12, p. 1243-1246, 1997.

NOBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Review: sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 465-495, 2006.

NÖLTE, J. **ICP Emission Spectrometry: A practical guide**, Weinheim: Willey-VCH, 2003.

NOVO, D. L. R.; HENN, A. S.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Feasibility of microwave induced combustion combined with inductively coupled plasma mass spectrometry for bromine and iodine determination in human nail. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, in press, 2019b.

NOVO, D. L. R.; MELLO, J. E.; RONDAN, F. S.; HENN, A. S.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F. Bromine and iodine determination in human saliva: Challenges in the development of an accurate method. **Talanta**, v. 191, p. 415-421, 2019a.

NOVO, D. L. R.; PEREIRA, R. M.; COSTA, V. C.; HARTWIG, C. A.; MESKO, M. F. A novel and eco-friendly analytical method for phosphorus and sulfur determination in animal feed. **Food Chemistry**, v. 246, p. 422-427, 2018.

NOVO, D. L. R.; PEREIRA, R. M.; HENN, A. S.; COSTA, V. C.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Are there feasible strategies for determining bromine and iodine in human hair using interference-free plasma based-techniques?. **Analytica Chimica Acta**, v. 1060, p. 45-52, 2019c.

OLGUIM, M. T., JMENEZ-REYES, M., PENA-AGUILAR, M. T.; SANCHEZAGUIRRE, F. J. Sodium and chlorine levels in hair and nails of healthy and cystic fibrosis children. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 181, p. 33-41, 1994.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, P. J.; MEYERS, D. L. **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. 3 Ed., Washington: The National Academies Press – Institute of Medicine of the National Academies, 2006.

OZBEK, N.; BAYSAL, A. Determination of sulfur in human hair using high resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and its correlation with total protein and albumin. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 130, p. 17–20, 2017.

PARK, Y. D.; JANG, J. H.; OH, Y. J.; KWON, H. J. Analyses of organic acids and inorganic anions and their relationship in human saliva before and after glucose intake. **Archives of Oral Biology**, v. 59, p. 1-11, 2014.

PARK, Y. D.; JANG, J. H.; OH, Y. J.; KWON, H. J. Analyses of organic acids and inorganic anions and their relationship in human saliva before and after glucose intake. **Archives of Oral Biology**, v. 59, p. 1-11, 2014.

PARSONS, P. J.; BARBOSA JUNIOR, F. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, p. 992–1003, 2007.

PASSWATER, R. A.; CRANTON, E. M.; **Trace elements, hair analysis and nutrition**, New Canaan: Keats Publishing Inc., 1983.

PEREIRA, J. S. F., ANTES, F. G., DIEHL, L. O., KNORR, C. L., MORTARI, S. R., DRESSLER, V. L., FLORES, E. M. M, Microwave-induced combustion of carbon nanotubes for further halogens determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 1268-1274, 2010.

PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; DUARTE, F. A.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, p. 249-252, 2008.

PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; MORAES, D. P.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 554-558, 2009.

PEREIRA, R. M. **Combustão iniciada por micro-ondas: um novo método para a volatilização de cloro e flúor em cimento**. 2014. 103f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2014.

POZEBON D.; DRESSLER V. L.; CURTIUS A. J. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Química Nova**, v. 22, p. 838-846, 1999.

POZEBON, D.; SCHEFFLER, G. L.; DRESSLER, V. L. Elemental hair analysis: A review of procedures and applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 992, p.1-23, 2017.

PREJACA, J.; VISNJEVIC, V.; DRMIC, S.; SKALNY, A. A.; MIMICA, N.; MOMCILOVIC, B. A novel concept to derive iodine status of human populations from frequency distribution properties of a hair iodine concentration. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, p. 205–211, 2014.



PRYSTUPA, J. Fluorine – a current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides. **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 21, p.103–170, 2011.

QIN, Z.; MCNEE, D.; GLEISNER, H.; RAAB, A.; KYEREMEH, K.; JASPARS, M.; KRUPP, E.; DENG, H.; FELDMANN, J. Fluorine Speciation Analysis Using Reverse Phase Liquid Chromatography Coupled Off-Line to Continuum Source Molecular Absorption Spectrometry (CS-MAS): Identification and Quantification of Novel Fluorinated Organic Compounds in Environmental and Biological Samples. **Analytical Chemistry**, v. 8414, p. 6213-6219, 2012.

REBACZ-MARON, E.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; KRZYWANIA, N.; CHLUBEK, D. The content of fluoride, calcium and magnesium in the hair of young men of the bantu language group from tanzania versus social conditioning. **Biological Trace Element Research**, v. 156, p. 91–95, 2013.

REN, H.; QIU, H.; LIANG, X.; WANG, X.; JIANG, S. Determination of inorganic anions in saliva by electroosmotic flowcontrolled counterflow isotachophoretic stacking underfield-amplified sample injection. **Journal of Chromatography B**, v. 935. p. 75– 79, 2013.

RICHARDSON, S. D.; POSTIGO, C. Drinking Water Disinfection By-products, in: BARCELÓ D. (Ed.) **Emerging Organic Contaminants and Human Health**, Berlin: Springer, 2012, pp. 93-137.

ROBBINS, C. R. **Chemical and physical behavior of human hair**, 3 Ed., Nova lorque: Springer-Verlag, 1994.

RODUSHKIN, I.; AXELSSON M. D. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part I. **Science of the Total Environment**, v. 250, p. 83-100, 2000b.

RODUSHKIN, I.; AXELSSON, M. D. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part III. Direct analysis by laser ablation. **The Science of the Total Environment**, v. 305, p. 23–39, 2003.

RODUSHKIN, I.; AXELSSON, M. D. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A

study of the inhabitants of northern Sweden. **The Science of the Total Environment**, v. 262, p. 21-36, 2000a.

RONDAN, F. S.; HARTWIG, C. A.; NOVO, D. L. R.; MORAES, D. P.; CRUZ, S. M.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F. Ultra-trace determination of bromine and iodine in rice by icp-ms after microwave-induced combustion. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 199-204, 2018.

ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1747-1752, 2010

SADIQ, R.; RODRIGUEZ, M.J. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: a review. **Science of The Total Environment**, v. 321. p. 21-46, 2004.

SALA, M.; SELIH, V. S.; VAN ELTEREN, J. T. Gelatin gels as multi-element calibration standards in LA-ICP-MS bioimaging: fabrication of homogeneous standards and microhomogeneity testing. **Analyst**, v. 142, p. 3356-3359, 2017.

SAMANIDOU, V. F.; ZACHARIS, C. K.; PAPADOYANNIS, I. N. Determination of fluoride ions by single column high pressure anion chromatography in dentifrice preparations and body fluids: saliva and blood serum. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, p. 803–818, 2002.

SANCHES, T. P. **Estudo sobre determinação de elementos químicos em unhas humanas pelo método de análise por ativação com nêutrons**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestre em Ciências em Tecnologia Nuclear) - Programa de Tecnologia Nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SAVINOV, S. S.; ANISIMOV, A. A.; DROBYSHEV, A. I. Problems and optimization of sampling, storage, and sample preparation in the determination of the trace element composition of human saliva. **Zhurnal Analiticheskoi Khimii**, v. 71, p. 1063–1068, 2016.

SEIDEL, S.; KREUTZER, R.; SMITH, D.; MCNEEL, S.; GILLISS, D. Assessment of commercial laboratories performing hair mineral analysis. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 67-72, 2001.

SEYFFERTH, A. L.; PARKER, D. R. Determination of Low Levels of Perchlorate in Lettuce and Spinach Using Ion Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry (IC-ESI-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2012-2017, 2006.

SKALNY, A. V.; KAMINSKAYA, G. A.; KREKESHEVA, T. I.; ABIKENOVA, S. K.; SKALNAYA, M. G.; BEREZKINA, E. S.; GRABEKLIS, A. R.; TINKOV, A. A. The level of toxic and essential trace elements in hair of petrochemical workers involved in different technological processes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 5576–5584, 2017.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**, 8 Ed., São Paulo: Thomson, 2006.

SPATE, V. L.; MORRIS, J. S.; CHICKOS, S.; BASKETT, C. K.; MASON, M. M.; CHENG, T. P.; REAMS, C. L.; WEST, C.; FURNEE, C.; WILLETT, W. HOM-ROSS P. Determination of iodine in human nails via epithermal neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 195, p. 21-30, 1995.

SUN, Y.; LI, H. Determination of trace selenium in human plasma and hair with ternary inclusion compound–fluorescent spectrophotometry. **Analyst**, v. 125, p. 2326–2329, 2000.

TENOVUO, J.; MIKINEN, K. K. Concentration of thiocyanate and ionizable iodine in saliva of smokers and nonsmokers. **Journal of Dental Research**, v. 55, p. 661-663, 1976.

TJABADI, E.; MKETO, N. Recent developments for spectrometric, chromatographic and electroanalytical determination of the total sulphur and halogens in various matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 207-222, 2019.

TORO, E. C.; GOEIJ, J. J. M.; BACSO, J.; CHENG, I-D; KINOVA, L. The significance of hair mineral analysis as a means for assessing internal body

burdens of environmental pollutants: Results from an IAEA Co-ordinated Research Programme. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 167, p. 413-421, 1993.

URBANOWICZ, M.; JASINSKI, A.; JASINSKA, M.; DRUCIS, K.; EKMAN, M.; SZARMACH, A.; SUCHODOLSKI, R.; POMECKO, R.; BOCHENSKA, M. Simultaneous determination of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> in unstimulated and stimulated human saliva using all solid state multisensor platform. **Electroanalysis**, v. 29, p. 2232–2238, 2017.

VAN ACKER, T.; VAN MALDEREN, S. J. M.; VAN HEERDEN, M.; MCDUFFIE, J. E.; CUYCKENS, F.; VANHAECKE F. High-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of cisplatin-induced nephrotoxic side effects. **Analytica Chimica Acta**, v. 945, p. 23-30, 2016.

VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C. B. **Modern methods for trace element determination**, New York: John Wiley & Sons, 1993.

VENKATESWARLU, P. Determination of fluorine in biological materials: a review. **Advances in Dental Research**, v. 8, p. 80-86, 1994.

VOBECKY, M.; BABICKY, A.; LENER, J. Effect of increased bromide intake on iodine excretion in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 55, p. 215-219, 1996.

WANG, C. Y.; ZHOU, Y. M.; YANG, W. Z. Fluorine electrode-coupled minicomputer for determination of fluorine in human hair. **Microchemical Journal**, v. 51, p. 374-378, 1995.

WANG, J.; SCHNUTE, W. C. Optimizing mass spectrometric detection for ion chromatographic analysis. I. Common anions and selected organic acids. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 3439-3447, 2009.

WEIS, U.; ARNS, J.; KAISER, V.; REICHSTEIN, A.; REICHSTEIN, L.; STOLL, B.; JOCHUM, K. P. Geostandards and Geoanalytical Research Bibliographic Review 2018. **Geostandards and Geoanalytical Research**, v. 44, p. 51-56, 2019.

WHO (World Health Organization). **Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination - A guide for programme managers**. Geneva: World Health Organization, 2007.

XIAO, L.; ZHANG, Y. H.; LI, Q. G.; ZHANG, Q. X.; WANG, K. INAA of elemental contents in fingernails of esophageal cancer patients. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 195, p. 43-49, 1995.

YAEMSIRI, S.; HOU, N.; SLINING, M. M.; HE, K. Growth rate of human fingernails and toenails in healthy American young adults. **Journal Compilation – European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, p. 420-423, 2010

ZIMMERMANN, M. B.; JOOSTE, P. L.; PANDAV, C. S. Iodine-deficiency disorders. **Lancet**, v. 372, p. 1251-1262, 2008.

## **APÊNDICE – Artigo 1**



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

## Are there feasible strategies for determining bromine and iodine in human hair using interference-free plasma based-techniques?



Diogo La Rosa Novo <sup>a</sup>, Rodrigo Mendes Pereira <sup>a</sup>, Alessandra Schneider Henn <sup>b</sup>,  
Vanize Caldeira Costa <sup>a</sup>, Erico Marlon Moraes Flores <sup>b</sup>, Marcia Foster Mesko <sup>a,\*</sup>

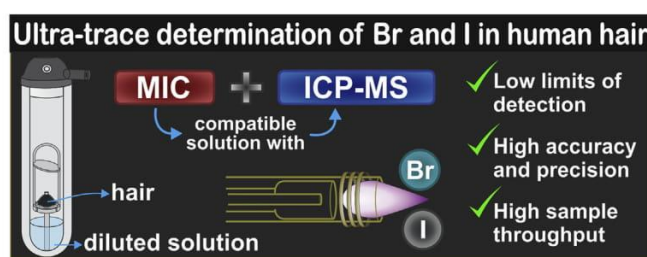
<sup>a</sup> Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

### HIGHLIGHTS

- The MIC method provided suitable digests for Br and I determination in human hair using interference-free ICP-MS.
- Low limits of detection were obtained for Br and I.
- Blank values were negligible and additional dilution step was not required.
- The drawbacks of analytical methods for human hair analysis proposed in the literature were overcome.
- The proposed analytical method can be used accurately and reliably by researchers in a variety of fields.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 November 2018

Received in revised form

4 January 2019

Accepted 16 January 2019

Available online 25 January 2019

#### Keywords:

Human hair analysis

Sample preparation

Halogen determination

Microwave-induced combustion

Inductively coupled plasma mass spectrometry

### ABSTRACT

An effective analytical method for bromine and iodine determination in human hair using interference-free inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was developed. Human hair was digested based on combustion reaction to obtain compatible solutions with ICP-MS analysis. Using microwave-induced combustion (MIC), masses of human hair ranging from 50 to 300 mg were efficiently digested. Only a diluted alkaline solution ( $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{OH}$ ) was used for the absorption of both analytes, which was fully compatible with ICP-MS analysis. Using these conditions low limits of detection were obtained (LOD of  $0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  for Br and  $0.004 \mu\text{g g}^{-1}$  for I). Recovery tests at two levels (50% and 100%) using a standard solution or mixtures of the sample with certified reference materials (CRMs) were carried out to evaluate the suitability of proposed method and recoveries between 94% and 102% were always obtained. Accuracy was evaluated by analysis of a human hair CRM, and the Br and I concentrations obtained by the proposed method did not differ significantly from those described in the certificate. Repeatability ( $\text{RSDs} \leq 4\%$ ) and reproducibility ( $\text{RSDs} \leq 7\%$ ) of the results using proposed method were always very suitable. The digests obtained using the MIC method were fully compatible with ICP-MS and the interferences currently found using conventional digestion methods were completely eliminated. Ultra-trace concentrations of Br and I were determined in human hair, demonstrating that

\* Corresponding author.

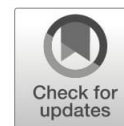
E-mail addresses: [marcia.mesko@pq.cnpq.br](mailto:marcia.mesko@pq.cnpq.br), [marciamesko@yahoo.com.br](mailto:marciamesko@yahoo.com.br) (M.F. Mesko).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.032>

0003-2670/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

## **APÊNDICE – Artigo 2**





# Single analysis of human hair for determining halogens and sulfur after sample preparation based on combustion reaction

Marcia Foster Mesko<sup>1</sup> · Rodrigo Mendes Pereira<sup>1</sup> · Priscila Tessmer Scaglioni<sup>1</sup> · Diogo La Rosa Novo<sup>1</sup>Received: 16 December 2018 / Revised: 21 February 2019 / Accepted: 27 February 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

A single analysis of hair for determining halogens (chlorine, bromine, fluorine, and iodine) and sulfur by ion chromatography with suppressed conductivity and mass spectrometry detection (IC-MS) was proposed. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) were also used to compare the results. For this purpose, 300 mg of human hair were digested by microwave-induced combustion (MIC) using 20 bar of oxygen pressure. The analytes were absorbed in 100 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH. Trueness of the proposed method was evaluated by analysis of a CRM of human hair; by recovery tests, using standard solution at two levels (50% and 100%), and by comparison of results with those obtained by ICP OES (Cl and S) and ICP-MS (Br and I). Suitable recoveries (ranging from 92 to 105%) were obtained, and the results from CRM analysis did not differ significantly from those described in the certificate. Moreover, results obtained by IC-MS did not present significant differences ( $p > 0.05$ ) from those obtained by ICP OES and by ICP-MS. Precision was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision, and the relative standard deviations were always lower than 8%. The proposed method presented good accuracy and it is a reliable strategy for human hair analysis. Final digests obtained using the MIC method were fully compatible with all proposed determination techniques. Compared to others reported in the literature, the proposed method presents several advantages, especially given that it is possible to determine halogens and sulfur in a single analysis.

**Keywords** Ion chromatography · Mass spectrometry · Inductively coupled plasma optical emission spectrometry · Inductively coupled plasma mass spectrometry · Microwave-induced combustion · Biological matrices analysis

## Introduction

Halogens and sulfur content in human hair are commonly associated with diet, environmental exposure, health problems, medicines, or supplements taken [1–4]. These elements have important functions to the human organism; however, in

unsuitable concentrations, they can be related to several disorders [4–6]. Halogens and sulfur concentration in biological samples is also used as an indicator of anthropogenic sources, global contamination, and toxic effects of persistent organic pollutants [2–5, 7].

Some techniques, such as instrumental neutron activation analysis (INAA), X-ray fluorescence, high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry have been used to determine halogens and sulfur in human hair [2, 5, 8–12]. Other versatile analytical tools, such as combustion ion chromatography or Cl/S multi-analyzer, have been proposed for the direct determination of halogens and sulfur in solid samples. However, although these techniques enable the direct analysis of solid samples, they have some disadvantages related to problems in the calibration step, a lack of sample homogeneity, matrix effects, and, specifically in the case of INAA, requirement for a nuclear reactor as a neutron source [13]. Moreover, some of them may not have

Published in the topical collection *Young Investigators in (Bio-)Analytical Chemistry* with guest editors Erin Baker, Kerstin Leopold, Francesco Ricci, and Wei Wang.





**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-019-01733-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marcia Foster Mesko  
marcia.mesko@pq.cnpq.br

<sup>1</sup> Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS 96160-000, Brazil

## **APÊNDICE – Artigo 3**

# Feasibility of microwave-induced combustion combined with inductively coupled plasma mass spectrometry for bromine and iodine determination in human nail

Diogo La Rosa Novo<sup>1</sup>  | Alessandra Schneider Henn<sup>2</sup>  | Erico Marlon Moraes Flores<sup>2</sup>  | Marcia Foster Mesko<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

## Correspondence

M. Foster Mesko, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96160-000 Capão do Leão, RS, Brazil.  
Email: marcia.mesko@pq.cnpq.br; marciamesko@yahoo.com.br

## Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 309424/2016-0 and 409357/2016-2; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: code 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Grant/Award Number: 16/2551-0000561-8

**Rationale:** Bromine and iodine have important physiological functions; however, in inadequate concentration, they can also cause several physiological problems. Their mobility assessment in human organisms through biological sampling may help clarify some doubts related to metabolic routes, which are still not well elucidated. In this context, a suitable analytical method for this purpose should be developed.

**Methods:** An analytical method for determining ultratrace levels of bromine and iodine in human nail samples was developed. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using a conventional nebulization system was immediately chosen as the determination tool because of its powerful sensitivity and selectivity. Sample preparation methods including microwave-induced combustion (MIC), microwave-assisted extraction, and microwave-assisted digestion were evaluated. The compatibility of the final solutions with ICP-MS analysis was considered while the method was developed.

**Results:** MIC was chosen as the most suitable method for the sample preparation for determining the levels of bromine and iodine in human nail samples using ICP-MS. Unlike other sample preparation methods, this one fully eliminated interferences related to the carbon content and memory effects. Sample masses up to 100 mg were efficiently digested, and the analytes were quantitatively absorbed using only 50 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH solution. Recoveries ranged from 93% to 102%, and the relative standard deviation was < 8%.

**Conclusions:** The proposed analytical method presents important characteristics for routine analysis. It allows ultratrace determination even when low sample masses are used because of the low blank values, reduced volume of reagents, and powerful detectability using ICP-MS.

## KEYWORDS

Biological samples, bromine determination, ICP-MS, iodine determination, sample preparation

**ANEXO – Parecer comitê de ética em pesquisa da UFPel**

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.292.445

avaliação do estado clínico dos participantes, sendo a participação destes restrita apenas ao fornecimento das amostras, as quais serão necessárias para o desenvolvimento e otimização dos métodos propostos. A etapa de amostragem será realizada respeitando-se os aspectos éticos envolvidos, os quais constam nos termos de consentimento livre e esclarecido e confidencialidade. Após a coleta, as amostras de cabelo, saliva e unha serão imediatamente identificadas e mantidas em ambientes apropriados no Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais (LCCBio), nas dependências do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Após a otimização do método, alguns indivíduos podem ser convidados a doar amostras para estudos de aplicabilidade do método. Neste caso, pode ser que grupos com mais de 20 indivíduos seja necessário. Serão avaliados métodos de preparo de amostras visando a posterior determinação elementar, tais como a combustão iniciada por micro-ondas e métodos de digestão com aquecimento convencional ou assistidos por micro-ondas, ultrassom e ultravioleta. Em todos os métodos serão avaliados diferentes parâmetros, tais como a massa de amostra, soluções digestora ou absorvedora, programa de incidência da radiação micro-ondas, dentre outros. Além disso, métodos que se baseiam na dissolução e extração com solvente utilizando aquecimento convencional, micro-ondas e ultrassom serão avaliados. Parâmetros como temperatura, quantidade de amostra e tempo de aquecimento serão otimizados. Ainda, de acordo com a necessidade, poderão ser avaliados outros métodos de preparo de amostras, os quais serão selecionados no decorrer da pesquisa. As determinações serão realizadas utilizando diferentes técnicas de determinação que apresentam elevada sensibilidade, tais como as espectrométricas, potenciométricas e cromatográficas. As condições operacionais para a determinação utilizando estas técnicas serão selecionadas de acordo com a recomendação de cada fabricante e serão adequadas visando melhores resultados (exatidão e precisão) sempre que necessário. Para a escolha da técnica de determinação, serão considerados parâmetros como sensibilidade e possíveis interferências, bem como o custo de aquisição e manutenção. A exatidão dos métodos, será avaliada utilizando materiais de referência, quando disponíveis, com ensaios de adição/recuperação dos analitos e/ou por comparação com outros métodos. A análise dos dados será feita apenas com critérios empregados na área de química analítica, sendo possível estabelecer uma validação quando cabível.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Desenvolver métodos de análise adequados e confiáveis para a determinação de elementos essenciais e não-essenciais para o organismo em amostras biológicas humanas obtidas através de coletas não-invasivas.

Endereço: Av. Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep\_farmed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer 2 292 345

**Objetivo Secundário:** Avaliar métodos de preparo de amostra utilizando ondas ultrassônicas, radiação micro-ondas e ultravioleta visando a posterior determinação elementar; Investigar métodos de preparo de amostras que sejam compatíveis à determinação das concentrações de elementos essenciais e não essenciais para o organismo em amostras biológicas não-invasivas de origem humana através de diferentes técnicas de determinação com elevada sensibilidade; Fornecer informações quanto a concentração elementar em amostras biológicas não-invasivas de origem humana; Desenvolver pesquisa na interface entre a química e as ciências biológicas; Estabelecer protocolos de amostragem visando a determinação elementar de amostras biológicas obtidas por coletas não-invasivas em humanos; Desenvolver métodos de análise adequados para avaliar a concentração de elementos químicos em diferentes populações, garantido que seja possível realizar a correta interpretação dos resultados; Desenvolver e aplicar ferramentas para a determinação de halogênios, como, por exemplo, o iodo, considerando a importância em avaliar sua ingestão, assim como o funcionamento da glândula tireoide; Promover a formação de recursos humanos em nível de pós-graduação através da orientação de mestres e doutores na área de desenvolvimento de métodos analíticos para determinação elementar em amostras biológicas junto ao Programa de Pós-Graduação em Química e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospeção da UFPel; Promover a formação de recursos humanos em nível de graduação através da orientação de alunos de iniciação científica; Divulgar os resultados através da submissão de artigos para revistas científicas indexadas com reconhecimento internacional e através da submissão de trabalhos para congressos da área.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

- Com relação aos riscos: "Os voluntários serão orientados sobre possíveis riscos inerentes ao procedimento de coleta das amostras. Uma vez que se trata de uma coleta não invasiva e não necessita do uso de seringas ou agulhas, não ocasiona ao voluntário os riscos de dores, edemas e derramamentos. É válido mencionar que o único risco que poderá causar ao voluntário é o constrangimento pelo contato durante a coleta da amostra, que embora seja mínimo, pode levar ao voluntário desistir de participar da pesquisa."

- Com relação aos benefícios: "Os métodos propostos neste estudo devem permitir a amostragem de uma quantidade adequada de cabelo, saliva e unhas, por meio de procedimentos não-invasivos e sem o uso de reagentes adicionais. Os métodos propostos apresentarão elevada sensibilidade, exatidão e precisão. O estudo em questão tem como principais vantagens frente as amostras

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96 030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3284-4960

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep\_tamed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer 2.292.445

obtidas por coletas invasivas, a simplicidade de coleta, estocagem, transporte e manuseio. Além disso, é importante mencionar a praticidade e a possibilidade de fazer amostragens simultâneas, além de reduzir consideravelmente a geração de resíduos e minimizar riscos de contaminação. Os métodos de análise propostos poderão ser utilizados com confiabilidade em estudos posteriores de diversas áreas do conhecimento com o intuito de avaliar a concentração dos elementos em pessoas com diferentes patologias, hábitos, expostas a ambientes contaminados, dentre outras”.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Serão desenvolvidos novos métodos de análise levando em consideração as peculiaridades de cada amostra e dos elementos que se deseja determinar. A partir do desenvolvimento do método, visa-se a determinação dos halogênios (bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F) e iodo (I)), bem como do enxofre.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

OK

**Recomendações:**

OK

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

OK

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Projeto_MarciaMesko.doc	22/09/2017 16:10:50	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES BASICAS DO PROJETO_912744.pdf	21/06/2017 17:32:14		Aceito
Outros	termo de confidencialidade.pdf	20/06/2017 11:18:29	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_completo.pdf	20/06/2017 11:17:07	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Outros	Formulario_registro_de_amostra.pdf	20/06/2017 11:16:46	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep\_famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.292.445

Outros	Autorizacao.pdf	20/06/2017 11:15:07	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/06/2017 11:13:43	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_institucional.pdf	20/06/2017 11:04:05	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	20/06/2017 11:03:01	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	19/06/2017 17:13:39	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PELOTAS, 22 de Setembro de 2017

*Patricia Abrantes Duval*

Assinado por:

•Patricia Abrantes Duval  
(Coordenador)

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (51)3284-4960

Fax: (51)3221-3554

E-mail: cop\_tamed@gmail.com