UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

DÉBORAH ARAÚJO MORAIS

Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de iodo em cabelo por ICP-MS utilizando solubilização em meio alcalino

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de iodo em cabelo por ICP-MS utilizando solubilização em meio alcalino

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestra em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Déborah Araújo Morais

Orientador: Prof. Dr Fernando Barbosa Júnior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 04/02/2020. Versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Morais, Déborah Araújo
Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de iodo em cabelo por ICP-MS utilizando solubilização em meio alcalino.
Ribeirão Preto, 2020
63 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando

1. Iodo. 2. Cabelo. 3. Preparo de amostra. 4. ICP-MS. 5. Meio Alcalino.

Nome: Déborah Araújo Morais

Título: Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de iodo em cabelo por ICP-MS utilizando solubilização em meio alcalino.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e Nossa Senhora, por me abençoarem e me livrarem de todo o mal. Sem suas bênçãos e graças, nada seria possível.

Agredeço a todo o apoio e empenho dos meus pais, Wandir e Carmélia Morais, amo vocês. Obrigada por toda a generosidade e compreensão por todas as ausências ao longo desses dois anos. Aos meus irmãos, Wandir Filho, Victor e Izabella Morais, pela amizade e companheirismo. Em especial à Izabella, por sempre ser o melhor ombro amigo que uma irmã pode ter. “Enquando eu existir, você nunca estará só”.

Aos meus sobrinhos, Enzo e Miguel, por serem uma alegria na vida minha vida. Com certeza eu sou uma pessoa muito melhor depois que vocês dois nasceram.

Aos meus sogros, Wellington e Inez, por todo carinho e amor. Vocês tem um lugar guardadinho no meu coração.

Ao meu melhor amigo, Wellington Tavares, por me acompanhar e incentivar em todas as aventuras na vida e na profissão.

Ao meu orientador, Doutor Fernando Barbosa Júnior, por todos os ensinamentos e oportunidades.

Aos integrantes do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Bruno, Cecília, Silvana, Mariana, Paula, Cibele, Marília, João, Wilian pela convivência e por ensinamentos trocados.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Vanessa, Cidinha e Rose. Obrigada pelo carinho e paciência.

Às Agências de Fomento, CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro para realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Morais DA. **Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de iodo em cabelo por ICP-MS utilizando solubilização em meio alcalino.** 2020. 63f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

RESUMO

O iodo é um elemento químico essencial, participando ativamente na biossíntese dos hormônios tiroidianos derivados da tirosina, a tiroxina (T_4) e a triiodotironina (T_3), com 4 e 3 átomos de iodo, respectivamente. Tanto a deficiência, quanto o excesso no consumo de iodo pode levar a problemas na saúde. Com todas essas considerações, o biomonitoramento humano para iodo se torna cada vez mais importante, sendo a determinação da concentração do elemento na urina a forma mais comumente utilizada. No entanto, uma informação sobre o consumo de iodo ao longo do tempo pode ser muito mais interessante que a obtida com uma única determinação pontual na urina. Neste sentido, o cabelo é uma matriz promissora, visto que acumula o analito excretado ao longo do fio, registrando variações de consumo ao longo de meses ou anos, dependendo do comprimento da amostra. No entanto, ainda são escassos os estudos que usam esta matriz para avaliação de iodo corporal, provavelmente pela limitação no número de métodos analíticos disponíveis na literatuta. Com isso, o presente estudo objetivou desenvolver e validar um método para determinação de iodo em cabelo, empregando solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), que seja rápido, simples, de baixo custo e capaz de ser implementado em rotina de larga escala. Para isso, foram otimizadas as concentrações de TMAH (10, 25, 50, 75 e 100% (v/v)), tempo de solubilização (7, 10, 12 h e *overnight*) e massa de amostra (entre 15 e 20 mg e entre 70 e 100 mg). Recuperações analíticas de iodo ($p > 0,05$) no material de referência *Human Hair QM-H-Q1725 e Non-fat Milk Powder* foram obtidas com solubilização das amostras por pelo menos 10h, empregando TMAH 50% (v/v) e massa de amostra entre 15 e 20 mg. A possibilidade de emprego de massas menores de cabelo (< 20 mg) favorece principalmente análises de segmentos ≤ 1 cm. A precisão intra (n=4) e inter(n=4) dia do método foi de 6,2% e 6,3%, respectivamente, mostrando uma boa precisão analítica. Com o procedimento proposto, pelo menos 400 amostras podem ser pesadas, deixadas à temperatura ambiente *overnight* em meio alcalino para completa solubilização e diluídas e analisadas no dia seguinte, aumentando consideravelmente a capacidade analítica em comparação a métodos que requerem digestão da amostra. Neste sentido, o método proposto pode ser uma excelente alternativa em estudos de avaliação corporal de iodo utilizando a matriz cabelo.

PALAVRAS-CHAVE: Iodo, cabelo, preparo de amostra, ICP-MS, meio alcalino.

Morais DA. **Development of a simple and fast method for hair iodine determination by ICP-MS employing alkaline solubilization**. 2020. 63f Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

ABSTRACT

Iodine is an essential chemical elemental, which participate on biosynthesis of thyroid hormones (tyrosine derived), thyroxine (T4) (4 iodine atoms) and triiodothyronine (T3) (3 iodine atoms). Iodine deficiency and excess iodine consumption can lead to health problems.Thus, iodine human biomonitoring is very important, and the determination in urine is the most commonly used form. However, information about consumption of iodine a long term can be most interesant than a single point determination as urine. The hair is a promising matrix, as it accumulates the analyte excreted along the strand, registering variations in consumption over months or years, depending on the length of the sample. However, studies with this matrix for iodine proposes are still scarce, probably due to the limited number of analytical methods available on literature. Thus, the present study aimed to develop and validate a method for the determination of iodine in hair, employing alkaline solubilization with tetramethylammonium hydroxide (TMAH), which is fast, simple, low cost and capable of being implemented in large-scale routine. So, the concentrations of TMAH (10, 25, 50, 75 and 100% (v/v)), solubilization time (7, 10, 12 h and overnight) and sample mass (between 15 and 20 mg and between 70 and 100 mg) were optimized. Good analytical iodine recoveries ($p > 0.05$) in Human Hair QM-H-Q1725 and Non-fat Milk Powder reference material were obtained after solubilizing the samples employing at least 10h using 50% (v/v) of TMAH and mass between 15 and 20 mg. The requirement of low hair masses (< 20 mg) is useful to analyze smaller hair segments ≤ 1 cm. The intra ($n = 4$) and inter ($n = 4$) precision were 6.2% and 6.3%, respectively, showing good analytical accuracy. With the proposed procedure, at least 400 samples can be weighed, left at room temperature overnight in alkaline medium for complete solubilization, diluted and analyzed at the next day, considerably increasing the analytical capacity compared to methods that require sample digestion. So, the proposed method is a quick and simple alternative to be applied in studies of body iodine evaluation using hair samples.

KEYWORDS: Iodine, hair, sample prepare, ICP-MS, alcaline solution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos hormônios (A) T_3 e (B) T_4 1
Figura 2: Síntese dos hormônios tiroidianos T3 e T4 2
Figura 3. Representação esquemática de um ICP-MS NexION® 2000 9
Figura 4: Representação esquemática da calibração externa, quando o ajuste de matriz é necessário. Efeito de matriz mostrando quando: (a) aumento do sinal (devido a interferências espectrais, por exemplo); (b) diminuição do sinal (devido a recuperação reduzida durante o preparo da amostra, por exemplo).....11
Figura 5: Esquema para avaliação da concentração ideal de TMAH para solubilização da matriz.....15
Figura 6: Esquema para avaliação do tempo total ideal para solubilização da matriz 17
Figura 7: Representação esquemática para avaliação da influência da massa da amostra 18
Figura 8: Avaliação do efeito de matriz. Os dados estão representados em média ± desvio padrão. Equações: Curva somente iodo: y = 35117 x; curva L-cisteina: y = 32749 x 23
Figura 9: Recuperação dos materiais de referências (n=3) (15 a 20 mg) solubilizados com as concentrações de 50, 75 e 100% (v/v) de TMAH *overnight*, sendo (A) Recuperação do Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1725. Linha tracejada azul corresponde à recuperação alvo informada *por* INSPQ (100%). Linhas postilhadas vermelhas correspondem à faixa de recuperação informada por INSPQ (de 91% a 109%); (B) Recuperação do Material de Referência *Non-fat Milk Powder*. Linha tracejada azul corresponde à recuperação alvo informada por NIST (100%) .26
Figura 10: Influência do tempo total de solubilização na recuperação do material de referência Human Hair QM-H-Q1725 (n=3) (15 a 20 mg), solubilizado com 50% (v/v) de TMAH. Linha tracejada azul corresponde à recuperação alvo informada por INSPQ (100%). Linhas postilhadas vermelhas correspondem à faixa de recuperação informada por INSPQ (de 91% a 109%). * Corresponde à diferença estatística ($p < 0,05$), quando aplicado teste t pareado com 95% de confiança.....29
Figura 11: Influência da massa na recuperação de iodo nos materiais de referência, sendo (A) Recuperação no Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1616 solubilizado com 50% (v/v) de TMAH *overnight*; (B) Recuperação no Material de

Referência *Human Hair* QM-H-Q1725 solubilizado com 50% (v/v) de TMAH *overnight*. Linhas tracejadas azuis correspondem às recuperações alvos informadas por INSPQ (100%). Linhas pontilhadas vermelhas correspondem a faixa de recuperação informada por INSPQ, sendo (A) de 87% a 113% e (B) de 91% a 109%; (C) Recuperação no Material de Referência *Non-Fat Milk Powder*, solubilizado com 50% (v/v) de TMAH *overnight.* Linha tracejada corresponde a recuperação alvo informada por NIST (100%) 31

Figura 12: Representação esquemática das etapas do método proposto para determinação de iodo em cabelo (de 15 a 20 mg) por ICP-MS, empregando solubilização alcalina em TMAH 50% (v/v), à temperatura ambiente overnight 33

Figura 13: Concentração média de iodo ± desvio padrão, obtidos ao longo de 4 dias, solubilização de massa de 15 a 20 mg, com 50% TMAH (v/v) *overnight* dos materiais de referência. (A) Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1616, (B) Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1725. (C) Material de Referência *Non-Fat Milk Powder*. Linhas pontilhadas azuis correspondem à concentração alvo, sendo (A) 9,66 µg g^{-1}, (B) 9,36 µg g^{-1} e 34

Figura 14: Análise do Efeito Residual com análise de branco (n=3), seguida de análise de amostra (n=8), e análise de branco (n=3). Branco é constituído de TMAH 1% (v/v) 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros instrumentais de operação do ICP-MS.....19
Tabela 2: Concentração de TMAH para solubilização de 15 a 20 mg de matriz, *overnight*.....25
Tabela 3: Análise visual do tempo de solubilização da matriz (15 a 20 mg) em TMAH 50% (v/v) 28
Tabela 4: Concentração média de iodo ± desvio padrão, precisão intra-dia (n=4) e inter-dia (n=4). Resultados obtidos ao longo de 4 dias, solubilização de massa de 15 a 20 mg, com 50% TMAH (v/v) *overnight* de: Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1616, Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1725 e Material de Referência *Non-Fat Milk Powder*. Valores de referência: 9,66 ± 1,25 µg g^{-1}, 9,36 ± 0,84 µg g^{-1} e 3,38 µg g^{-1}, respectivamente.....35
Tabela 5: Comparação dos parâmetros do ICP-MS utilizados no presente estudo, por Novo et al. (2019b) e os propostos por Grindlay et al. (2013).....37
Tabela 6: Comparação diferentes preparos de amostra para dosagem de iodo em cabelo.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado
T_3	Triiodotironina
T_4	Tiroxina
I^-	Iodo reduzido
I_2	Iodo oxidado
MIT	Monoiodotirosina
DIT	Di-iodotirosina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
MIC	*Microwave-Induced Combustion*
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
IAEA	*International Atomic Energy Agency*
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio
(v/v)	Volume por volume
(m/v)	Massa por volume
HNO_3	Ácido nítrico
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_4OH	Hidróxido de amônio
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
INSPQ	*Institut Nacional de Santé Publique du Quebec*
NIST	*National Institute of Standards and Technology*
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ºC	Graus Celsius
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
h	Horas
>	Maior que
<	Menor que
≤	Menor ou igual a

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vi
LISTA DE SÍMBOLOS vii

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Papel do Iodo na Homeostasia 1
1.2. Biomonitoramento humano para iodo 4
1.3. Relação entre Elementos Químicos e Cabelo Humano 6
1.4. Solubilização do Cabelo em Meio Alcalino 7
1.5. Utilização do ICP-MS para Dosagem de Iodo 8
1.5.1. Calibração externa por ajuste por matriz em ICP-MS 10
1.5.2. Interferentes na quantificação de iodo em cabelo por ICP-MS 12
2. JUSTIFICATIVA 13
3. OBJETIVO 14
4. MATERIAIS E MÉTODOS 14
4.1. Desenvolvimento do Estudo 14
4.2. Padrões e reagentes 14
4.3. Otimização dos Parâmetros de Solubilização 14
4.3.1. Concentração de TMAH para solubilização da matriz 15
4.3.2. Tempo total de solubilização à temperatura ambiente 16
4.3.3. Avaliação da Influência da massa da amostra 17
4.4. Preparo das Soluções de Calibração 18
4.5. Instrumentação e parâmetros de análise 18
4.6. Parâmetros Analíticos para Validação da Metodologia Proposta 19
4.6.1. O efeito de matriz 20
4.6.2. Limite de Detecção (LD) 20
4.6.3. Limite de Quantificação (LQ) 20
4.6.4. Exatidão 20

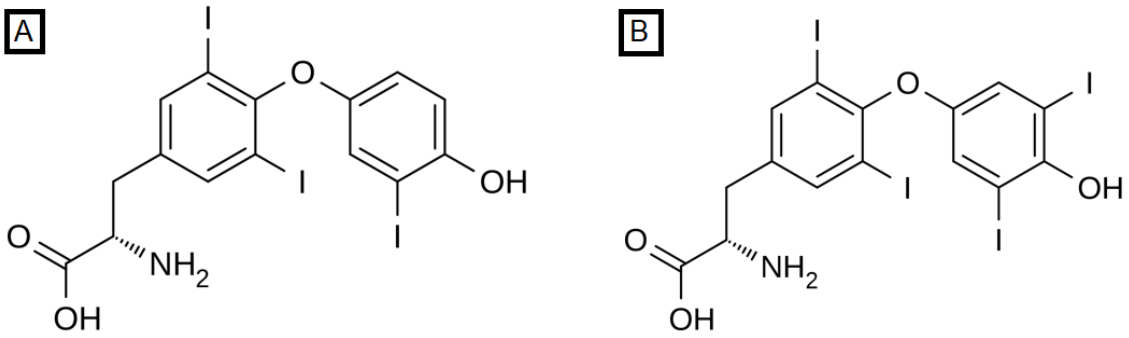
4.6.5. Precisão 21
4.7. Análise do Efeito Residual 21
4.8. Análise dos Resultados 21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 22
5.1. Efeito de Matriz 22
5.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) 23
5.3. Parâmetros de Solubilização 24
5.3.1. Concentração de TMAH para solubilização da matriz 24
5.3.2. Tempo total de solubilização à temperatura ambiente 27
5.3.3. Avaliação da Influência da massa da amostra 30
5.4. Condições otimizadas do método proposto 33
5.5. Comparação da Metodologia Proposta com Metodologias Presentes na Literatura 35
6. CONCLUSÃO 40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Papel do Iodo na Homeostasia

A glândula tireóide está localizada abaixo da laringe, em ambos os lados da parte anterior da traquéia. Ela possui fundamental papel na síntese dos hormônios calcitonina, tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3), sendo os dois últimos classificados como aminas (COSTANZO, 2007; SILVERTHORN, 2010). O iodo participa ativamente da síntese do T_3 e do T_4, sendo esse elemento químico um fundamental componente para a homeostase. (COSTANZO, 2007; SILVERTHORN, 2010; DE ESCOBAR; OBREGÓN; DEL REY, 2004; DE ESCOBAR; OBREGÓN; DEL REY, 2007; DELANGE, 2007; WHO 2004; WHO, 2014). Derivados do aminoácido tirosina, os hormônios T3 e T4 possuem 3 e 4 átomos de iodo em suas estruturas, respectivamente (Figura 1).

Figura 1: Estrutura química dos hormônios (A) T_3 e (B) T_4



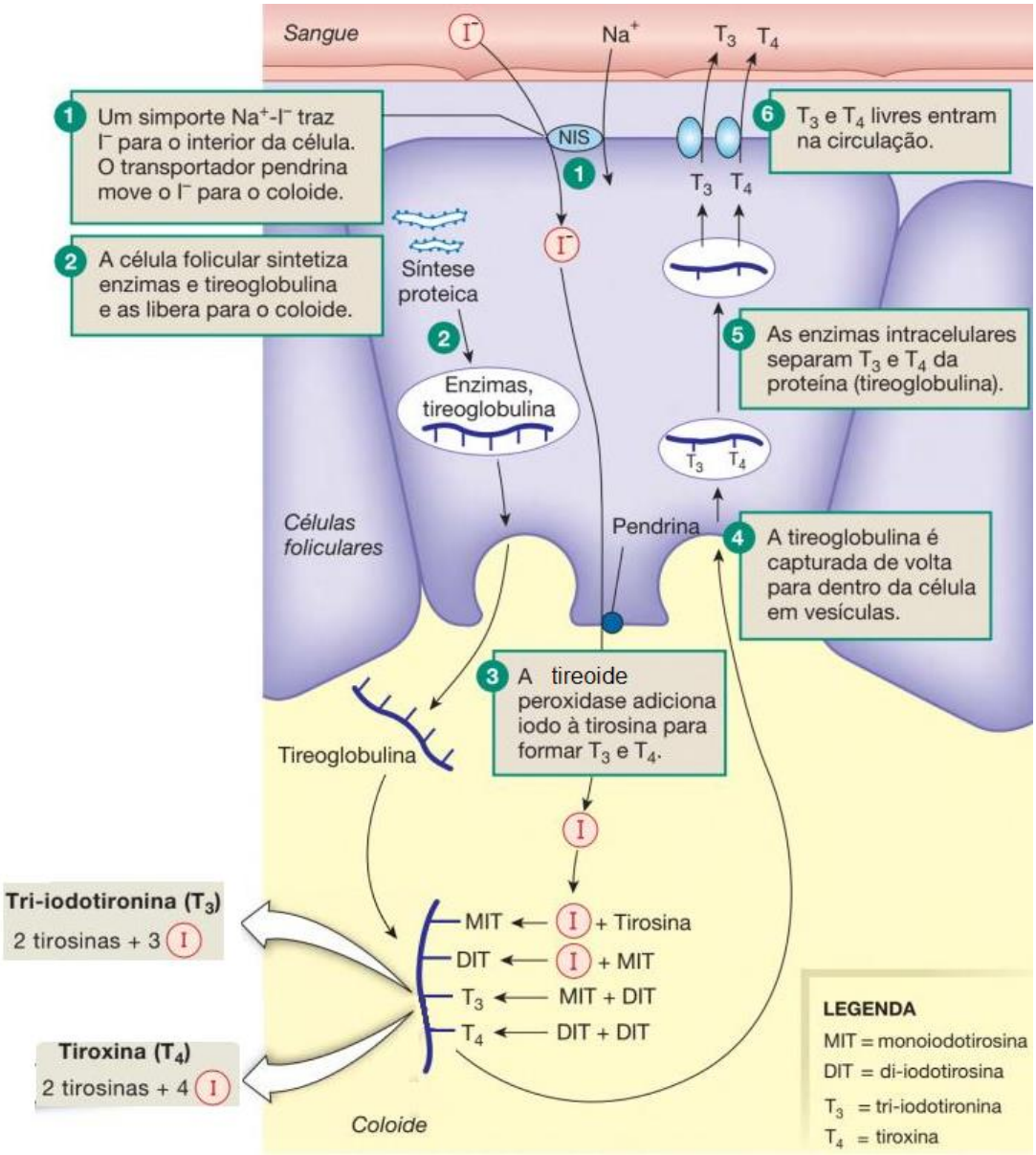
Fonte: Lim et al. (2002), com modificações.

Produzidos pelas células epiteliais foliculares da tireoide, a biossíntese (Figura 2) de T3 e T4 se inicia com o transporte ativo de iodo para dentro da célula, por meio da bomba Na^+- I^-. De acordo com a biodisponibilidade do iodo no sangue, a atividade dessa bomba pode ser aumentada, quando existe pouco I^- disponível, ou diminuída, quando a concentração de I^- disponível no sangue está normal. Entretanto, quando a ingestão de iodo pela dieta é deficiente, a ação aumentada da bomba Na^+- I^- não é suficiente para suprir a deficiente do

elemento, tendo como consequência a diminuição da síntese de T_3 e T_4 (COSTANZO, 2007; SILVERTHORN, 2010).

Após a entrada do I^- nas células epiteliais da tireoide, a enzima tireoide peroxidase o oxida em I_2. Ainda pela ação da tireoide peroxidase, as moléculas de tirosina, presentes nas células da tireóide através da síntese de tireoglobulina no retículo endoplasmático rugoso e no aparelho de Golgi das células foliculares, são iodadas (por meio da adição de I_2 – organificação do iodo), dando origem aos precursores dos hormônios tiroidianos, monoiodotirosina (MIT) e di-iodotirosina (DIT) (COSTANZO, 2007; SILVERTHORN, 2010).

Figura 2: Síntese dos hormônios tiroidianos T3 e T4



Fonte: Silverthorn (2010), com modificações.

A tireoide peroxidase catalisa rapidamente o acoplamento de duas moléculas de DIT, dando origem ao T_4. Em outra reação, uma molécula de MIT é acoplada a uma molécula de DIT, dando origem ao T_3. Como consequência, as células epiteliais foliculares da tireóide produzem em maior quantidade o T_4. Em contraponto, o hormônio mais ativo é o T_3 e, por isso, ao chegar no tecido alvo, o T_4 é transformado em T_3 (COSTANZO, 2007; SILVERTHORN, 2010).

As ações do T_3 e do T_4 estão intimamente ligadas ao crescimento do esqueleto (em crianças), consumo de oxigênio, produção de calor, utilização de carboidratos, lipídios e proteínas e maturação perinatal do sistema nervoso central (COSTANZO, 2007; SILVERTHORN, 2010).

Segundo a OMS, Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004), a deficiência de iodo é um grande problema de saúde pública, sendo a maior causa de dano cerebral evitável na infância. A deficiência de iodo pode causar ainda hipotireoidismo e formação de bócio em adultos ou cretinismo em crianças, caracterizado pelo retardo mental e do crescimento. O excesso de iodo pode resultar em hipertireoidismo e alergias (ZIMMERMANN, 2009). Além disso, altas concentrações de I^- inibem a organificação do I_2 e a síntese dos hormônios tiroidianos, dando origem ao efeito de Wolff-Chaikoff (COSTANZO, 2007).

A ingestão de iodo recomendada varia de 100 a 300 µg por dia, a depender da idade do indivíduo e, caso seja mulher, se é lactante ou se está grávida (WHO, 2014). Posto que um indivíduo necessita de pequenas quantidades de iodo diariamente, a suplementação, por meio do sal iodado, foi adotada em diversos países pelo mundo, inclusive no Brasil (WHO 2004; WHO, 2014).

De acordo com a OMS (WHO, 2014), a suplementação de iodo no sal deve ser realizada com base no consumo de sal da população, já que existem diferenças quanto a quantidade do produto consumido. A preocupação com o consumo de sal também elucida outro problema, já que a principal composição do sal é o sódio e, quando ingerido em grandes quantidades, tem sido associado à hipertensão, doenças cardiovasculares e derrames (WHO, 2014).

No ano de 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), baseada em recomendações do projeto Thyromobil na América Latina (ROSSI et al., 2001), determinou que deveria ser adicionado de 20 a 60 mg de iodo por quilograma de sal destinado para consumo humano (BRASIL, 2003). Contudo,

o aumento do consumo de sal fomentou na preocupação com o excesso de iodo consumido pelos brasileiros. Por isso, em 2013, a ANVISA revogou a resolução anterior e determinou que a quantidade de iodo adicionado ao sal deveria ser de 15 a 45 mg de iodo por quilograma de sal (BRASIL, 2013).

1.2. Biomonitoramento humano para iodo

Para averiguar a concentração de iodo que a população consome é importante monitorar a qualidade da suplementação de iodo no sal. Em conjunto, para que se avalie a ingestão de iodo pelo sal de uma população, deve ser monitorada a concentração urinária de iodo, não apenas para detectar deficiências, mas também a ingestão excessiva e, portanto, evitar os riscos para a saúde da população, devido ao excesso do elemento químico, ajustando o nível de fortificação de acordo com isso, como parte de um sistema de monitoramento contínuo (WHO, 2014).

O iodo é tradicionalmente monitorado na urina, pois estima-se que 90% do elemento seja excretado por essa via (NATH et al., 1992; JAHREIS et al., 2001; ZIMMERMANN; ANDERSSON, 2012).

A literatura elucida estudos de biomonitoramento humano para iodo em diferentes faixas etárias da população brasileira, revelando excreção adequada na urina (MILHORANSA; VANACOR; FURLANETTO, 2010; CAMPOS et al., 2015; ALVES; GABARRA; NAVARRO, 2018; SARAIVA et al., 2018; CORCINO, 2019), alta excreção do elemento químico, como consequência do alto consumo de iodo (ROSSI et al., 2001; ROSSI et al., 2002; CARVALHO et al., 2012; DE LIMA; BARBOSA JÚNIOR; NAVARRO, 2013) e deficiência de iodo em alguns grupos populacionais, principalmente crianças e gestantes (MILHORANSA; VANACOR; FURLANETTO, 2010; FERREIRA et al., 2014; CAMPOS et al., 2015; MIOTO et al., 2018).

O cabelo se apresenta como uma matriz promissora para biomonitoramento humano para iodo, pois, dentre as suas vantagens estão a possibilidade de coleta não invasiva (inerente também à coleta de urina), não necessidade de refrigeração no transporte e armazenamento até a análise (ATSDR, 2001; ROBBINS, 2012), o que é favorável principalmente em avaliações de populações residentes em áreas de dificil acesso.

Estima-se que a concentração de iodo encontrada no cabelo é quatro vezes maior que a concentração do analito na urina (MOMČILOVIĆ et al., 2018). Ademais, frente a urina, o cabelo ainda apresenta outras vantagens específicas, como a possibilidade de avaliação do iodo corporal ao longo de meses ou anos de vida de um individuo, já que o cabelo cresce cerca de 1 cm por mês (ROBBINS, 2012).

No entanto, são ainda muito escassos os trabalhos que propoem o uso desta matriz para avaliar a deficiência ou excesso de iodo no organismo. Talvez um dos motivos seja a falta de metodologias na literatura viáveis para o processamento de amostras em grande escala.

A determinação de iodo em cabelo já foi realizada por ativação de nêutrons. Destaca-se as massas requeridas para as análises, que variam de 100-150 mg até 5 g (HOU et al., 1997; FAGHIHIAN, H.; RAHBARNIA, 2002). Técnicas baseadas em plasma também já foram propostas para determinação de iodo em cabelo, por meio de ablação com laser acoplado a espectrômetro de massas com plasma (LA-ICP-MS) (RODUSHKIN; AXELSSON, 2000; DRESSLER et al., 2010).

Essas técnicas são muito onerosas, pois utilizam reator nuclear como fonte de nêutrons (ativação de neutrons) ou requerem sistema de introdução diferenciada, no caso do LA-ICP-MS (POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017).

Em estudo realizado por Gorbachev, Skalny e Koubassov (2007) foi determinado iodo no cabelo, dentre outros analitos. Porém, os autores informam somente que as análises foram realizadas por meio de ICP-OES e ICP-MS, sem informar o procedimento utilizado para preparo das amostras, o que dificulta a reprodução da metodologia em rotina.

Prejac e colaboradores (2014) realizaram a determinação de iodo em cabelo, por meio da digestão da amosta em HNO_3 e H_2O e subsequente análise por ICP-MS. Entretanto, sabe-se que a utilização de HNO_3 no preparo de amostras para dosagem de iodo pode provocar a volatilização do analito, prejudicando os resultados obtidos (KNAPP et al., 1998).

Recentemente, Novo e colaboradores (2019b) propuseram um método para a determinação de iodo em cabelo, em que o preparo de amostra requer a pesagem de massas de amostra entre 50 a 400 mg. Em seguida, as amostras

eram prensadas, com uso de prensa hidráulica, para preparo de pellets introduzidos no MIC (*microwave-induced combustion),* para digestão das amostras, seguido de análise por ICP-MS.

Dentre os fatores negativos inerentes às metodologias explanadas anteriormente estão a necessidade de trabalho com maiores massas de cabelo, que dificultam as análises de pequenos segmentos (principalmente inferior a 1-2 cm) e a baixa taxa de amostragem analítica.

1.3. Relação entre Elementos Químicos e Cabelo Humano

O cabelo humano é uma fibra proteíca, composta por subunidades de cadeias α-queratina, que é formada por aminoácidos. Esses aminoácidos, sendo o principal a cisteina, incorporam elementos químicos, devida à alta afinidade pelo enxofre presente nos grupos sulfidrilas (POPESCU, HÖCKER, 2007).

A melanina, pigmento que confere cor ao cabelo, é constituído de polímeros que contêm grupos carboxila e semiquinonas com carga negativa. Isso propicia a ligação com cátions por interação iônica. Ademais, os metais também podem se ligar ao núcleo hidrofóbico do polímero de melanina na estrutura capilar. São essas interações químicas mencionadas que fazem com que elementos químicos persistam no cabelo humano por um longo tempo (ATSDR, 2001; TOBIN, 2005).

A depender da parte do couro cabeludo e do indivíduo o crescimento do cabelo pode ser diferente, variando entre 0,6 a 1,5 cm (TOBIN, 2005), contudo é em geral estabelecido um crescimento médio mensal de 1 cm (ATSDR, 2001; TOBIN, 2005; ROBBINS, 2012). Além disso, o comprimento do cabelo pode refletir diferentes períodos de exposição, possibilitando uma avaliação temporal (ATSDR, 2001; TOBIN, 2005). Embora não seja estabelecido o local ideal para coletar a amostra, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) decidiu estabelecer como protocolo a coleta na região occipital, com auxílio de tesoura fabricada em aço inoxidável (ATSDR, 2001).

O entendimento da *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2001) quanto a lavagem da amostra antes do preparo é de que, quando existe contaminação externa pela substância a ser analisada, é muito importante a aplicação de protocolo de lavagem do cabelo. Para tanto, pode ser utilizada

metodologia padrão, proposta por Ohmori (1984), que é recomendada pela *International Atomic Energy Agency* (IAEA) (IAEA, 1985) para análise de iodo, na qual o cabelo deve ser lavado com acetona, água e acetona novamente.

Entretanto, a ATSDR (2001) salienta que já foi demonstrado que a acetona remove sódio, bromo e cálcio e pode adicionar cobre, ferro, manganês, zinco e mercúrio. Por isso, a depender do analito de interesse, as opções de lavagem devem ser avaliadas.

Sobre a quantidade de cabelo necessária para a quantificação de elementos químicos ser confiável, a ATSDR (2001) conclui que é necessário avaliar a sensibilidade do método analítico para determinar uma massa mínima de amostra.

1.4. Solubilização do Cabelo em Meio Alcalino

O preparo de amostras biológicas é uma etapa crítica e pode ser a mais trabalhosa da análise de elementos químicos em matrizes biológicas (LIMA et al., 2000; SOUZA et al., 2007; BATISTA et al., 2008).

O emprego da solubilização alcalina do cabelo, utilizando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 100% (v/v) à temperatura ambiente, proposto por Rodrigues e seus colaboradores (2008a) e aplicado em outro estudo do mesmo grupo (RODRIGUES et al., 2008b), foi utilizado para determinação de selênio, chumbo, cádmio, manganês, cobalto, zinco, cobre, platina, urânio, tálio, arsênio, magnésio, crômio, berílio, prata, níquel e estrôncio por ICP-MS. Este procedimento apresenta diversas vantagens, já que é simples, por não ser necessário o emprego de micro-ondas para digestão prévia da amostra e pode ser realizado à temperatura ambiente, proporcionando custos e tempos menores para a análise.

O TMAH também foi utilizado para solubilização de outras matrizes biológicas como unha (BATISTA et al., 2008), sangue total (BARBOSA JR et al., 2004; RODRIGUES et al., 2009; NUNES et al., 2010), leite materno (HUYNH, 2015) e tecido de animais (BATISTA et al., 2009; DE CARVALHO et al., 2010; LOESCHNER et al., 2014) por ser capaz de causar cisão hidrolítica e metilação de éster, amida e alguma ligação éter. Além disso, quebra as ligações químicas dissulfeto nas proteínas (NÓBREGA et al., 2006).

Outros pesquisadores como Carneiro (2011), Li (2016) e seus respectivos colaboradores utilizaram a metodologia proposta por Rodrigues e colaboradores (2008a) para quantificar arsênio, chumbo, cádmio, manganês, cobalto, selênio, mercúrio, molibdênio, estrôncio, prata, bário, cálcio, cobre, magnésio, antimônio e zinco em cabelo por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Entretanto, a luz dos nossos conhecimentos, não existe metodologia na literatura para solubilização alcalina (utilizando TMAH) de cabelo, à temperatura ambiente, tendo como analito de interesse o iodo.

Ademais, sabe-se que, quando empregado digestão ácida assistida por micro-ondas para preparo de amostra para determinação de iodo, pode ocorrer a formação de compostos voláteis e consequente perda do analito (KNAPP et al., 1998). Com isso, a solubilização alcalina, com a utilização de TMAH, se torna uma alternativa viável para determinação de iodo em matrizes biológicas.

1.5. Utilização do ICP-MS para Dosagem de Iodo

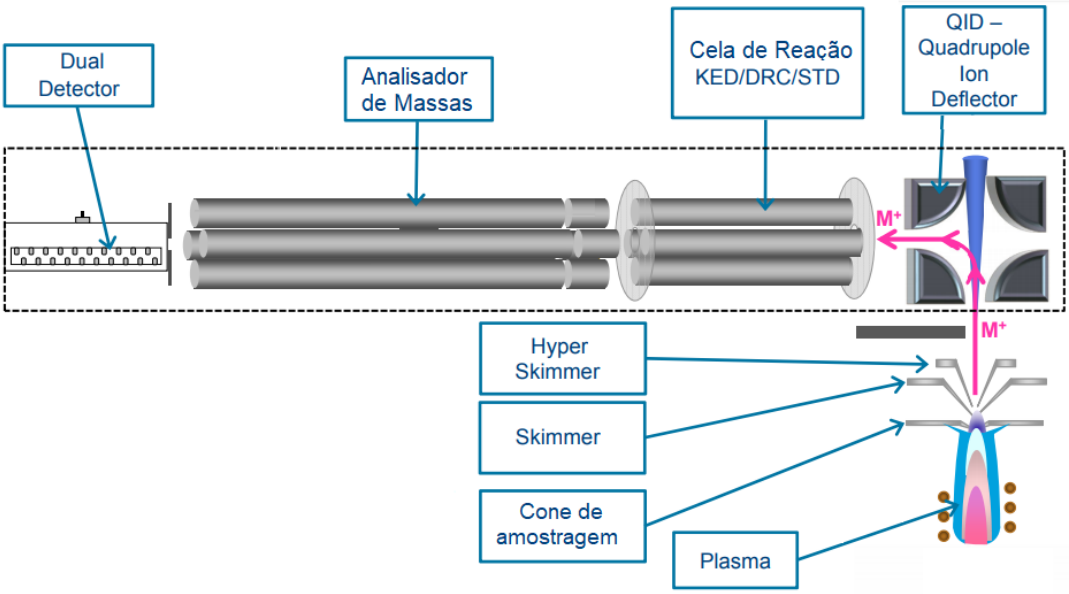
Dentre as vantagens da utilização do ICP-MS (Figura 3) para determinação de elementos químicos, está a capacidade de analisar quase todos os elementos contidos na tabela periódica (TAYLOR, 2001). Além disso, a capacidade de determinação de pequenas quantidades de elementos na urina, no soro, no plama e em tecidos, confere grande vantagem para o biomonitoramento humano (SCHRAMEL, 1999).

A introdução da amostra, em sua maioria na forma líquida, é realizada pelo nebulizador, que forma aerossóis dentro da câmara de nebulização, os quais são carregados para o plasma (tocha) pelo fluxo do gás de nebulização (argônio), e na sequência, sofrem dessolvatação térmica e ionização (SCHRAMEL, 1999; TAYLOR, 2001).

A formação do plasma indutivamente acoplado ocorre dentro da tocha e inicia-se por uma faísca, gerada por bobina de Tesla, localizada no final da tocha, que inflama o fluxo de argônio que está passando por ela. Os íons e elétrons, presentes no argônio, interagem com o campo magnético oscilante, gerado pela bobina de Tesla, mantendo, assim o plasma (SCHRAMEL, 1999; TAYLOR, 2001). O ICP-MS NexION® 2000 (*PerkinElmer,* Waltham, EUA) possui a tecnologia LumiCoil®, que não requer o resfriamento da bonina com água ou gás

(PERKIN ELMER, 2019). A presença do plasma dá a capacidade de ionizar, atomizar e excitar o analito a ser analisado (SCHRAMEL, 1999; TAYLOR, 2001).

Figura 3. Representação esquemática de um ICP-*MS NexION® 2000*



Fonte: CACHET (2019), com modificações.

Os íons gerados no plasma são transferidos para a interface (SCHRAMEL, 1999; TAYLOR, 2001), que no caso do ICP-MS NexION® 2000 (*PerkinElmer,* Waltham, EUA) é composto por três cones: de amostragem, *Skimmer* e *Hyper Skimmer* (PERKIN ELMER, 2019). O QID (*Quadrupole Ion Deflector*) está posicionado a 90 ºC e é o primeiro componente do equipamento na região de vácuo. Ele está localizado após os cones de amostragem e funciona como um filtro, inserindo os analitos no analisador de massas (PERKIN ELMER, 2019).

Os íons são então separados de acordo com a relação massa/carga (m/z) no analisador de massas e então detectados no detector (SCHRAMEL, 1999), que pode estar no modo *pulse*, no modo analógico ou no modo *dual* (ambos) (PERKIN ELMER, 2019).

1.5.1. Calibração externa por ajuste por matriz em ICP-MS

Existem diferentes formas de calibração do ICP-MS para realização de análise quantitativa, são elas: diluição isotópica, adição de padrão e calibração externa (TAYLOR, 2001).

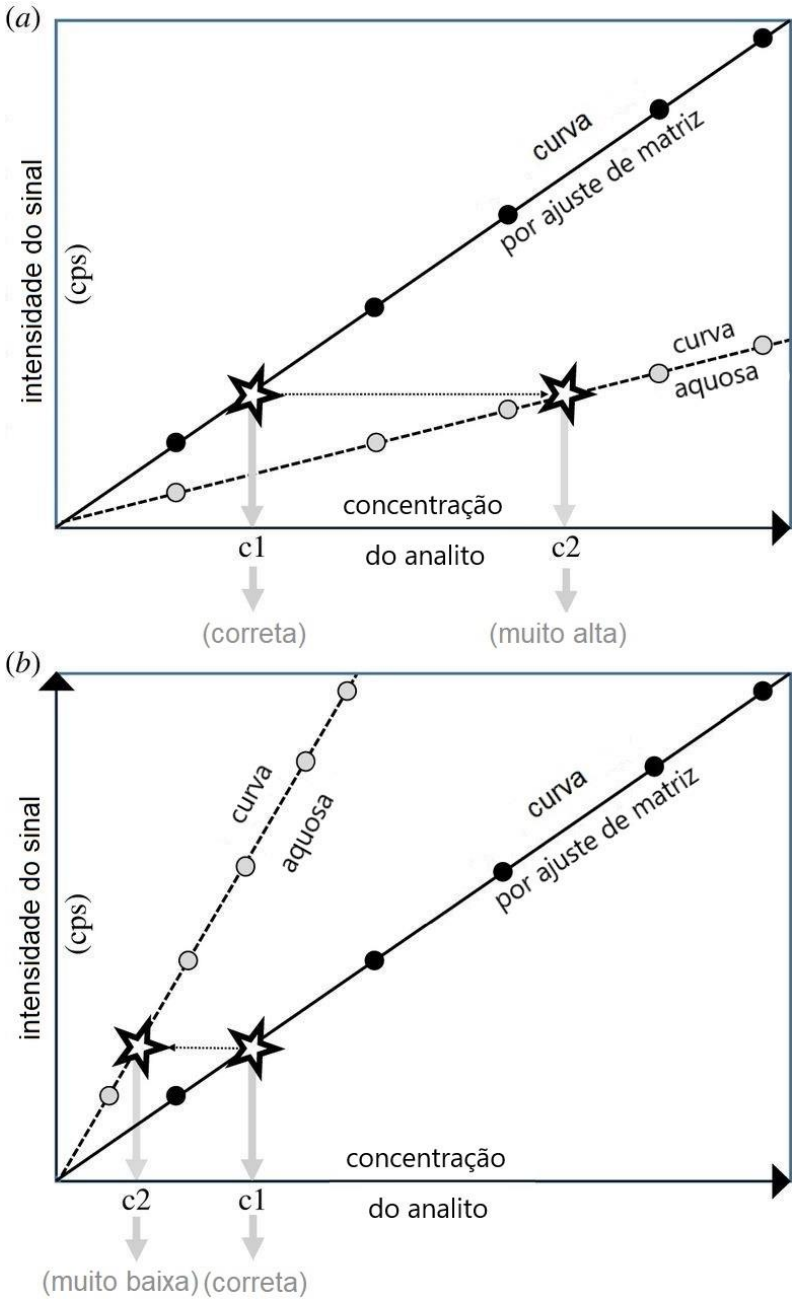
A diluição isotópica consiste na adicionação de isótopos enriquecidos artificialmente do elemento a ser determinado na amostra, em diferentes concentrações. Este procedimento de calibração não é aplicável a elementos mono-isotópicos e aplicável somente a elementos que os isótopos enriquecidos estão disponíveis comercialmente (SCHRAMEL, 1999).

A calibração com adição de padrão é realizada contaminando a própria amostra com concentrações conhecidas dos analito de interesse. Essa abordagem possui baixa aplicabilidade em rotina, por ser muito demorada (BULSKA; WAGNER, 2016).

A calibração externa é amplamente utilizada em análises por ICP-MS e consiste na construção de uma curva analítica em HNO_3, por exemplo, com níveis de diferentes concentrações. A calibração externa pode ser realizada com ou sem a adição de um padrão interno (ex.: ródio e índio), de concentração conhecida, que não esteja presente na amostra em concentrações significativas. Esse tipo de calibração é utilizado principalmente para aquelas amostras que apresentam interferências não-espectrais (TAYLOR, 2001; BULSKA; WAGNER, 2016).

A análise direta de amostras biológicas por ICP-MS, pode ser realizada utilizando a calibração externa com ajuste de matriz, do inglês *matrix-matching*, para que sejam minimizados ou excluídos os interferentes onde o analito está inserido. A quantificação do analito, utilizando introdução direta de amostra, sem o ajuste de matriz pode causar incremento no sinal e consequente detecção de concentração maior do que a real, ou decréscimo no sinal, tendo como resultado concentração menor que a real (Figura 4) (BULSKA; WAGNER, 2016).

Figura 4: Representação esquemática da calibração externa, quando o ajuste de matriz é necessário. Efeito de matriz mostrando quando: (a) aumento do sinal (devido a interferências espectrais, por exemplo); (b) diminuição do sinal (devido a recuperação reduzida durante o preparo da amostra, por exemplo)



Fonte: BULSKA, WAGNER (2016), com modificações.

A necessidade de adição da matriz ou de componentes da mesma, pode ser verificado através do teste de efeito de matriz, onde são comparadas as inclinações das curvas com e sem a matriz, por meio de análise estatística (INMETRO, 2016).

Para análise de cabelo multielementar por ICP-MS (selênio, chumbo, cádmio, manganês, cobalto, zinco, cobre, platina, urânio, tálio, arsênio, magnésio, crômio, berílio, prata, níquel, estrôncio, mercúrio, molibdênio e antimônio) Rodrigues e colaboradores (2008a, 2008b) propuseram a adição de L-cisteina nas curvas de calibração para realizar o ajuste de matriz, já que ela é o aminoácido mais abundante no cabelo (HILTERHAUS-BONG; ZAHN, 1987).

1.5.2. Interferentes na quantificação de iodo em cabelo por ICP-MS

Podem ocorrer basicamente dois tipos de interferências na determinação por ICP-MS: interferências espectrais e interferências não-espectrais. Ambas podem causar uma determinação incorreta dos analitos (TAYLOR, 2001; LUM; LEUNG, 2016).

Interferências espectrais estão relacionadas com a medição de corrente de íons no espectro de massas. Elas podem ser classificadas como isobáricas, poliatômicas, formação de óxidos e formação de íons com dupla carga. A interferência isobárica é detectada quando ocorre uma sobreposição de isótopos, de diferentes m/z, de diferentes analitos. A interferência poliatômica ocorre pela formação de moléculas ionizadas no plasma, ou na região entre o plasma e o analisador de massas, que interferem na detecção do analito de interesse. A formação de óxidos pode ser proveniente do excesso de oxigênio no plasma, isso pode acarretar problemas, como a ligação do analito com oxigênio. A última interferência espectral está relacionada com a formação de íons de dupla carga, sendo que esses íons podem gerar perda de sinal (TAYLOR, 2001; LEUNG, 2016).

As interferências não-espectrais envolvem características da amostra, que são: a viscosidade da amostra, volatilização da amostra, efeito de memória e efeito de matriz. As propriedades da amostra podem modificar a ionização dos analitos no plasma e no método de introdução de amostra (TAYLOR, 2001).

A determinação de iodo por ICP-MS ocorre quase livre de interferências (KRENGEL-ROTHENSEE; RICHTER; HEITLAND, 1999). No entanto, alguns autores mostraram que a presença de carbono residual em amostras biológicas (cabelo, leite materno e saliva) que foram solubilizadas em solução alcalina, ou que não foram totalmente digeridas, poderiam acarretar em aumento do sinal de

iodo em suas análises (interferência não-espectral) (MELLO et al., 2013; MESKO et al., 2016; ASTOLFI et al., 2018; NOVO et al., 2019a; NOVO et al., 2019b).

As espécies de carbono (C^+, CO^+, CO_2^+, C_2^+, ArC^+, sendo a primeira a principal fonte) presentes na matriz, podem causar um aumento na transferência de cargas, podendo resultar na melhoria da eficiência da ionização do iodo (GRINDLAY et al., 2013).

Ao avaliar a influência do carbono na ionização de diversos elementos químicos, dentre eles o iodo, Grindlay et al. (2013) mostraram que o carbono proveniente da matriz pode causar um aumento na ionização do analito em questão. Contudo, a interferência na ionização do iodo depende de fatores ligados aos parâmetros de instrumentação do espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), sendo eles: a potência do plasma, a vazão do gás de nebulização e a vazão de introdução da amostra.

GRINDLAY et al. (2013) apontam que alguns parâmetros favorecem a eficiência da ionização do iodo, como por exemplo a potência do plasma de 1400 W, vazão do gás de nebulização menor que 0,95 L min^{-1} e vazão de introdução da amostra em 1 mL min^{-1}.

Em suma, a interferência causada pelo carbono na detecção de iodo está relacionada à quantidade de matriz (carbono) introduzida no plasma. Para diminuir essa interferência, o estudo supracitado sugere adotar os seguintes parametros otimizados para o ICP-MS: potência do plasma menor que 1100 W, vazão do gás de nebulização maior que 0,95 L min^{-1} e vazão de introdução da amostra próxima de 0,2 mL min^{-1} (GRINDLAY et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

São poucos os estudos disponíveis na literatura que visam a determinação de elementos químicos halogênios no cabelo. Devido à essencialidade do iodo para os seres humanos, é de suma importância que se tenha uma metodologia simples e rápida, capaz de ser implementada em rotina de larga escala em laboratórios para biomonitoramento humano, visando análise de um grande número de amostras em menor tempo.

3. OBJETIVO

Desenvolver e validar um método para determinação de iodo em cabelo, empregando solubilização alcalina com TMAH, que seja rápido, simples, de baixo custo e, capaz de ser implementado em rotina de larga escala.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenvolvimento do Estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP).

4.2. Padrões e reagentes

Foi utilizada água ultrapura com resistividade 18.2 MΩ.cm a 25 °C, obtida por meio de sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore RiOs-DITM®, Bedford, MA, EUA). TMAH (hidróxido de tetrametilamônio) 25% (m/v), Iodeto de Potássio e L-cisteina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Os materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 e QM-H-Q1725 obtidos do *Institut Nacional de Santé Publique du Quebec* (INSPQ - *Centre de toxicologie*, Canadá, Québec) foram utilizados para validar o método proposto, na verificação da exatidão e a precisão. Além destes materiais, o material de referência certificado *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549), obtido de NIST (*National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, Maryland, EUA), que possui concentração indicada para iodo, também foi utilizado.

4.3. Otimização dos Parâmetros de Solubilização

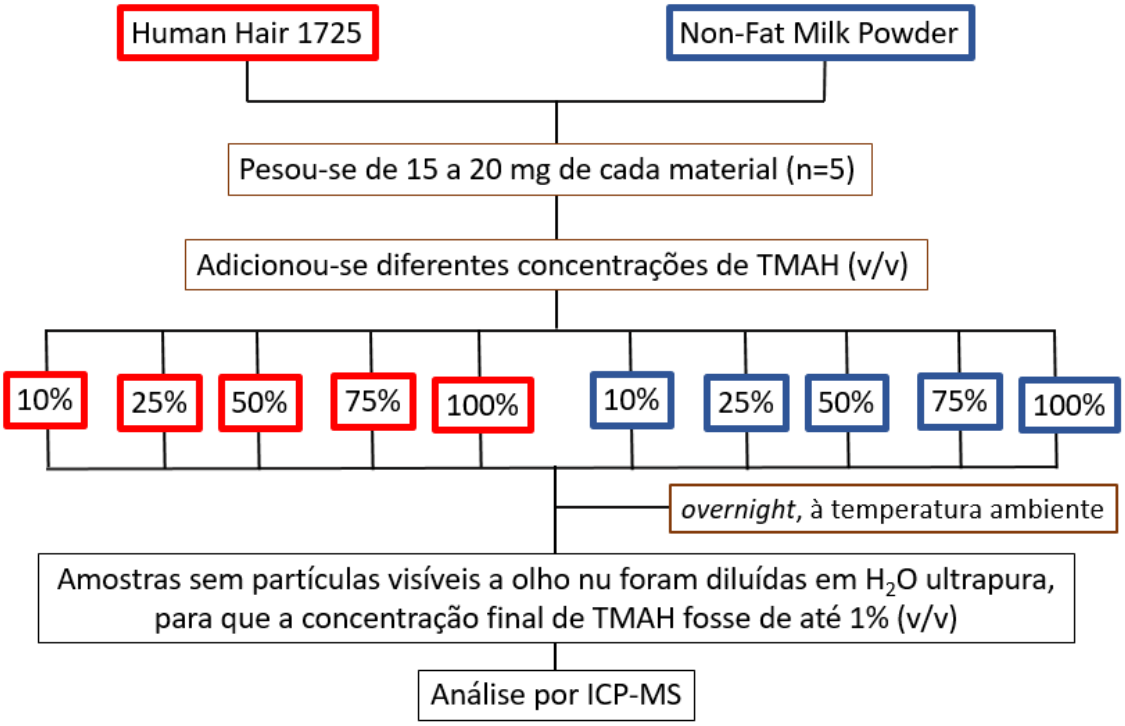
Para a otimização dos parâmetros de solubilização, utilizou-se os materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 e QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549).

As condições ideais de solubilização foram avaliadas quanto a concentração de TMAH necessária para solubilização da matriz, ao tempo necessário para solubilização e a quantidade de amostra necessária para obtenção de precisão e exatidão apropriadas.

4.3.1. Concentração de TMAH para solubilização da matriz

Primeiramente, utilizou-se os materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549) para otimizar a concentração de TMAH (hidróxido de tetrametilamônio) para solubilização, no qual foram testadas as concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100% (v/v), à temperatura ambiente e *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas) (Figura 5). Cada concentração foi obtida através da diluição de TMAH 25% (m/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em água ultrapura. Ressalta-se que o TMAH 25% (m/v) equivale ao TMAH 100% (v/v).

Figura 5: Esquema para avaliação da concentração ideal de TMAH para solubilização da matriz



Fonte: A autora.

Pesou-se de 15 a 20 mg dos materiais de referência em microtubos de polipropileno (2 mL, livre de DNA, DNase, RNase e pirogênio), obtidos da marca KASVI (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Em seguida, foi adicionado em cada tubo 1 mL de TMAH em diferentes concentrações, resultando em um total de 10 tubos.

Após o período de solubilização (*overnight,* correspondente a um período igual ou maior que 14 horas), foi aliquotado uma fração de cada material de referência, acondicionada em microtubo de polipropileno (2 mL, livre de DNA, DNase, RNase e pirogênio), obtidos da marca KASVI (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e o volume foi completado para 1 mL com água ultrapura, resultando em uma diluição que não ultrapassasse 1% (v/v) de TMAH, a fim de diminuir o desgaste dos cones de amostragem, *Skimmer* de platina e *Hyper Skimmer* de alumínio, bem como outros dos componentes de introdução da amostra, seguido de análise por ICP-MS.

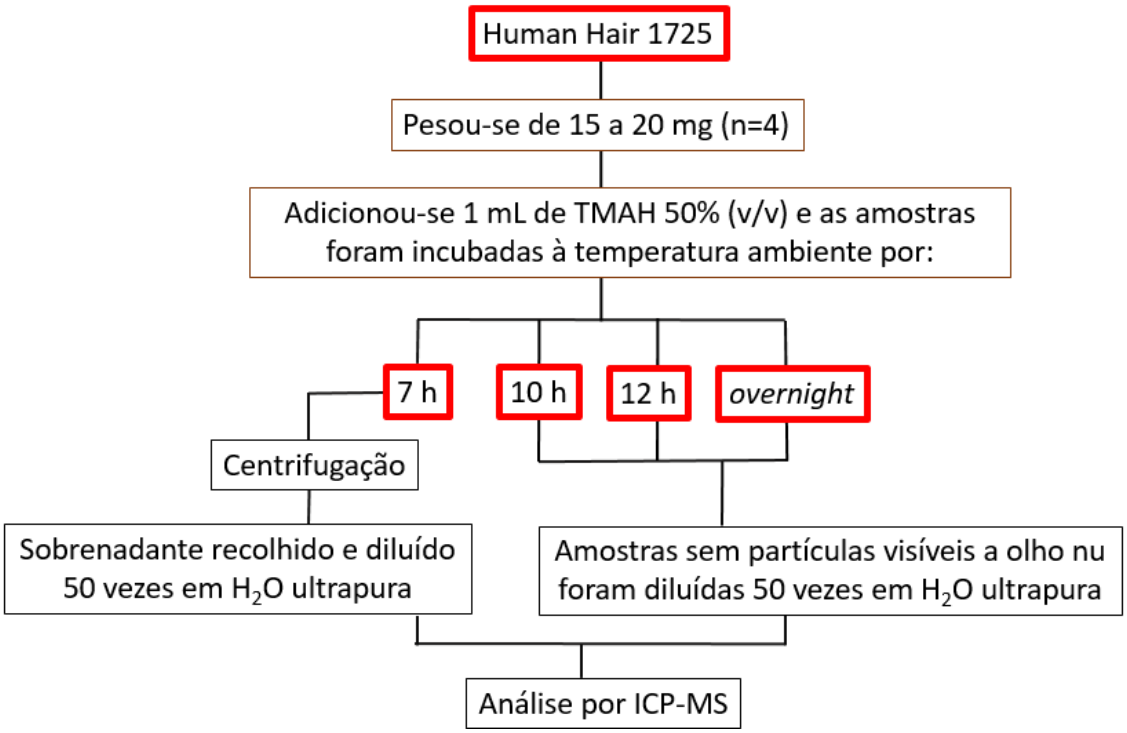
4.3.2. Tempo total de solubilização à temperatura ambiente

Após a verificação da melhor concentração para solubilização da amostra, foi testado o tempo necessário para solubilização da matriz. Para tanto, pesou-se quatro alíquotas do material de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 (de 15 a 20 mg) em microtubo de polipropileno (2 mL, livre de DNA, DNase, RNase e pirogênio), obtidos da marca KASVI (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

À temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de TMAH 50% (v/v) no primeiro tubo (amostra *overnight*, tempo igual ou maior que 14 horas). Após algumas horas, adicionou-se 1 mL de TMAH 50% (v/v) no segundo tubo (amostra 12 horas). Após 2 horas, adicionou-se 1 mL de TMAH 50% (v/v) no terceiro tubo (amostra 10 horas) e, após 3 horas, adicionou-se 1 mL de TMAH 50% (v/v) no quarto tubo (amostra 7 horas).

A amostra 7 horas, que ainda continha partículas visíveis a olho nu, foi submetida a centrifugação e o sobrenadante foi recolhido e diluído 50 vezes em água ultrapura. Os demais materiais foram homogeneizados e diluídos 50 vezes em água ultrapura. Subsequentemente, as amostras foram analisadas por ICP-MS, resultando na análise de quatro diferentes tubos, com os tempos total de solubilização de 7, 10, 12 horas e *overnight* (período igual ou maior que 14 horas) (Figura 6).

Figura 6: Esquema para avaliação do tempo total ideal para solubilização da matriz



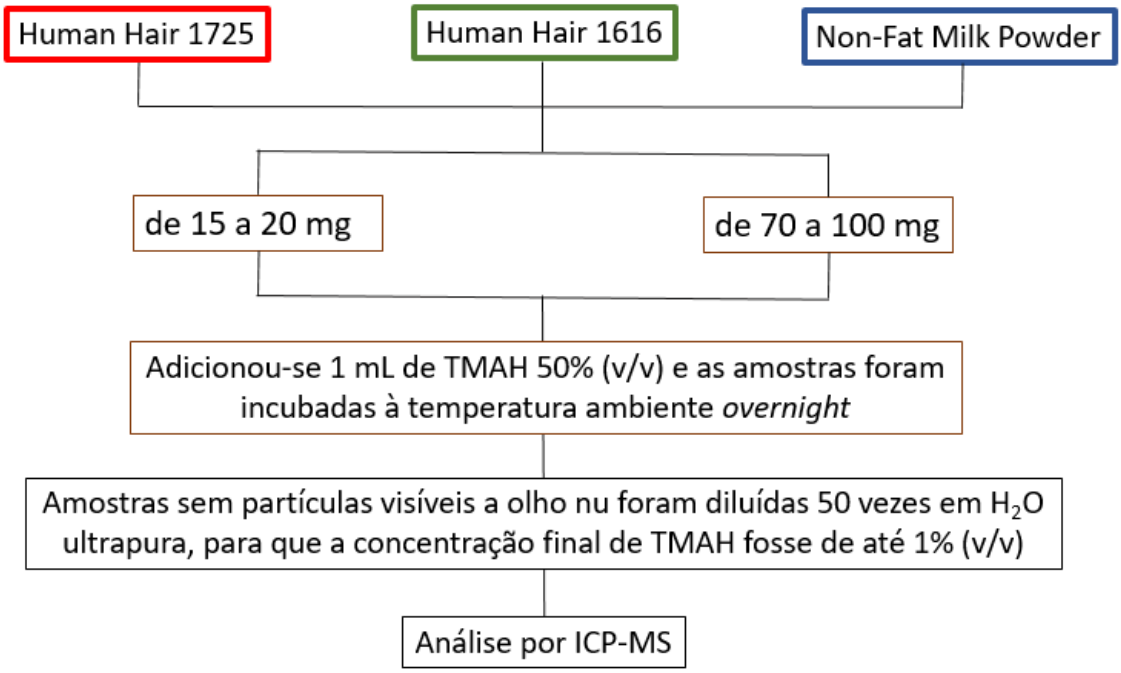
Fonte: A autora.

4.3.3. Avaliação da Influência da massa da amostra

Por fim, após a otimização dos demais parâmetros, realizou-se a avaliação da influência da massa da amostra (Figura 7), em que os materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 e QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549) foram pesados em dois intervalos de massas. Primeiramente, pesou-se em balança analítica entre 15 e 20 mg (intervalo 1) e entre 70 e 100 mg (intervalo 2).

Após a pesagem, adicionou-se 1 mL de TMAH 50% (v/v) e as amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente *overnight* (período igual ou maior que 14 horas). Em seguida, as amostras foram diluídas 50 vezes em água ultrapura, com volume final de 1 mL, em microtubo de polipropileno (2 mL, livre de DNA, DNase, RNase e pirogênio), obtidos da marca KASVI (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), e quantificadas por ICP-MS.

Figura 7: Representação esquemática para avaliação da influência da massa da amostra



Fonte: A autora.

4.4. Preparo das Soluções de Calibração

As soluções de calibração foram preparadas diariamente, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 µg L^{-1}, a partir de solução estoque (1 µg mL^{-1}) do padrão Iodeto de Potássio em meio básico, com adição de TMAH 1% (v/v).

As soluções de calibração utilizadas na avaliação do efeito de matriz são descritas mais detalhadamente no item 4.5.1. deste documento.

4.5. Instrumentação e parâmetros de análise

As análises foram realizadas por meio do equipamento ICP-MS (Espectrômetro de Massas, com Plasma Indutivamente Acoplado) (*PerkinElmer*, NexION® 2000 B, Waltham, EUA). A aquisição e processamento dos dados foram realizados utilizando o *software* Syngistix® 2.4 (*PerkinElmer,* Waltham, EUA).

O instrumento era equipado com câmara de nebulização ciclônica, nebulizador de quartzo ultrapuro, tubo para bomba peristáltica PVC (0,51 mm de diâmetro interno), módulo de introdução de amostras SMARTintro® e cones de amostragem e *Skimmer* de platina e *Hyper Skimmer* de alumínio (obtidos de *PerkinElmer* Waltham, EUA). Argônio com pureza de 99,999% (*Air Liquide*, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a geração do plasma, como gás de nebulização e auxiliar.

Os parâmetros instrumentais foram otimizados diariamente pelo equipamento, a fim de otimizar a sensibilidade e diminuir a formação de óxido e íons dupla carga, sendo a vazão do gás de nebulização o único parâmetro que sofreu alterações nos dias em que foram realizadas as determinações. As condições operacionais estão contidas na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais de operação do ICP-MS

Modelo e Marca	***PerkinElmer* NexION 2000B**
Potência do Plasma (W)	1350
Vazão do gás do plasma (L min^{-1})	18
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	1,2
Vazão de nebulização (L min^{-1})	0,98 a 1,2
Processamento do sinal	Área sobre pico
Tempo de integração (ms)	750
Vazão de introdução da amostra (µL min^{-1})	330
Sweeps	15
Replicatas	3
Isótopo monitorado	Iodo (^{127}I)

Fonte: A autora.

4.6. Parâmetros Analíticos para Validação da Metodologia Proposta

Os parâmetros analíticos para validação da metodologia proposta seguiram recomendações contidas no guia do INMETRO (2016), denominado Orientações sobre validação de métodos analíticos.

4.6.1. O efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado por meio da análise de duas diferentes curvas analíticas: a primeira foi construída com a adição do analito em meio com 1 mg mL^{-1} de L-cisteina e a segunda somente com o analito.

Cada curva de calibração foi construída nas concentrações 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 µg L^{-1}, em triplicatas independentes por nível de concentração, a partir de solução estoque (1 µg mL^{-1}) do padrão Iodeto de Potássio em meio básico, com adição de TMAH 1% (v/v).

4.6.2. Limite de Detecção (LD)

O Limite de Detecção (LD) foi estimado a partir da curva analítica, por meio da equação (1):

$$LD = 3{,}3\ s / b \qquad (1)$$

Onde: s = desvio padrão da resposta da leitura de 10 brancos

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

4.6.3. Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação (LQ) foi estimado a partir da curva analítica, por meio da equação (2):

$$LQ = 10\ s / b \qquad (2)$$

Onde: s = desvio padrão da resposta da leitura de 10 brancos

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

Além disso, o LQ foi multiplicado pela diluição média das amostras, levando-se em conta a massa de cabelo de 20 mg, para fins de comparação com outras técnicas presentes na literatura.

4.6.4. Exatidão

A exatidão foi calculada por meio da recuperação de iodo (3), utilizando-se os materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 e QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549), nos testes de concentração ideal para solubilização da matriz, tempo total para solubilização da matriz e

homogeneidade da amostra. Ademais, a recuperação também foi calculada após a otimização e aplicação de todos os parâmetros em conjunto.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100\ \% \qquad (3)$$

4.6.5. Precisão

A precisão intra-dia do método foi calculada por meio da análise (n=4) dos materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 e QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549), em que se calculou o desvio padrão relativo (DPR) das concentrações obtidas (4). Com a mesma fórmula, foi possível calcular a precisão inter-dia (n=4), utilizando as concentrações de 4 dias.

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100\% \qquad (4)$$

Onde: DP = desvio padrão

CMD = concentração média encontrada.

4.7. Análise do Efeito Residual

A fim de analisar se o método apresentava efeito de memória, foi realizada a análise do efeito residual, que consistiu na injeção de branco (TMAH 1% (v/v)) (n=3), subsequência análise do material de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 (n=8) e, por fim injeção de branco (TMAH 1% (v/v)) (n=3).

4.8. Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos por meio de tabelas e de gráficos, que foram confeccionados por meio do *software* GraphPad Prism® (versão 6.01, EUA).

As inclinações (*slopes*) das curvas analíticas na análise do efeito de matriz, foram comparados por meio do teste ANOVA (Análise de Variância),

aplicando pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, e as recuperações das amostras foram comparadas por meio do teste *t* pareado com 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito de Matriz

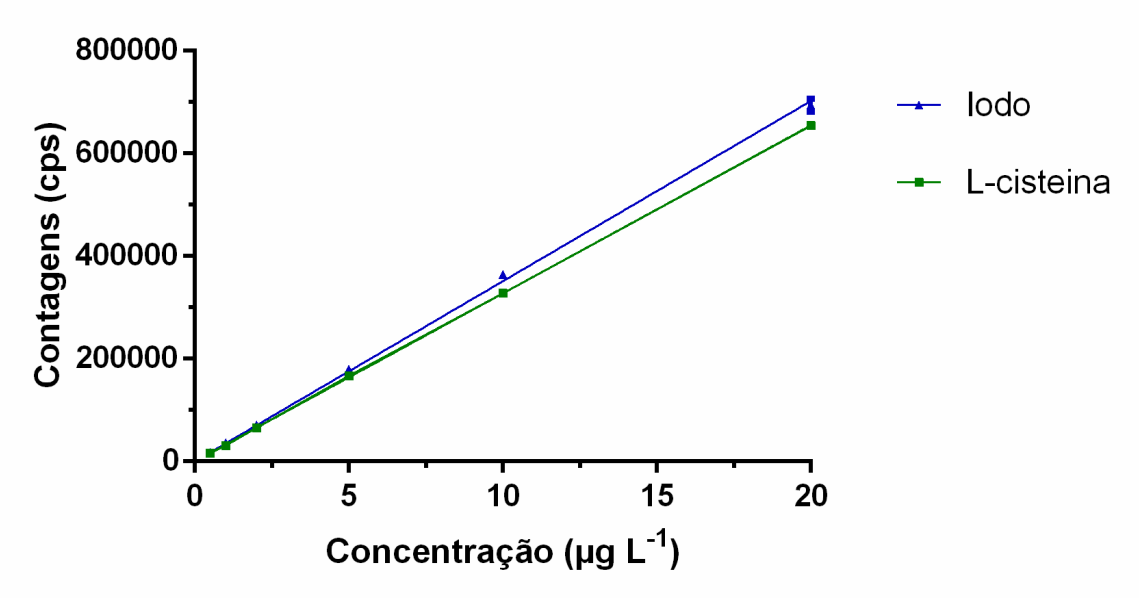
No presente trabalho, a avaliação do efeito de matriz foi realizada para que fosse atestada a possibilidade da calibração ser realizada somente em meio alcalino, sem necessidade de realização de ajuste de matriz. Para tanto, foram construídas duas diferentes curvas, sendo uma com L-cisteina e a segunda somente com o analito para averiguar se os componentes da matriz influenciavam na detecção e quantificação do iodo em cabelo.

A utilização da L-cisteina para realizar o ajuste de matriz foi proposta por Rodrigues e colaboradores (2008a; 2008b) na determinação de vários elementos químicos, com a justificativa de que o cabelo possui uma grande quantidade de enxofre. A presença do enxofre se faz na cisteina, aminoácido que está na estrutura da proteína queratina.

Assim, alguns elementos químicos possuem ligações químicas dissulfeto com o enxofre, presente nas moléculas de cisteina. Em síntese, a presença do enxofre poderia interferir na determinação do iodo no cabelo por ICP-MS.

Para avaliar o efeito de matriz, foram construídas duas diferentes curvas. A primeira foi construída a partir da adição somente do analito, sem a matriz; a segunda continha o analito, adicionado de 1 mg mL^{-1} de L-cisteina em cada ponto. Cada curva de calibração foi construída nas concentrações 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 µg L^{-1}, em triplicatas independentes por nível de concentração. Foi obtida a média das triplicatas de cada nível das três curvas e os dados estão na Figura 8.

Figura 8: Avaliação do efeito de matriz. Os dados estão representados em média ± desvio padrão. Equações: Curva somente iodo: y = 35117 x; curva L-cisteina: y = 32749 x



Fonte: A autora.

A partir da análise estatística, por meio do teste ANOVA (Análise de Variância), aplicando pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, pode-se comprovar que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) entre as duas curvas, podendo, assim, ser utilizada qualquer uma das duas para calibração, com a finalidade de detectar e quantificar o iodo no cabelo.

A curva contendo somente o analito em TMAH 1% (v/v) foi escolhida para prosseguir com os demais testes, por ser mais fácil de ser construída, já que foi constatado que não se faz necessária a utilização de L-cisteina para realização do ajuste de matriz.

5.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para constatar a menor concentração que pode ser detectada (LD) e a menor concentração que pode ser quantificada (LQ), foi realizada a análise da leitura de 10 brancos. O branco era constituído por TMAH 1% (v/v), em água ultrapura. Posteriormente, os cálculos foram realizados a partir da curva analítica escolhida a partir do teste de efeito de matriz (curva somente com iodo), sendo

que os Limites de Detecção e de Quantificação foram, respectivamente, 1,56 x 10^{-5} µg g^{-1} e 4,72 x 10^{-5} µg g^{-1}.

O limite de detecção foi de 0,04 µg g^{-1} e o limite de quantificação foi de 0,12 µg g^{-1}, para amostras de 20 mg. Assim, o método proposto é capaz de detectar pequenas concentrações do analito na matriz em questão e atende ao objetivo que se propõe (análise de iodo em cabelo), já que o LQ é menor que as concentrações do analito em geral encontradas nesta matriz, como as concentrações encontrada por Novo e colaboradores (2019b) (0,56 a 9,40 µg g^{-1}), Hou e colaboradores (1997) (0,25 a 2,0 µg g^{-1}), Faghihian e Rahbarnia (2002) (0,13 a 2,45 µg g^{-1}) e Gorbachev, Skalny e Koubassov (2007) (0,15 µg g^{-1}).

5.3. Parâmetros de Solubilização

5.3.1. Concentração de TMAH para solubilização da matriz

No presente estudo, foi considerada a concentração de TMAH necessária para solubilização das amostras. Foram testadas as concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100% (v/v). Para tanto, foram utilizados os materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549). Pesou-se de 15 a 20 mg dos materiais de referência em microtubos de polipropileno (2 mL, livre de DNA, DNase, RNase e pirogênio, marca KASVI). Em seguida, foi adicionado 1 mL de TMAH, sendo que para cada tubo utilizou-se uma das concentrações de TMAH em estudo.

Previamente às análises por ICP-MS e após a solubilização *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas) à temperatura ambiente, foi realizada uma análise visual, para observar se as amostras ainda continhas partículas a olho nu. Essas amostras não foram analisadas, para evitar o entupimento do sistema de introdução de amostra do equipamento. Os resultados da análise visual estão contidos na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração de TMAH para solubilização de 15 a 20 mg de matriz, *overnight*

Material de Referência	Matriz	Concentração de TMAH (v/v)	Partículas a olho nu?
QM-H-Q1725	Cabelo Humano	10%	Sim
		25%	Sim
		50%	Não
		75%	Não
		100%	Não
Non-Fat Milk Powder	Leite	10%	Não
		25%	Não
		50%	Não
		75%	Não
		100%	Não

Fonte: A autora.

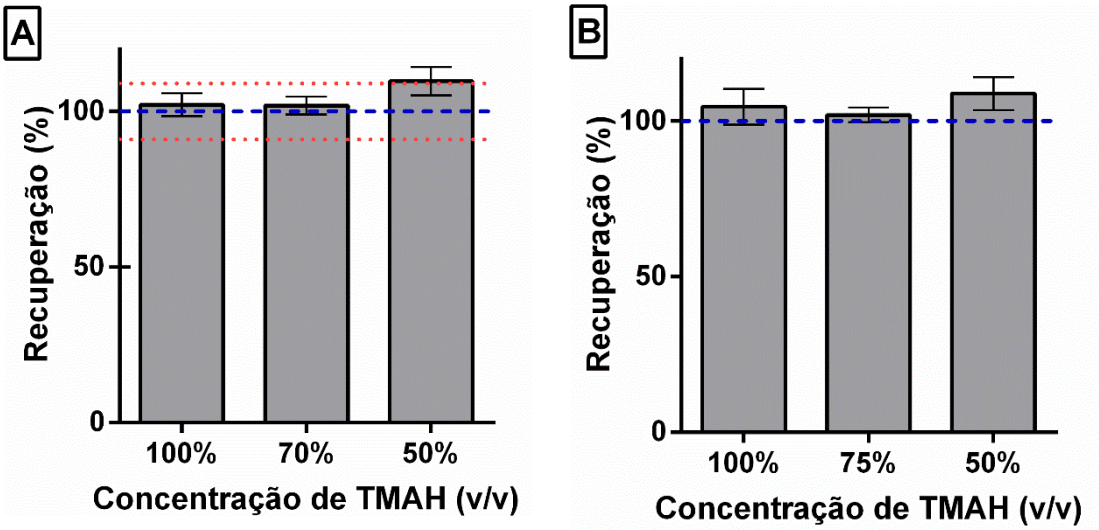
Por aparentemente apresentar menor tamanho de partículas, o *Non-Fat Milk Powder* solubilizou com a adição de todas as concentrações de TMAH. No entanto, para o cabelo, somente as concentrações de 50, 75 e 100% (v/v) de TMAH foram capazes de promover a ausência de partículas a olho nu nas amostras.

Esses eventos observados experimentalmente corroboram com os resultados obtidos por Rädlinger e Heumann (1998) e Fecher, Goldmann e Nagengast (1998), que realizaram solubilização alcalina com TMAH 25% (m/v) (equivalente a TMAH 100% (v/v)) em amostras de alimentos, com emprego de temperatura (90 °C por 3 h) e observaram que amostras que possuem partículas grandes ou com ampla faixa de distribuição de tamanho não ficam em contato da forma correta com o líquido solubilizador/extrator, o que dificulta o processo de solubilização, resultando em baixa recuperação (OLIVEIRA; TREVIZAN; NOBREGA, 2010).

Ressalta-se que os materiais de referência são comercializados homogeneizados. Contudo, os fabricantes não informam o tamanho de partícula dos materiais.

Após ponderar o que foi explanado, as amostras que foram solubilizadas com as concentrações de 50, 75 e 100% (v/v) foram diluídas em água ultrapura, para que a concentração de TMAH não ultrapasse 1%, a fim de diminuir o desgaste dos cones de amostragem, *Skimmer* de platina e *Hyper Skimmer* de alumínio, bem como outros dos componentes de introdução da amostra, seguido de análise por ICP-MS. As recuperações obtidas com as análises dos materiais de referência solubilizados com as diferentes concentrações de TMAH estão contidos na Figura 9.

Figura 9: Recuperação dos materiais de referências (n=3) (15 a 20 mg) solubilizados com as concentrações de 50, 75 e 100% (v/v) de TMAH *overnight*, sendo (A) Recuperação do Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1725. Linha tracejada azul corresponde à recuperação alvo informada *por* INSPQ (100%). Linhas postilhadas vermelhas correspondem à faixa de recuperação informada por INSPQ (de 91% a 109%); (B) Recuperação do Material de Referência *Non-fat Milk Powder*. Linha tracejada azul corresponde à recuperação alvo informada por NIST (100%)



Fonte: A autora.

Para o material de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 (Figura 9A), o *Institut Nacional de Santé Publique du Quebec* (INSPQ) propõe como faixa aceita de recuperação o intervalo entre 91% e 109%. No presente estudo, obteve-se entre 102 ± 3,7%; 101 ± 2,8%; e 109 ± 4,6%, para as concentrações de TMAH 100%, 75% e 50% (v/v), respectivamente. Assim, ao comparar as

recuperações obtidas com a recuperação informada pelo *Institut Nacional de Santé Publique du Quebec*, por meio do teste *t* pareado, com 95% de confiança, os valores não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

Rodrigues e colaboradores (2008a) utilizaram para a solubilização alcalina de cabelo o TMAH 100% (v/v). Contrapondo-se ao referido estudo, a concentração de TMAH 50% (v/v) foi escolhida para prosseguir com os demais testes, por apresentar resultado satisfatório quanto a análise visual das amostras, ao promover a ausência de partículas a olho nu (Tabela 2), e pela recuperação não apresentar diferença estatística significativa ao ser comparada com a recuperação de referência ($p > 0,05$) no material de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 (Figura 9A).

Quanto ao material de referência *Non-fat Milk Powder* (Figura 9B), obteve-se recuperação de 104 ± 5,7%, 102 ± 2,3% e 108 ± 5,2%, para as concentrações de TMAH 100%, 75% e 50% (v/v), respectivamente. Considerando-se a recuperação alvo de 100%, informada por *National Institute of Standards and Technology* (NIST), a recuperação obtida mostrou-se satisfatória.

A predileção pela concentração de TMAH em questão apresenta algumas vantagens, dentre elas: a diminuição da quantidade de reagente utilizado nos testes, gerando economia nas análises, e a necessidade de diluir menos a amostra, para que a concentração final de TMAH fique em 1% (v/v), sendo a última necessária para que diminua o desgaste dos cones e aumente a vida útil dos mesmos.

5.3.2. Tempo total de solubilização à temperatura ambiente

A partir do teste anterior (Concentração de TMAH para solubilização da matriz), foram pesadas quatro alíquotas de 15 a 20 mg do material de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 em microtubos de polipropileno (2 mL, livre de DNA, DNase, RNase e pirogênio, marca KASVI).

À temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de TMAH 50% (v/v) em cada tubo, avaliando-se os tempos totais de solubilização de 7, 10, 12 horas e *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas). Após esse período, foi realizada uma análise visual e os resultados obtidos estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3: Análise visual do tempo de solubilização da matriz (15 a 20 mg) em TMAH 50% (v/v)

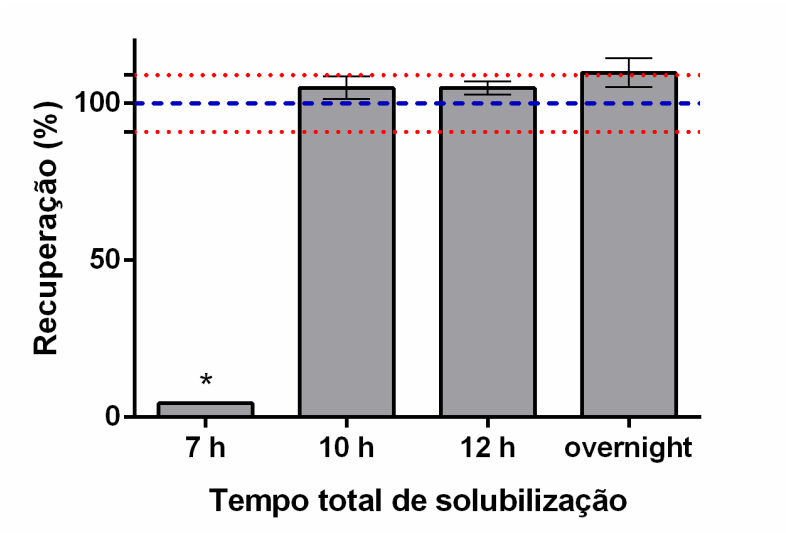
Material de Referência	Matriz	Tempo de solubilização	Partículas a olho nu?
QM-H-Q1725	Cabelo Humano	7 horas	Sim
		10 horas	Não
		12 horas	Não
		Overnight	Não

Fonte: A autora.

Ao final do período de solubilização à temperatura ambiente, a amostra que foi submetida a solubilização por 7 horas ainda continha partículas perceptíveis a olho nu, sendo possível observar pequenos pedaços da amostra. Assim, essa amostra foi submetida a centrifugação e o sobrenadante foi recolhido e diluído 50 vezes em água ultrapura, para ser analisado. Não foram observadas partículas ns amostras dos tempos 10 h, 12 h e *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas), sendo assim, foram homogeneizadas e diluídas 50 vezes em água ultrapura e analisados por ICP-MS, resultando na análise de quatro diferentes tubos. As recuperações obtidas são mostradas na Figura 10.

Antes mesmo da análise da amostra solubilizada por 7 horas, já era de conhecimento que ela não fora solubilizada completamente, o que corroborou com a análise da referida amostra, que apresentou recuperação média igual a 4,46 ± 0,30%. Com esse resultado, foi a única amostra que apresentou diferença estatística significativa na recuperação ($p < 0,05$), ao ser comparada com a recuperação informada por *Institut Nacional de Santé Publique du Quebec* (INSPQ) (Figura 10).

Figura 10: Influência do tempo total de solubilização na recuperação do material de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 (n=3) (15 a 20 mg), solubilizado com 50% (v/v) de TMAH. Linha tracejada azul corresponde à recuperação alvo informada por INSPQ (100%). Linhas postilhadas vermelhas correspondem à faixa de recuperação informada por INSPQ (de 91% a 109%). * Corresponde à diferença estatística (p < 0,05), quando aplicado teste *t* pareado com 95% de confiança



Fonte: A autora.

Os tempos de solubilização de 10 horas, 12 horas e *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas) apresentaram os seguintes valores de recuperação: 105% ± 3,60%; 105% ± 2,08%; 109% ± 4,60%, respectivamente (Figura 10). Quando comparados entre os grupos e com a faixa de recuperação de referência, não apresentaram diferença significativa na recuperação (p > 0,05).

Em razão de todos os tempos de solubilização apresentarem recuperação satisfatória, o tempo total de solubilização *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas) foi escolhido para ser utilizado nos demais testes pela comodidade que apresenta, já que uma grande quantidade de amostras poderia ser preparada no dia anterior às análises. No dia das análises, seria necessário somente a diluição de 50 vezes das amostras em água ultrapura, sem preocupação em cronometrar o tempo total de solubilização.

5.3.3. Avaliação da Influência da massa da amostra

Por ser uma matriz sólida, o cabelo exige a pesagem para seu preparo. Com isso, a determinação da massa a ser pesada é de grande importância, visto que requer uma quantidade mínima de amostra, a fim de não prejudicar a representatividade amostral. Em contraponto, é desejável que não seja uma quantidade grande, para que não prejudique a coleta, já que o cabelo é uma matriz leve, sendo difícil a obtenção de uma grande quantidade de amostra.

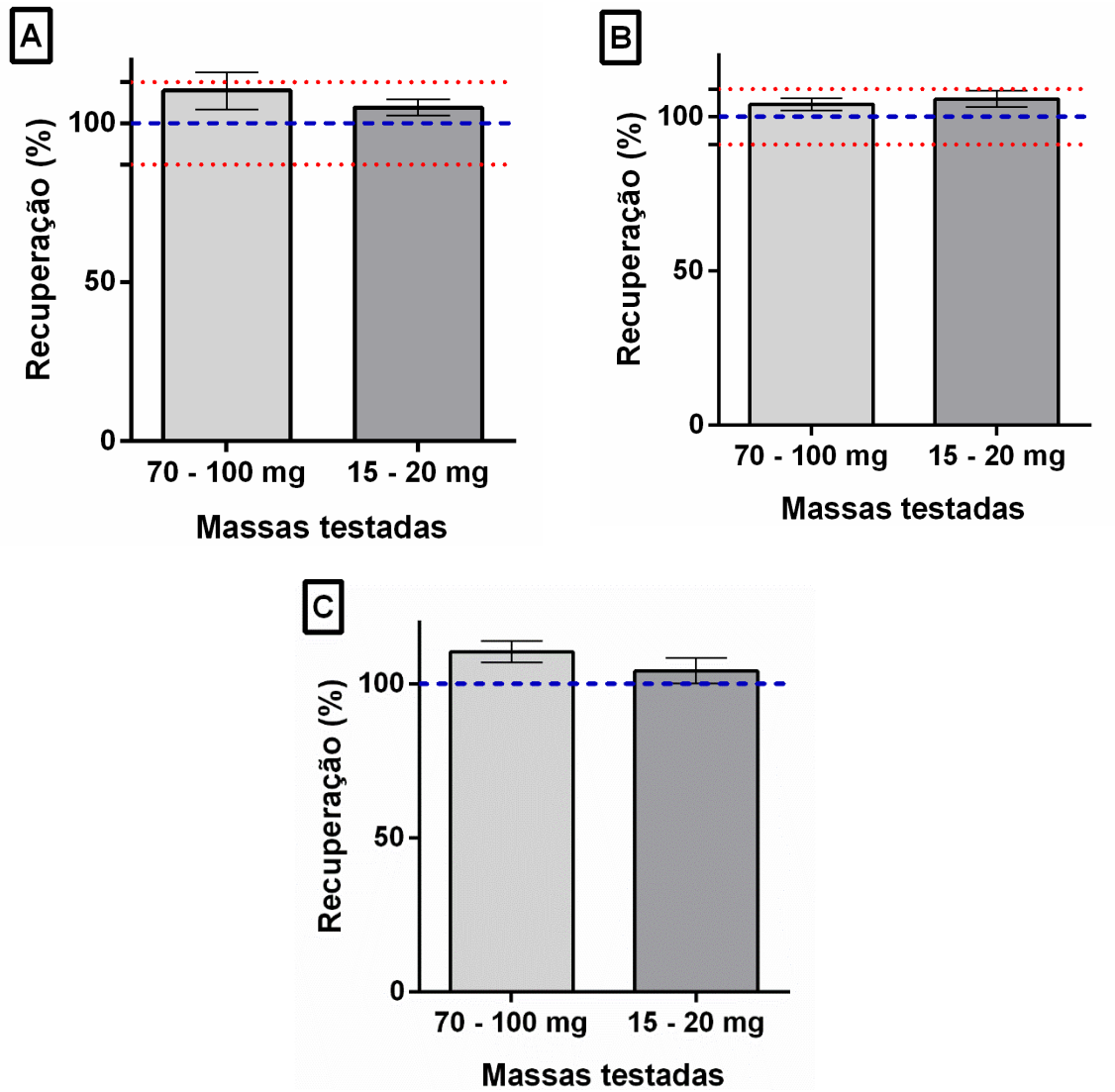
Além disso, amostras que possuem ampla faixa de distribuição de tamanho ou que são muito grandes não ficam em contato da forma correta com o líquido solubilizador, resultando em baixa recuperação (OLIVEIRA; TREVIZAN; NOBREGA, 2010). Com essa informação de que quanto maior a superfície de contato entre o líquido solubilizador e a amostra, melhor a recuperação, elucida-se mais uma vez a importância de diminuir a quantidade de amostra a ser solubilizada.

Por essas razões, é necessário que haja um balanço entre a quantidade de amostra que ficará em contato com o líquido extrator, para que o cabelo seja de fato solubilizado, e que a amostragem seja representativa, a fim de que a massa não influencie negativamente na exatidão e precisão do método.

Para avaliar a influência da massa da amostra, foram novamente usados os materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1616, *Human Hair* QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549). Dois intervalos de massas foram testados: de 15 a 20 mg (intervalo 1) e de 70 a 100 mg (intervalo 2). Os tubos receberam 1 mL de TMAH 50% (v/v) e os materiais foram solubilizados a temperatura ambiente *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas). Em seguida, as amostras foram diluídas e analisadas pela técnica proposta. Os resultados obtidos estão contidos na Figura 11.

Vale ressaltar novamente que os materiais de referência são comercializados homogeneizados. Contudo, os fabricantes não informam o tamanho de partícula dos materiais.

Figura 11: Influência da massa na recuperação de iodo nos materiais de referência, sendo (A) Recuperação no Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1616 solubilizado com 50% (v/v) de TMAH *overnight*; (B) Recuperação no Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1725 solubilizado com 50% (v/v) de TMAH *overnight*. Linhas tracejadas azuis correspondem às recuperações alvos informadas por INSPQ (100%). Linhas pontilhadas vermelhas correspondem a faixa de recuperação informada por INSPQ, sendo (A) de 87% a 113% e (B) de 91% a 109%; (C) Recuperação no Material de Referência *Non-Fat Milk Powder*, solubilizado com 50% (v/v) de TMAH *overnight.* Linha tracejada corresponde a recuperação alvo informada por NIST (100%)



Fonte: A autora.

O material de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 (Figura 11A) apresentou recuperação média de 110% ± 5,81% para massa entre 70 e 100 mg e 104% ± 2,52% para massa entre 15 e 20 mg. Já o material de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 (Figura 11B) apresentou recuperação média de 104% ± 2,0% para massa entre 70 e 100 mg e 105% ± 2,60 para massa entre 15 e 20 mg. Por fim, o material de referência *Non-Fat Milk Powder* (Figura 11C) apresentou recuperação média de 110% ± 3,45% para massa entre 70 e 100 mg e 104% ± 4,10 para massa entre 15 e 20 mg.

Com análise dos resultados obtidos com as diferentes massas, pode-se concluir que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) entre as amostras pesadas entre 15 e 20 mg e as amostras que foram pesadas entre 70 e 100 mg nos materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1725 e *Human Hair* QM-H-Q1616. A recuperação do material de referência *Non-Fat Milk Powder* (NIST-1549) também se mostrou satisfatória para ambas as massas. Assim, a determinação de iodo em cabelo pode ser realizada com uma massa de 15 a 20 mg, desde que a amostra esteja em contato com o TMAH, sem comprometer os resultados.

Esse fato mostra-se vantajoso, já que outros pesquisadores utilizaram massas maiores na análise de cabelo, não somente para iodo. Rodrigues e colaboradores (2008a), em seu desenvolvimento metodológico para análise multielementar em cabelo, em que em seu preparo de amostra utilizava solubilização alcalina com TMAH à temperatura ambiente, utilizou de 50 a 100 mg de amostra. Para deteminação de iodo e bromo em cabelo, Novo e colaboradores (2019b) utilizaram massas da ordem de 50 a 400 mg de amostra.

Em razão do crescimento do cabelo ser de 1 cm ao mês, o fracionamento do mesmo de 1 em 1 cm, possibilita uma análise da concentração de iodo no corpo ao longo de meses ou até anos (ATSDR, 2001; TOBIN, 2005; ROBBINS, 2012). Com essa informação, é conveniente e desejável que o método escolhido utilize a menor massa de amostra possível, já que dificilmente uma mecha de cabelo de 1 cm atingirá massas superiores a 25-30 mg.

Essa informação corrobora com a aplicação da metodologia com amostras reais, realizada por Rodrigues e colaboradores (2008b), em que coletaram 1 cm de cabelo da região próxima ao couro cabeludo dos indivíduos, utilizando cerca de 20 mg de amostra. As amostras foram coletadas da região

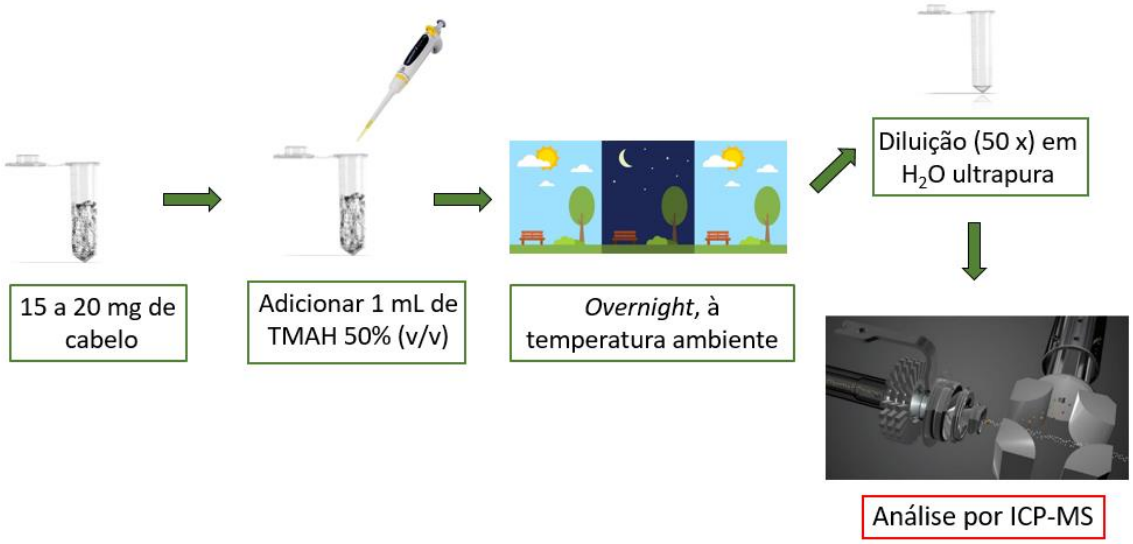
próxima ao couro cabeludo para que fosse estabelecida uma conexão temporal com as demais análises que foram realizadas no plasma e no sangue.

Constata-se, portanto, que a utilização de metodologias que requerem o uso de massas altas na análise de cabelo são inviáveis, quando o estudo visa a análise da excreção mês a mês do analito, pois a coleta seria de 1 cm de cabelo.

5.4. Condições otimizadas do método proposto

Após analisar a otimização dos parâmetros de solubilização, e ao variar um parâmetro de solubilização por vez, obteve-se resultados satisfatórios quanto a recuperação de iodo nos materiais de referência utilizados. Com isso, ao considerar custos de análise, tempo e comodidade, a determinação de iodo em cabelo deve ser realizada por meio da solubilização de 15 a 20 mg de amostra, a ser pesada em balança analítica, em microtubos de polipropileno (2 mL), seguida pela adição de 1 mL de TMAH 50% (v/v), previamente diluído em água ultrapura a partir de TMAH 25% (m/v). A amostra deve, então, ser incubada à temperatura ambiente *overnight* (intervalo igual ou maior que 14 horas) (Figura 12).

Figura 12: Representação esquemática das etapas do método proposto para determinação de iodo em cabelo (de 15 a 20 mg) por ICP-MS, empregando solubilização alcalina em TMAH 50% (v/v), à temperatura ambiente *overnight*

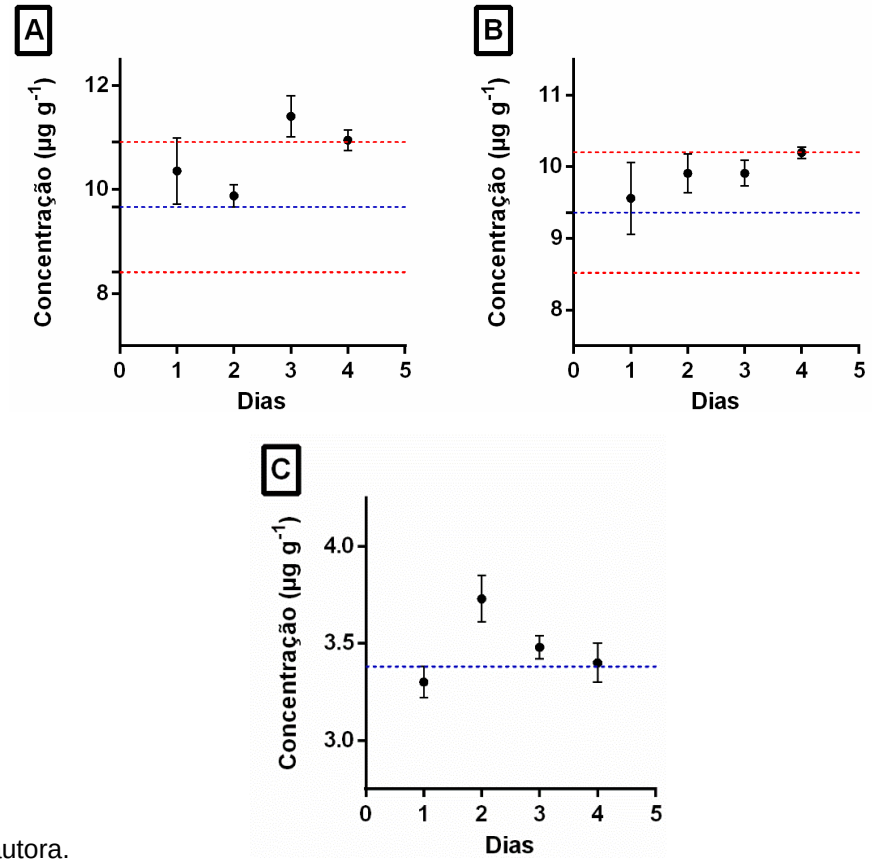


Fonte das imagens: Google Imagens e PerkinElmer (2019). Montagem: a autora.

Após esse período, a amostra é diluída 50 vezes em água ultrapura e, subsequentemente, analisada por espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), com os parâmetros de instrumentação ideais, que estão na seção “4.5. Instrumentação e parâmetros de análise”, a fim de evitar interferências espectrais.

Com a definição da melhor metodologia para determinação de iodo em cabelo, ela foi aplicada por 4 dias (Figura 13) na análise dos materiais de referência *Human Hair* QM-H-Q1616, *Human Hair* QM-H-Q1725 e *Non-Fat Milk Powder,* para estudos de precisão.

Figura 13: Concentração média de iodo ± desvio padrão, obtidos ao longo de 4 dias, solubilização de massa de 15 a 20 mg, com 50% TMAH (v/v) *overnight* dos materiais de referência. (A) Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1616, (B) Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1725. (C) Material de Referência *Non-Fat Milk Powder*. Linhas pontilhadas azuis correspondem à concentração alvo, sendo (A) 9,66 µg g^{-1}, (B) 9,36 µg g^{-1} e (C) 3,38 µg g^{-1}. Linhas pontilhadas vermelhas correspondem à faixa de concentração, sendo (A) 9,66 ± 1,25 µg g^{-1}, (B) 9,36 ± 0,84 µg g^{-1}



Fonte: A autora.

Com a avaliação das concentrações obtidas nos 4 dias de análise, pôde-se calcular a precisão inter e intra dia. Os valores estão na Tabela 4.

Tabela 4: Concentração média de iodo ± desvio padrão, precisão intra-dia (n=4) e inter-dia (n=4). Resultados obtidos ao longo de 4 dias, solubilização de massa de 15 a 20 mg, com 50% TMAH (v/v) *overnight* de: Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1616, Material de Referência *Human Hair* QM-H-Q1725 e Material de Referência *Non-Fat Milk Powder*. Valores de referência: 9,66 ± 1,25 µg g^{-1}, 9,36 ± 0,84 µg g^{-1} e 3,38 µg g^{-1}, respectivamente

Material	Valor encontrado ± SD (µg g^{-1})		Precisão Intra dia	Precisão Inter dia
QM-H-Q1616	Dia 1	10,4 ± 0,64	6,2%	6,3%
	Dia 2	9,9 ± 0,22	2,2%	
	Dia 3	11,4 ± 0,40	3,5%	
	Dia 4	10,9 ± 0,20	1,8%	
QM-H-Q1725	Dia 1	9,6 ± 0,50	5,2%	2,6%
	Dia 2	9,9 ± 0,27	2,7%	
	Dia 3	9,9 ± 0,18	1,8%	
	Dia 4	10,2 ± 0,08	0,8%	
Non-Fat Milk Powder	Dia 1	3,3 ± 0,08	2,4%	5,3%
	Dia 2	3,7 ± 0,12	3,2%	
	Dia 3	3,5 ± 0,06	1,7%	
	Dia 4	3,4 ± 0,10	2,9%	

Fonte: A autora.

Com análise da Tabela 4, conclui-se que a precisão intra dia foi menor que 6,2% e a precisão inter dias menor que 6,3%.

5.5. Comparação da Metodologia Proposta com Metodologias Presentes na Literatura

Novo e seus colaboradores (2019b) analisaram o efeito do carbono na determinação de iodo por ICP-MS. Para tanto, eles adicionaram carbono, por

meio da adição de ácido cítrico, resultando em soluções de diferentes concentrações de carbono. Os autores observaram que concentrações iguais ou acima de 600 mg L^{-1} de carbono na amostra causavam aumento do sinal de iodo.

Por isso, no mesmo estudo, foram realizados diferentes preparos de amostras de cabelo, em que avaliaram a extração assistida por micro-ondas (temperatura máxima de 90 ºC, por 80 minutos), com TMAH (cerca de 4% (v/v)), e a amostra preparada por meio do MIC. A amostra preparada com TMAH apresentou concentração de carbono igual a 2138 ± 233 mg L^{-1}. Contudo, essa amostra não apresentou diferença estatítisca na dosagem de iodo ($p > 0,05$), quando comparada àquela que foi preparada por meio do MIC, porém o desvio padrão relativo (DPR) foi maior (15%), comparado ao DPR do MIC (≤ 7%) (NOVO et al., 2019b).

É importante ressaltar que, mesmo com o emprego de temperatura com o uso do micro-ondas, a concentração de TMAH utilizada foi de apenas cerca de 4% (v/v), o que resultou em uma solubilização parcial da amostra. Os próprios autores ressaltam que foi necessária a filtração da amostra antes da introdução no sistema (NOVO et al., 2019b). Com isso, foi concluído que o preparo com o MIC seria melhor, por diminuir a concentração de carbono na amostra e, consequentemente, apresentar valores de DPR melhores.

Grindlay e seus colaboradores (2013) realizaram um estudo sistemático da influência do carbono na ionização de elementos químicos, na análise por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado. Para isso, foi realizada a adição de soluções fontes de carbono (glicerol, ácido cítrico, dentre outros), em diferentes concentrações. Os pesquisadores observaram que, com mudanças nos parâmetros do espectrômetro de massas, foi possível diminuir o efeito do carbono na dosagem de iodo, pois a magnitude do efeito do carbono está ligada à quantidade de matriz (carbono) introduzida no plasma.

Contrapondo-se ao estudo de Novo e seus colaboradores (2019b), o presente estudo não observou resultados que levem a crer que a determinação de iodo em cabelo necessariamente é prejudicada pela interferência do carbono, corroborando com Grindlay e colaboradores (2013). Esse fato confirma que a determinação de iodo na matriz biológica em questão pode ser realizada sem interferência, desde que seja realizada com os parâmetros ideias do espectrômetro de massas. A Tabela 5 contém os parâmetros do espectrômetro

de massas utilizados ao longo das análises no presente estudo, os utilizados por Novo et al. (2019b) e os parâmetros propostos por Grindlay et al. (2013).

Tabela 5: Comparação dos parâmetros do ICP-MS utilizados no presente estudo, por Novo et al. (2019b) e os propostos por Grindlay et al. (2013)

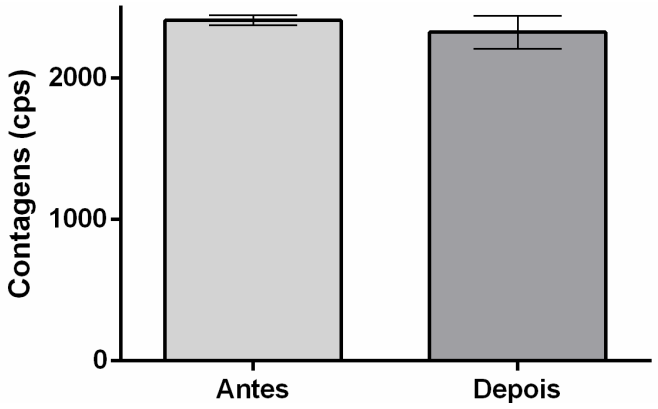
Estudo	**Potência do plasma (W)**	**Vazão do gás de nebulização (L min^{-1})**	**Vazão de introdução da amostra (mL min^{-1})**
Presente estudo	1350	0,98 a 1,2	0,33
Grindlay et al. (2013)	< 1400	> 0,95	Próxima de 0,2
Novo et al. (2019b)	1300	0,95	Não informado

Fonte: A autora.

Novo e seus colaboradores (2019b) também observaram efeito de memória, que, segundo o estudo, é decorrente do acúmulo do analito na interface do equipamento e, por isso, utilizaram entre uma amostra e outra e entre os pontos da curva uma solução de NH_3 para limpeza.

Para analisar um possível efeito de memória, o presente estudo realizou um teste para verificar se de fato o método apresentava efeito residual. A Figura 14 mostra essa análise, em que o branco foi analisado em triplicata, seguido da análise de 8 amostras de concentração alvo 9,66 ± 1,25 µg g^{-1} (material de referência *Human Hair* QM-H-Q1616), e, por último, a análise do branco em triplicata. O material de referência *Human Hair* QM-H-Q1616 foi a amostra analisada que tinha a maior concentração.

Figura 14: Análise do Efeito Residual com análise de branco (n=3), seguida de análise de amostra (n=8), e análise de branco (n=3). Branco é constituído de TMAH 1% (v/v)



Fonte: A autora.

Após a análise estatística (teste *t* pareado, 95% de confiança), não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as contagens dos brancos analisados antes da injeção de 8 amostras e os brancos analisados logo depois das amostras. Com isso, ao contrário do que foi observado por Novo et al. (2019b), não foi observado efeito de memória entre uma amostra e outra no método proposto neste trabalho. O mesmo foi observado após a passagem dos pontos da curva, em que as contagens do branco voltaram para os valores iniciais após uma simples injeção de água ultrapura, seguida de passagem de cinco brancos (TMAH 1% (v/v)).

Assim, ao comparar os parâmetros do espectrômetro de massas utilizados nos três estudos (Tabela 5), pode-se inferir que tanto o efeito de memória, quando a interferência do carbono podem estar ligados com a vazão do gás de nebulização e a vazão de introdução da amostra (não informada pelos autores) utilizadas por Novo e colaboradores (2019b).

Consequentemente, a necessidade do uso de MIC e todo o aparato ligado ao preparo de amostra, como a prensa hidráulica, não é necessária, posto que é mais fácil modifcar os parâmetros espectrais do ICP-MS, ao invés de adicionar mais etapas de preparo de amostra. Além disso, uma etapa de limpeza entre as injeções de amostra no ICP-MS com solução de NH_3 é também desnecessária, já que os três primeiros brancos e os três subsequentes analisados, após a passagem de amostra, não apresentam diferença estatística ($p > 0,05$).

A Tabela 6 mostra algumas características analíticas da presente metodologia e da metodologia desenvolvida por Novo e seus colaboradores (2019b) para determinação de iodo por ICP-MS.

Tabela 6: Comparação diferentes preparos de amostra para dosagem de iodo em cabelo

Variáveis	Método proposto	Novo et al. (2019b)
Massa de amostra (mg)	15 a 20	50 a 400
Método de Preparo de amostra	Solubilização alcalina (TMAH 50% (v/v))	MIC (combustão induzida por micro-ondas)
Tempo de preparo de amostras	*Overnight* para todas as amostras (capacidade analítica de 400 amostras/dia)	(média de 2 amostras/hora)
LQ	120 ng g^{-1} para 20 mg de amostra	10 ng g^{-1} para 300 mg de amostra; 80 ng g^{-1} para 50 mg de amostra
Precisao entre dias (%)	≤ 6,3	≤ 7
Recuperação (%)	102 a 107	94 a 102

Fonte: A autora.

Como pode ser observado o método aqui proposto para determinação de iodo em cabelo por ICP-MS apresenta algumas vantages, em comparação ao método desenvolvido por Novo e colaboradores (2019b):

(i)- uma menor massa de cabelo requerida para análise, entre 15 e 20 mg, o que favorece determinações de iodo em segmentos de cabelo de 1 cm. A quantidade de amostra requerida para ser moída em um moinho de facas e a massa a ser prensada pela prensa hidráulica (50 a 400 mg), como proposto por Novo e

colaboradores (2019b), é muito superior ao que se consegue coletar em 1 cm de cabelo em rotina (em geral < 25 mg).

(ii)-solubilização alcalina simples com 400 amostras analisadas por dia;

(iii)-Limite de quantificação do método da ordem de 120 ng g^{-1} para 20 mg de amostra e,

(iv)- precisão entre dias < 6,3%.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o método proposto atingiu seu objetivo principal: uma metodologia rápida e simples e que facilmente pode ser implantada em rotina em um laboratório de biomonitoramento humano, que possua em sua infraestrutura um ICP-MS. Os custos de análise se reduzem pela maior quantidade de amostras analisadas em um determinado tempo. O método também elimina a necessidade de qualquer outro acessório para o preparo das amostras. A quantidade de cabelo requerida é de 15 a 20 mg para as análises. Este é um fator essencial nos estudos de biomonitoramento humano com uso de matriz cabelo, já que a análise de cabelo é temporal e é realizada com fracionamento da amostra em segmentos de 1 em 1 cm.

Futuramente, espera-se que essa metodologia seja aplicada em rotina na determinação de iodo em cabelo, com a finalidade de estabelecer valores de referência do analito nessa matriz em diversas populações, já que estes dados são ainda bem escassos na literatura. Além disso, comparar os valores obtidos no cabelo e na urina de uma mesma população é fundamental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. L. D.; GABARRA, M. H. C.; NAVARRO, A. M. Comparison of Iodine Concentrations in Kitchen Salt and Urine with the Thyroid Volume of Schoolchildren from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil: Warning of Worsening After 10 Years of Study. **Thyroid**, v. 28, n. 12, p. 1694-1701, 2018.

ASTOLFI, M. L. et al. Optimization and validation of a fast digestion method for the determination of major and trace elements in breast milk by ICP-MS. **Analytica chimica acta**, v. 1040, p. 49-62, 2018.

BARBOSA JR, F. et al. Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 8, p. 1000-1005, 2004.

BATISTA, B. L. et al. 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, n. 3, p. 575-579, 2008.

BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica chimica acta**, v. 646, n. 1-2, p. 23-29, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 130, de 26 de maio de 2003. Dispõe sobre o teor de iodo que deve conter o sal destinado ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, nº 101, de 28 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 23, de 24 de abril de 2013. Dispõe sobre o teor de iodo no sal destinado ao consumo humano e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, nº 79, de 25 de abril de 2013.

BULSKA, E.; WAGNER, B. Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2079, p. 20150369, 2016.

CHACHET. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). **ChicAgo Certer for Health and EnvironmenT (CACHET)**. Disponível em: https://cpb-us-w2.wpmucdn.com/voices.uchicago.edu/dist/e/716/files/2019/06/ICPMS-Overview-@UIC.pdf. Acesso em 22 de novembro de 2019, às 11 horas.

CAMPOS, R. O. et al. Iodine nutritional status in Brazil: a meta-analysis of all studies performed in the country pinpoints to an insufficient evaluation and heterogeneity. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 1, p. 13-22, 2015.

CARNEIRO, M. F. H. et al. Assessment of trace elements in scalp hair of a young urban population in Brazil. **Biological trace element research**, v. 143, n. 2, p. 815-824, 2011.

CARVALHO, A. L. et al. Excessive iodine intake in schoolchildren. **European journal of nutrition**, v. 51, n. 5, p. 557-562, 2012.

CORCINO, C. M. et al. Variation of iodine status during pregnancy and its associations with thyroid function in women from Rio de Janeiro, Brazil. **Public health nutrition**, v. 22, n. 7, p. 1232-1240, 2019.

COSTANZO, L. S. Capítulo 9: Fisiologia Endócrina. **Fisiologia**. Elsevier Brasil, Saunders, 3ª edição, p. 379-408, 2007.

DE CARVALHO, G. G. A. et al. Total and inorganic mercury determination in fish tissue by flow injection cold vapour atomic fluorescence spectrometry. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, v. 90, n. 9, p. 686-696, 2010.

DE ESCOBAR, G. M.; OBREGÓN, M. J.; DEL REY, F. E. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 18, n. 2, p. 225-248, 2004.

DE ESCOBAR, G. M.; OBREGÓN, M. J.; DEL REY, F. E. Iodine deficiency and brain development in the first half of pregnancy. **Public health nutrition**, v. 10, n. 12A, p. 1554-1570, 2007.

DELANGE, F. Iodine requirements during pregnancy, lactation and the neonatal period and indicators of optimal iodine nutrition. **Public health nutrition**, v. 10, n. 12A, p. 1571-1580, 2007.

DE LIMA, L. F.; BARBOSA JR., F.; NAVARRO, A. M. Excess iodinuria in infants and its relation to the iodine in maternal milk. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, n. 3, p. 221-225, 2013.

DRESSLER, V. L. et al. Biomonitoring of essential and toxic metals in single hair using on-line solution-based calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1770-1777, 2010.

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, n. 3, p. 427-430, 2002.

FECHER, P. A.; GOLDMANN, I.; NAGENGAST, A. Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, n. 9, p. 977-982, 1998.

FERREIRA, S. M. S. et al. Iodine insufficiency in pregnant women from the State of São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 3, p. 282-287, 2014.

GORBACHEV, A. L.; SKALNY, A. V.; KOUBASSOV, R. V. Bioelement effects on thyroid gland in children living in iodine-adequate territory. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 56-58, 2007.

GRINDLAY, G. et al. 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: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 42-49, 2013.

HILTERHAUS-BONG, S.; ZAHN, H. Contributions to the chemistry of human hair. 1. Analyses of cystine, cysteine and cystine oxides in untreated human hair. **International journal of cosmetic science**, v. 9, n. 3, p. 101-110, 1987.

HOU, X. et al. Determination of bromine and iodine in normal tissues from Beijing healthy adults. **Biological trace element research**, v. 56, n. 2, p. 225-230, 1997.

HUYNH, D. et al. Validation of an optimized method for the determination of iodine in human breast milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) after tetramethylammonium hydroxide extraction. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 75-82, 2015.

INMETRO. COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO, Orientação sobre Validação de métodos analíticos, **DOQ-CGCRE-008**. Revisão 05, agosto de 2016.

International Atomic Energy Agency (IAEA). Health-related monitoring of trace element pollutants using nuclear techniques. **IAEA, VIENNA**, 1985.

JAHREIS, G. et al. Bioavailability of iodine from normal diets rich in dairy products-results of balance studies in women. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes**, v. 109, n. 03, p. 163-167, 2001.

KNAPP, G. et al. Iodine determination in biological materials Options for sample preparation and final determination. **Fresenius journal of analytical chemistry**, v. 362, n. 6, p. 508-513, 1998.

KRENGEL-ROTHENSEE, K.; RICHTER, U.; HEITLAND, P. Low-level determination of non-metals (Cl, Br, I, S, P) in waste oils by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using prominent spectral lines in the 130-

190 nm range. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, n. 4, p. 699-702, 1999.

LI, Z. et al. A simultaneous analysis method of polycyclic aromatic hydrocarbons, nicotine, cotinine and metals in human hair. **Environmental pollution**, v. 219, p. 66-71, 2016.

LIM, W. et al. A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35664-35670, 2002.

LIMA, É. C. et al. Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, copper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 995-1000, 2000.

LOESCHNER, K. et al. Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 16, p. 3845-3851, 2014.

LUM, T. S.; LEUNG, K. S.Y. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 5, p. 1078-1088, 2016.

MELLO, P. A. et al. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7615-7642, 2013.

MESKO, M. F. et al. Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: challenges and trends of sample preparation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 6, p. 1243-1261, 2016.

MILHORANSA, P.; VANACOR, R.; FURLANETTO, T. W. Intra-and interindividual iodine excretion in 24 hours in individuals in southern Brazil: a cross-sectional study. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 57, n. 3-4, p. 260-264, 2010.

MIOTO, V. C. B. et al. High prevalence of iodine deficiency in pregnant women living in adequate iodine area. **Endocrine connections**, v. 7, n. 5, p. 762-767, 2018.

MOMČILOVIĆ, B. et al. In search of decoding the syntax of the bioelements in human hair–A critical overview. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 543-553, 2018.

NATH, S. K. et al. Urinary excretion of iodide and fluoride from supplemented food grade salt. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 62, n. 1, p. 66-72, 1992.

NÓBREGA, J. A. et al. Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 465-495, 2006.

NOVO (a), D. L. R. et al. Bromine and iodine determination in human saliva: Challenges in the development of an accurate method. **Talanta**, v. 191, p. 415-421, 2019.

NOVO (b), D. L. R. et al. 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, 2019.

NUNES, J. A. et al. A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cadmium, copper, manganese, nickel, lead, and selenium in blood of the Brazilian population. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 13-14, p. 878-887, 2010.

OHMORI, S. Hair as a monitor for environmental pollution. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry**, v. 84, n. 2, p. 451-459, 1984.

OLIVEIRA, A. A.; TREVIZAN, L. C.; NOBREGA, J. A. Iodine determination by inductively coupled plasma spectrometry. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 6, p. 447-473, 2010.

PERKIN ELMER. TRIPLE QUAD POWER MEETS SINGLE QUAD VERSATILITY. 2019. Disponível em: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO-NexION-2000-ICP-MS-012730_01.pdf. Acesso em 15 de outubro de 2019, às 20 horas.

POPESCU, C.; HÖCKER, H. Hair—the most sophisticated biological composite material. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 8, p. 1282-1291, 2007.

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.

PREJAC, J. et al. A novel concept to derive iodine status of human populations from frequency distrubution properties of hair iodine concentration. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 28, n. 2, p. 205-211, 2014.

RÄDLINGER, G.; HEUMANN, K. G. Iodine determination in food samples using inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 70, n. 11, p. 2221-2224, 1998.

ROBBINS, C. R. Chemical composition of different hair types. In: **Chemical and physical behavior of human hair**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 105-176, 2012.

RODRIGUES (a), J. L. et al. A fast method for the determination of 16 elements in hair samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, n. 7, p. 992-996, 2008.

RODRIGUES (b), J. L. et al. Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. **Science of the Total Environment**, v. 405, n. 1-3, p. 370-376, 2008.

RODRIGUES, J. L. et al. Determination of total and inorganic mercury in whole blood by cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (CV ICP-MS) with alkaline sample preparation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 10, p. 1414-1420, 2009.

RODUSHKIN, I.; AXELSSON, M. D. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part I. Analytical methodology. **Science of the Total Environment**, v. 250, n. 1-3, p. 83-100, 2000.

ROSSI, A. C. et al. Searching for iodine deficiency disorders in schoolchildren from Brazil: the Thyromobil project. **Thyroid**, v. 11, n. 7, p. 661-663, 2001.

ROSSI, A. et al. Determination of thyroid volume by sonography in healthy Brazilian schoolchildren. **Journal of clinical ultrasound**, v. 30, n. 4, p. 226-231, 2002.

SARAIVA, D. A. et al. Iodine status of pregnant women from a coastal Brazilian state after the reduction in recommended iodine concentration in table salt according to governmental requirements. **Nutrition**, v. 53, p. 109-114, 2018.

SCHRAMEL, P. The use of ICP-MS for human biomonitoring. **Analysis of hazardous substances in biological materials**, v. 6, p. 1-45, 1999.

SILVERTHORN, D. U. Unidade 4: Metabolismo, crescimento e envelhecimento. Capítulo 23: Controle endócrino do crescimento e do metabolismo. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**, 7ª edição. Artmed editora, p.736-741, 2010.

SOUZA, M. M. V. M. et al. Autothermal reforming of methane over nickel catalysts prepared from hydrotalcite-like compounds. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 167, p. 451-456, 2007.

TAYLOR, H. E. 1. Introduction. Chapter 5: Sample Introduction. Chapter 7: Quantitation Techniques. Chapter 8: Interferences. **Inductively coupled plasma-mass spectrometry: practices and techniques**. Academic press, p.1-5, 63-74, 125-130, 109-122, 2001.

TOBIN, D. J. Hair in toxicology: an important bio-monitor. **Royal Society of Chemistry**, p. 1-33; 151-152, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Iodine status worldwide – WHO Global Database on Iodine Deficiency. **Department of Nutrition for Health and Development World Health Organization,** 2004. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43010/9241592001.pdf. Acesso em 07 de novembro de 2019, às 20h.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guideline: fortification of food-grade salt with iodine for the prevention and control of iodine deficiency disorders. **Department of Nutrition for Health and Development World Health Organization,** 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/136908/9789241507929_eng.pdf;sequence=1. Acesso em 06 de novembro de 2019, às 17 horas.

ZIMMERMANN, M. B. Iodine deficiency. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 4, p. 376-408, 2009

ZIMMERMANN, M. B.; ANDERSSON, M. Assessment of iodine nutrition in populations: past, present, and future. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 10, p. 553-570, 2012.