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 Moraes

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.

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 tireoidianos 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 literatura. 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 interesting 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, alkaline solution.

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 T_3 e T_4 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 T_3 e T_4 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 tireoide 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 tireoidianos, monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) (COSTANZO, 2007; SILVERTHORN, 2010).

Figura 2: Síntese dos hormônios tireoidianos T3 e T4

Fonte: Silverthorn (2010), com modificações.

A tireoide peroxidase catalisa rapidamente o acoplamento de duas moléculas de DIT, dando origem ao T4. 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 tireoidianos, 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 difícil 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 indivíduo, já que o cabelo cresce cerca de 1 cm por mês (ROBBINS, 2012).

No entanto, são ainda muito escassos os trabalhos que propõem 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 amostra 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 proteica, composta por subunidades de cadeias α -queratina, que é formada por aminoácidos. Esses aminoácidos, sendo o principal a cisteína, 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 plasma e em tecidos, confere grande vantagem para o biomonitoramento humano (SCHRAMMEL, 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 (SCHRAMMEL, 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 (SCHRAMMEL, 1999; TAYLOR, 2001). O ICP-MS NexION® 2000 (*PerkinElmer*, Waltham, EUA) possui a tecnologia LumiCoil®, que não requer o resfriamento da bobina com água ou gás

(PERKIN ELMER, 2019). A presença do plasma dá a capacidade de ionizar, atomizar e excitar o analito a ser analisado (SCHRAMMEL, 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 (SCHRAMMEL, 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 °C 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 (SCHRAMMEL, 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 adição 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-cisteína 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 $0,95 \text{ L min}^{-1}$ 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 parâmetros otimizados para o ICP-MS: potência do plasma menor que 1100 W, vazão do gás de nebulização maior que $0,95 \text{ L min}^{-1}$ e vazão de introdução da amostra próxima de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ (GRINDLAY et al., 2013).

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 ioduria 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 distribution 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.

SCHRAMMEL, 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.