

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO ULTRA-TRAÇO DE BROMO E IODO EM UNHA HUMANA

**DIOGO LA ROSA NOVO¹; ALESSANDRA SCHNEIDER HENN²; FERNANDA
PITT BALBINOT³; ÁLISSON ALINE DA SILVA⁴; MÁRCIA FOSTER MESKO⁵**

¹*Universidade Federal de Pelotas – diogo.la.rosa@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Santa Maria – alessandrahenn@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – fer.p.balbinot@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas - alisson.aline97@hotmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – marciamesko@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Bromo e iodo são elementos que desempenham importantes funções fisiológicas no organismo humano (ROMARÍS-HORTAS et al., 2012). Entretanto, há uma linha tênue entre a essencialidade e a toxicidade desses elementos. As disfunções na glândula tireoide, por exemplo, são efeitos parcialmente relacionados a concentrações inadequadas de bromo e iodo no organismo humano e afetam 4% da população mundial (BSEM, 2019). Contaminantes globais emergentes, frutos de atividades antropogênicas realizadas em grande escala, contribuem para a presença desses elementos no organismo humano (MALARVANNAN et al., 2013). Contudo, o mecanismo de ação do bromo e do iodo no organismo humano, a mobilidade e as rotas metabólicas desses elementos ainda seguem uma incógnita. A análise de amostras biológicas pode ser uma alternativa para a busca dessas informações. Atualmente, amostras biológicas obtidas através de coletas não invasivas vêm sendo amplamente propostas como biomarcadores para contornar as desvantagens da coleta, manipulação e análise do sangue (NOVO et al., 2019a; 2019b; MESKO et al., 2019). Cabelo e unha são amostras que apresentam diversas vantagens frente a outras amostras obtidas de forma não invasiva, como a saliva e a urina, dentre as quais pode-se citar a simplicidade durante a coleta, a elevada estabilidade e a possibilidade de refletir em parte o estado metabólico de longos períodos.

A análise de amostras biológicas pode auxiliar a estabelecer relações importantes entre elementos químicos, doenças e contaminações ambientais. Contudo, apesar da crescente demanda atual, a determinação de bromo e iodo em amostras biológicas é um grande desafio analítico, visto que esses elementos podem ser perdidos na forma de suas espécies voláteis; estão presentes em baixas concentrações em amostras biológicas e há, geralmente, pouca disponibilidade de amostra para a realização da análise (MELLO et al., 2013). A espectrometria de massa de plasma acoplada indutivamente (ICP-MS) é uma importante ferramenta analítica que apresenta elevada sensibilidade e seletividade para a determinação de bromo e iodo nas mais diversas matrizes (MELLO et al., 2013; NOVO et al., 2019a; 2019b). A capacidade de determinação multielementar associada ao sistema de nebulização convencional garante a introdução rápida, fácil e eficiente da amostra no equipamento utilizando um mínimo volume de solução. Contudo, a determinação de bromo e iodo por ICP-MS é considerada um desafio, pois demanda que a amostra esteja na forma de soluções livres de interferentes, o que nem sempre é uma tarefa trivial (MELLO et al., 2013; NOVO et al., 2019a; 2019b). Métodos convencionais de digestão e de extração nem sempre fornecem soluções totalmente compatíveis com a determinação de bromo e iodo por ICP-MS. A acidez e o carbono residual prejudicam de maneira incontestável a exatidão dos resultados.

A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) pode ser uma alternativa promissora para a posterior determinação de bromo e iodo em amostras biológicas por ICP-MS. A eficiente oxidação da matéria orgânica pelas elevadas temperaturas atingidas (aproximadamente 1500 °C) em sistema fechado e a utilização de soluções diluídas corroboram para obtenção de soluções compatíveis com os elementos e com as técnicas de determinação (NOVO et al., 2019a). O uso de materiais inertes auxilia na obtenção de baixos limites de quantificação (LOQs). Recentemente, métodos analíticos utilizando a MIC foram propostos para a posterior determinação de halogênios e enxofre em cabelo e saliva pelo nosso grupo de pesquisa e ambos foram muito bem aceitos pela comunidade científica (MESKO et al., 2019; NOVO et al., 2019a; 2019b). No entanto, ainda existe uma carência de métodos adequados para a determinação de bromo e iodo em unhas humanas. Assim, considerando a demanda atual, esse estudo teve como objetivo desenvolver um método para a determinação de bromo e iodo em unhas humanas. A MIC e a ICP-MS foram propostas para essa finalidade e unhas humanas de voluntários foram analisadas para demonstrar a aplicabilidade do método proposto.

2. METODOLOGIA

Unhas das mãos (pesando individualmente entre 6 mg e 30 mg) de oito voluntários, sem nenhum tipo de restrição, foram coletadas em salões de beleza de Pelotas (RS). As amostras foram coletadas por um profissional do salão com uma tesoura de aço inoxidável e armazenadas em um frasco de polietileno. Outra porção de unhas homogeneizadas (aproximadamente 5 g) foi utilizada para as otimizações do método. As amostras foram lavadas com acetona e água (3 vezes), secas à temperatura ambiente e armazenadas em frascos de polietileno (NOVO et al., 2019a). As amostras foram moídas em moinho de facas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPel (parecer: 2.251.932).

Os métodos de preparo de amostras foram realizados em forno Multiwave 3000® (Anton Paar, Austria). Na MIC, unhas humanas (30 mg a 100 mg), envoltas em filme de polietileno e seladas por aquecimento, foram colocadas na base do suporte de quartzo contendo um disco de papel de filtro previamente umedecido com 50 µL de NH₄NO₃ (6 mol L⁻¹). Os suportes foram introduzidos nos frascos de quartzo contendo 6 mL da solução absorvedora - água ultrapura ou NH₄OH (25, 50 ou 100 mmol L⁻¹) - selecionadas de acordo com estudos anteriores (MELLO et al., 2013; NOVO et al., 2019a; 2019b). Os frascos foram pressurizados com 20 bar de oxigênio e o programa de irradiação microondas utilizado foi 1400 W por 5 min (combustão e refluxo) e 0 W por 20 min (resfriamento). A temperatura e a pressão foram limitadas a 280 °C e 80 bar, respectivamente. Na extração e na digestão, 100 mg de unha e 6 mL da solução extratora (100 mmol L⁻¹ de NH₄OH ou 110 mmol L⁻¹ de hidróxido de tetrametilâmônio - TMAH) ou digestora (14 mol L⁻¹ de HNO₃) foram transferidas para frasco de politetrafluoretileno (PTFE-TFM®). O programa de irradiação micro-ondas foi rampa de 5 minutos até 1000 W, permanecendo 1000 W por 30 minutos e 0 W por 20 minutos. A temperatura e a pressão foram limitadas a 260 °C e 60 bar - exceto para TMAH em que a temperatura foi limitada a 90 °C evitando a sua degradação (NOVO et al., 2019a). As soluções foram avolumadas até 20 mL com água ultrapura. Bromo e iodo foram determinados por ICP-MS e carbono por ICP OES.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, o comportamento da combustão da unha foi cuidadosamente avaliado para evitar danos ao sistema causados pelas chamas e pela pressão

durante a combustão. Para isso, 100 mg de unhas humanas, finamente cominuídas, foi a quantidade máxima utilizada considerando a disponibilidade desse tipo de amostra. Como resultado, a combustão da unha foi considerada completa e segura, considerando a intensidade de chama e a pressão alcançada no sistema de digestão (30% do limite de pressão recomendada pelo fabricante).

A solução mais adequada para a absorver bromo e iodo após a combustão da unha foi avaliada. A concentração de bromo não variou significativamente para todas as soluções avaliadas. Entretanto, o desvio padrão relativo (RSDs) utilizando água (Br: $11,26 \pm 1,82 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 16%) e a solução de 25 mmol L⁻¹ de NH₄OH (Br: $10,95 \pm 1,09 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 10%) foi superior quando comparado com o obtido utilizando 50 mmol L⁻¹ de NH₄OH (Br: $10,55 \pm 0,84 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 8%) e 100 mmol L⁻¹ de NH₄OH (Br: $10,23 \pm 0,65 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 6%). A concentração de iodo utilizando água (I: $1,84 \pm 0,46 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 25%) foi inferior quando comparado com a concentração utilizando as soluções de NH₄OH. Ademais, o RSD utilizando 25 mmol L⁻¹ de NH₄OH (I: $2,84 \pm 0,048 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 17%) foi superior quando comparado com os obtidos utilizando 50 mmol L⁻¹ de NH₄OH (I: $2,73 \pm 0,20 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 7%) e 100 mmol L⁻¹ de NH₄OH (I: $2,66 \pm 0,21 \mu\text{g g}^{-1}$, RSD: 8%). Os elevados RSDs e a concentração inferior de iodo utilizando algumas soluções estão relacionados com à instabilidade de algumas espécies de halogênios em meio ácido (NOVO et al., 2019a; 2019b). O pH final das soluções utilizando água e 25 mmol L⁻¹ de NH₄OH foi sempre inferior a 3, enquanto que o pH da solução utilizando 50 mmol L⁻¹ e 100 mmol L⁻¹ de NH₄OH foi sempre superior a 7. Assim, a solução de NH₄OH 50 mmol L⁻¹ foi selecionada para as demais avaliações.

A exatidão do método proposto foi avaliada através de ensaios de recuperação em dois níveis (50% e 100% da concentração original de bromo e iodo na amostra), utilizando adição de solução padrão, sendo alcançadas recuperações de 95% a 102%. Quando ensaios de recuperação utilizando a mistura de 25 mg de material de referência certificado (CRM NIST 8435, leite integral em pó) com 75 mg de unha foram realizados, recuperações que variaram de 93% a 99% foram obtidas. O RSD foi sempre inferior a 8%. O baixo teor de carbono dissolvido (< 5 mg L⁻¹) e o caráter alcalino das soluções evitaram as interferências durante a etapa de determinação. Diante disso, os LOQs do método proposto (MIC e ICP-MS) foram 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$ para bromo e iodo, respectivamente, permitindo a sua determinação ultra-traço dos analitos em unha.

O desempenho da extração e da digestão assistidas por radiação micro-ondas foi investigado e comparado ao da MIC. As soluções obtidas após a extração apresentaram uma coloração amarela, mesmo após a realização de uma etapa adicional de filtração, indicando a presença de partículas sólidas residuais. A presença de carbono dissolvido ($4605 \pm 867 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando 100 mmol L⁻¹ de NH₄OH, e $3583 \pm 146 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando 110 mmol L⁻¹ de TMAH) exigiu uma etapa de diluição adicional previamente à etapa de determinação (10 vezes) [teor máximo de carbono deve ser inferior a 400 mg L⁻¹ (NOVO et al., 2019a; 2019b)]. As soluções obtidas após a digestão, apesar de apresentarem um aspecto límpido, sem partículas sólidas residuais e com teor de carbono dissolvido relativamente baixo ($273 \pm 72 \text{ mg L}^{-1}$), apresentaram elevada acidez residual necessitando de uma etapa adicional de ajuste de pH com NH₄OH e de diluição (10 vezes) previamente a etapa de determinação. Os LOQs obtidos utilizando a extração (3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para bromo e 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ para iodo com 100 mmol L⁻¹ de NH₄OH e 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ para bromo e 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ para iodo com 110 mmol L⁻¹ de TMAH) e a digestão (2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para bromo e 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ para iodo com 14 mol L⁻¹ HNO₃) foram mais elevados aos obtidos utilizando a MIC (considerando determinação por ICP-MS).

Apesar da concentração de bromo após a extração ter sido similar a obtida após a MIC, o RSD após a extração foi bastante superior (20%) quando comparado ao da MIC (8%). A concentração de iodo na unha após a extração foi sempre inferior aos LOQs. A concentração de bromo e iodo após a digestão foi sempre inferior quando comparada a concentração obtida após a MIC e isso pode estar relacionado a perdas dos elementos na forma de suas espécies voláteis. Assim, a MIC foi considerada adequada para a posterior determinação de bromo e iodo em unha por ICP-MS. Após as otimizações, oito amostras de unhas humanas foram analisadas utilizando o método proposto. A concentração dos analitos nas amostras avaliadas variou de $1,17 \mu\text{g g}^{-1}$ a $3,16 \mu\text{g g}^{-1}$ para bromo e de $0,22 \mu\text{g g}^{-1}$ a $0,72 \mu\text{g g}^{-1}$ para iodo e isso, provavelmente, está relacionado a diferentes hábitos, exposição ambiental e condições de cada organismo. Vale mencionar que o estado clínico das voluntárias não foi avaliado. Os resultados apenas indicam que a concentração desses elementos em amostras biológicas deve ser investigada para avaliações nutricionais, ambientais, medicinais e etc.

4. CONCLUSÕES

A MIC pode ser considerada uma excelente alternativa como método de preparo de amostras para a posterior determinação de bromo e iodo em unhas humanas por ICP-MS. Uma solução totalmente compatível com a ICP-MS permitiu a determinação ultra-traço de bromo e o iodo. As diversas vantagens do método analítico proposto podem ser utilizadas em análises de rotina e também podem ajudar a esclarecer algumas dúvidas relacionadas às suas rotas metabólicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism, **Thyroid**, Acessado 28 ago. 2019. Online. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/tags/Tire%C3%B3ide/>.
- MALARVANNAN, G.; ISOBE, T.; COVACI, A.; PRUDENTE, M.; TANABE, S. Accumulation of brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk and scalp hair from the Philippines: levels, distribution and profiles. **Sci Total Environ.** 442, 366-379, 2013.
- MELLO, P.A.; BARIN, J.S.; DUARTE, F.A.; BIZZI, C.A.; DIEHL, L.O.; MULLER, E.I.; FLORES, E.M.M. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Anal. Bioanal. Chem.** 405, 7615-7642, 2013.
- MESKO, M.F.; PEREIRA, R.M.; SCAGLIONI, P.T.; NOVO, D.L.R. Single analysis of human hair for determining halogens and sulfur after sample preparation based on combustion reaction. **Anal. Bioanal. Chem.** 411, 4873-4881, 2019.
- NOVO, D.L.R.; MELLO, J.E.; RONDAN, F.S.; HENN, A.S.; MELLO, P.A.; MESKO, M.F. Bromine and iodine determination in human saliva: Challenges in the development of an accurate method. **Talanta**, 191, 415-421, 2019.
- NOVO, D.L.R.; PEREIRA, R.M.; HENN, A.S.; COSTA, V.C.; FLORES, E.M.M.; MESKO, M.F. Are there feasible strategies for determining bromine and iodine in human hair using interference-free plasma based-techniques? **Anal. Chim. Acta**. 1060, 45-52, 2019.
- ROMARÍS-HORTAS, V.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Speciation of the bio-available iodine and bromine forms in edible seaweed by high performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**. 745, 24-32, 2012.
- UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2019. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>