



**Vitor Cornaqui Pereira Marrocos**

**Desenvolvimento de método para  
determinação de enxofre em cabelo por  
espectrometria de absorção molecular  
de alta resolução com fonte contínua e  
forno de grafite.**

## **Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Tatiana D. Saint’Pierre

Coorientador: Prof. Fábio Grandis Lepri

Rio de Janeiro

Agosto de 2019



**Vitor Cornaqui Pereira Marrocos**

**Desenvolvimento de método para determinação de enxofre em cabelo por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo.

**Prof.<sup>a</sup> Tatiana Dillenburg Saint'Pierre**  
Orientadora  
Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof. Fábio Grandis Lepri**  
Coorientador  
UFF

**Prof. Ricardo Queiroz Aucélio**  
Departamento de Química – PUC-Rio

**Prof. Jefferson Santos de Gois**  
UERJ

**Dr. Rodrigo Araújo Gonçalves**  
Departamento de Química – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 08 de agosto de 2019

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem a autorização da universidade, do autor e do orientador.

## Vitor Cornaqui Pereira Marrocos

Formou-se em Técnico em Química pela Escola Técnica Rezende-Rammel em 2010. Graduou-se em Química com Orientação Tecnológica pela Fundação Técnico-Educacional Souza Marques (FTESM) em 2016. Desenvolveu sua carreira atuando, em sua maioria, na área de análises físico-químicas de diversos tipos de amostras e no desenvolvimento do projeto nuclear da Marinha do Brasil.

### Ficha Catalográfica

Marrocos, Vitor Cornaqui Pereira

Desenvolvimento de método para determinação de enxofre em cabelo por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite / Vitor Cornaqui Pereira Marrocos; orientadora: Tatiana D. Saint’Pierre ; co-orientador: Fábio Grandis Lepri. – 2019.

79 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2019.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Análise de cabelo. 3. Enxofre. 4. Modificadores químicos. 5. HR-CS GF MAS. I. Saint’Pierre, Tatiana Dillenbourg. II. Lepri, Fábio Grandis. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Para meus pais, Sonia e Claudio, e  
todos aqueles que acreditaram que  
este vitorioso dia chegaria.

## Agradecimentos

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr. Tatiana Dillenburg Saint’Pierre e coorientador Prof. Dr. Fábio Grandis Lepri, por todo suporte, estímulo e parceria para a realização deste trabalho.

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

A CNPq, Central Analítica Pe. Leopoldo Hainberger e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, estrutura e materiais, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos professores da Comissão examinadora.

A Douglas Oliveira, Maurício Dupim, Dr. Rodrigo Gonçalves e Rafael Rocha pelo suporte técnico durante o desenvolvimento deste trabalho, e a todos os professores e funcionários do Departamento pelos ensinamentos e pela ajuda.

Aos meus pais, por todo apoio e suporte incondicional dado ao longo da minha formação pessoal e acadêmica. Sem eles, nada disso estaria sendo possível.

Aos meus padrinhos, por todos os ensinamentos transmitidos e por sempre terem cuidado de mim como um filho.

Aos meus amigos e amigas, Ricardo Maia, Thales Queiroz, Matheus Pierucci, Felipe da Rocha, João Vitor Moraes, Leonardo Tosto, Rodrigo Marques, Lucas Cavaliere, Aline Muguet, André Luiz Nascimento, Jean Colaço, Renan Martins, Igor Siqueira, Rafael Gonçalves, Stephannie Martins, entre tantos outros, por sempre estarem ao meu lado e mostrarem o real significado da amizade.

A meu amigo Gustavo Barud (*in memoriam*), por ter sido um exemplo de perseverança para todos nós, além de uma inspiração na vida acadêmica para mim.

A Larissa Pacheco, por todo respeito e carinho, pelo apoio incondicional quando resolvi ingressar neste mestrado, por ser um exemplo de determinação e por ser a mulher mais incrível que alguém poderia desejar conhecer.

## Resumo

Marrocos, Vitor Cornaqui Pereira; Saint’Pierre, Tatiana Dillenburg; Lepri, Fábio Grandis. **Desenvolvimento de método para determinação de enxofre em cabelo por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite.** Rio de Janeiro, 2019. 79 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

No presente trabalho é proposto o desenvolvimento de um método analítico para determinação de S por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF MAS). As amostras foram preparadas por dissolução ácida e os padrões de calibração, assemelhados à matriz da amostra dissolvida, contendo sulfato, tiourea ou L-cisteína foram estudados em função de suas diferentes estabilidades térmicas. A técnica de HR-CS GF MAS é uma alternativa interessante para determinação de S, pois apresenta alta resolução espectral que minimiza interferências espectrais, pelo uso de um monocromador de alta resolução que permite a separação das linhas de absorção molecular do analito e da matriz, pelo uso do forno de grafite como fonte de atomização, que permite a separação da matriz e do analito antes da etapa de medida do sinal analítico. Com isso, este trabalho tem por objetivo desenvolver um método analítico para determinação de S em amostras de cabelo por HR-CS GF MAS, a fim de avaliar os níveis deste elemento no organismo e compará-los com os resultados obtidos por ICP OES. As condições escolhidas para temperatura de pirólise e de vaporização foram 1000 °C e 2400 °C, respectivamente, utilizando 800 µg de W, como modificador permanente, e 15 µg e 10 µg, respectivamente, de uma mistura de Pd+Mg, como modificador em solução. O valor determinado para a concentração de S no material certificado de referência NCS DC73347a (cabelo humano) está de acordo com o descrito em seu certificado, bem como as concentrações de S determinadas em 14 amostras de cabelo, que estão em concordância com as determinadas por ICP-OES de acordo com teste t-pareado (95 % de confiança), o que comprova a boa exatidão do método proposto.

## Palavras chave

Análise de cabelo; Enxofre; Modificadores químicos; HR-CS GF MAS.

## Abstract

Marrocos, Vitor Cornaqui Pereira; Saint’Pierre, Tatiana Dillenburg (advisor); Lepri, Fábio Grandis (co-advisor). **Development of method for determination of sulfur in hair by high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry and graphite furnace.** Rio de Janeiro, 2019. 79 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

In the presented work it is proposed the development of an analytical method for sulfur determination by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry (HR-CS GF MAS). The samples were prepared by acid dissolution and the calibration standards containing sulfate, thiourea, L-cysteine were studied as a function of their different thermal stabilities and its capability for matrix matching. The HR-CS GF MAS technique is an interesting alternative for sulfur determination, since its capability to perform an interference-free analysis due to its high resolution monochromator that allows to overcome the spectral overlapping and by the use of the graphite furnace as atomizer which minimizes the matrix effects before the analytical measurement. The aim of this work is to develop an analytical method for sulfur determination in hair samples by HR-CS GF MAS, in order to evaluate the levels of this element in the human body and to compare them with the results obtained by ICP OES. The chosen conditions for pyrolysis and vaporization temperatures were 1000 °C and 2400 °C, respectively, using 800 µg of W as permanent modifier combined with 15 µg and 10 µg, respectively, of Pd+Mg mixture as modifier in solution. The value determined for S concentration in the certified reference material NSC DC73347a (human hair) was in agreement with those reported in its certificate, as well as sulfur concentrations determined in 14 hair samples, which are in agreement with those determined by ICP-OES according to the t-paired test (95 % level of confidence), which proves the good accuracy of the proposed method.

## Keywords

Hair analysis; Sulfur; Chemical modifiers; HR-CS GF MAS.

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>15</b>
1.1	Objetivos	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
<b>2</b>	<b>Fundamentação Teórica</b>	<b>18</b>
2.1	Cabelo	18
2.2	Análise de cabelo para determinação elementar	20
2.3	Importância do enxofre no organismo	24
2.4	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS)	28
2.4.1	Histórico	28
2.4.2	Lâmpada de arco curto de Xe	29
2.4.3	Sistemas de atomização	30
2.4.3.1	Modificadores químicos	31
2.4.4	Monocromador de alta resolução	34
2.4.5	Detector	34
2.4.6	Interferências	35
2.4.6.1	Interferências espectrais	35
2.4.6.2	Interferências de matriz	36
2.5	Determinação de S por espectrometria de absorção molecular	37
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>43</b>
3.1	Instrumentação	43
3.2	Materiais e Reagentes	44
3.2.1	Amostragem e preparo das amostras	45
3.2.2	Dissolução das amostras	45
3.3	Modificadores químicos	46
3.4	Análise estatística e tratamento dos dados	47



<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>50</b>
4.1	Otimização do programa de temperatura	50
4.2	Avaliação do uso de modificador químico em solução	54
4.3	Estudo sobre a natureza do padrão de calibração	56
4.4	Determinação de S por HR-CS GF MAS	60
4.4.1	Parâmetros de mérito	61
4.4.2	Análise de amostras e comparação com ICP OES	61
<b>5</b>	<b>Conclusão</b>	<b>67</b>
5.1	Perspectivas	67
<b>6</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>69</b>
	<b>Anexo I</b>	<b>79</b>

## Lista de figuras

Figura 1 - Morfologia do cabelo (adaptada de Popescu & Höcker, 2007)	19
Figura 2 - Ciclo do enxofre no organismo (adaptada de Parcell, 2002)	25
Figura 3 - Ciclo de metabolismo da metionina no organismo. Siglas: SAM – S-adenosilmetionina; SAH – S-adenosilhomocisteína; (1) Metionina adenosiltransferase; (2) Glicina N-metiltransferase; (3) Cistationina $\beta$ -sintase; (4) $\gamma$ -cistationina; (5) Ácido cisteína sulfínico descarboxilase (Adaptado de Townsend et al., 2004)	26
Figura 4 - Esquema do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (adaptada de Welz et al., 2007)	29
Figura 5 - Espectro de absorção da molécula CS. Resultado da transição eletrônica entre os estados $X^1\Sigma^+$ e $A^1\Pi$ destacando-se os comprimentos de onda de 257,961 nm e 258,033 nm utilizados neste trabalho (adaptada de Welz et al., 2005)	38
Figura 6 - Espectro tridimensional da espécie CS do material certificado de referência NCS ZC81002b medido em 258,056 nm (adaptado de Ozbek & Baysal, 2017)	50
Figura 7 - Estudo de temperatura de pirólise e vaporização para a espécie CS em uma amostra de cabelo medido em 258 nm em plataforma: (a) sem e (b) com revestimento de 800 $\mu\text{g}$ de W	51
Figura 8 - Perfis de absorção temporal na temperatura de pirólise de 900 °C (a) e de 1000 °C (b) para uma amostra de cabelo medida em 258,033 nm	52
Figura 9 - Perfis de absorção temporal nas temperaturas de vaporização de 2300 °C (a) e de 2400 °C (b) para uma amostra de cabelo medida em 258,033 nm	52

- Figura 10 - Estudo de volume de modificador Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) em solução, em ambos comprimentos de onda, para amostra de cabelo com concentração de S igual a 45 mg L<sup>-1</sup> 55
- Figura 11 - Perfis de absorção temporal para uma amostra de cabelo, em forno revestido com 800 µg de W, medidos em 257,961 nm (a) e 258,033 nm (b) nas condições de T<sub>p</sub> = 1000 °C e T<sub>v</sub> = 2400 °C 55
- Figura 12 - Perfis de absorção temporal com volume de modificador Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) de 10 µL (a) e de 15 µL (b) para uma amostra de cabelo, medidos em 258,033 nm, em forno revestido com 800 µg de W e em condições de T<sub>p</sub> = 1000 °C e T<sub>v</sub> = 2400 °C 56
- Figura 13 - Estudo de temperatura de pirólise e vaporização das diferentes espécies químicas de S, medidas em 258,033 nm, utilizando forno revestido com 800 µg de W e 10 µL de uma solução de Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) 57
- Figura 14 - Estudo de temperatura de pirólise e vaporização das diferentes espécies química de S, medidas em 258,033 nm, utilizando forno revestido com 800 µg de W 58
- Figura 15 - Curvas analíticas, medidas em 257 nm (a) e 258 nm (b), para as soluções-padrão de tiourea (▲), L-cisteína (■) e sulfato (●) nas condições de T<sub>p</sub> = 1000 °C e T<sub>v</sub> = 2400 °C utilizando 10 µL de Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) em solução e revestimento de 800 µg de W na plataforma 59
- Figura 16 - Gráfico de resíduos das curvas analíticas, medidas em 257 nm (a) e 258 nm (b), para as soluções-padrão de tiourea (▲), L-cisteína (■) e sulfato (●) nas condições de T<sub>p</sub> = 1000 °C e T<sub>v</sub> = 2400 °C utilizando 10 µL de Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) em solução e revestimento de 800 µg de W na plataforma 60
- Figura 17 - Histograma e boxplot da distribuição dos resultados obtidos para determinação de S em cabelo por HR-CS GF MAS e ICP-OES 64

Figura 18 - Distribuição linear das concentrações (em  $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtidas em 257 nm (A), 258 nm (B) e por ICP-OES (C) (a.1, b.1, c.1) e o desvio relativo entre as mesmas (a.2, b.2, c.2) para  $n=14$

65

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Consumo base de aminoácidos sulfurados de acordo com a idade (Adaptada de Parcell, 2002)	25
Tabela 2 - Condições operacionais do ICP OES para determinação de S em cabelo	44
Tabela 3 - Programa de temperatura de revestimento do forno de grafite com solução padrão de W 1000 mg L <sup>-1</sup>	47
Tabela 4 - Avaliação da condição ideal de temperatura de secagem para uma amostra de cabelo com 10 µL de Pd+Mg em solução e revestimento de 800 µg de W na plataforma	53
Tabela 5 - Programa de temperatura para determinação de S via absorção molecular da espécie CS	54
Tabela 6 – Coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ), Slope (s/mg L <sup>-1</sup> ), Limites de detecção e quantificação instrumentais (mg L <sup>-1</sup> ) e valores de F calculado (gL = 4) para as diferentes espécies químicas de S a serem utilizadas para calibração do método em 257 e 258 nm	59
Tabela 7 - Valores de LOD instrumental, LOQ do método e a concentração de S na amostra certificada NCS DC73347a obtidos por HR-CS GF MAS e por ICP OES.	61
Tabela 8 - Resultados das concentrações (em mg kg <sup>-1</sup> ) de S em amostras de cabelo por HR-CS GF MAS e ICP-OES	62

*“O que é um homem sem sonhos?  
Eu nunca vou deixar de sonhar.”*

*(Gustavo Barud, in memoriam)*

# 1

## Introdução

A análise de tecidos e fluidos corporais é a principal forma de determinar a concentração de elementos presentes no organismo humano para os mais diversos propósitos, por exemplo, identificar e elucidar os possíveis danos ao organismo cuja causa esteja relacionada às deficiências ou excessos de certos elementos. Cabelo, sangue e urina, dentre outros, são materiais importantes para investigação dos efeitos do habitat, fontes ocupacionais ou nutricionais, desordens metabólicas ou possíveis envenenamentos do indivíduo. No entanto, a determinação a partir do cabelo é uma forma menos invasiva, em relação a análise sanguínea, que abrange um maior tempo de vida do indivíduo, e geralmente a concentração dos elementos é cerca de 50 a 100 vezes maior quando comparada aos valores encontrados no sangue ou urina. Além disso, é uma matriz menos complexa e mais estável que o sangue, por exemplo, que tende a mostrar um quadro pontual ou recente, e a concentração elementar presente no soro pode não corresponder àquela de todo o organismo, pois as concentrações no sangue são controladas por mecanismo homeostático. (Ozbek & Baysal, 2017; Wołowiec *et al.*, 2013)

Compostos que contém S são essenciais para o organismo e suas principais fontes de consumo na dieta estão associadas às proteínas, formadas por aminoácidos sulfurados tais como metionina, cisteína e taurina, além de enzimas, coenzimas, hormônios e sulfatos inorgânicos (Ozbek & Baysal, 2017; Parcell, 2002). Os aminoácidos sulfurados desempenham um papel importante na manutenção e integridade do sistema celular, por influenciar no estado redox da célula, e sua capacidade de eliminação de compostos tóxicos, radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Em mamíferos, os aminoácidos sulfurados que se destacam são a metionina e a cisteína, cada um contribui para o ciclo celular do S orgânico e, geralmente, para a homeostase do S, bem como desempenham um papel importante no metabolismo. Os sulfatos inorgânicos, obtidos a partir da ingestão ou do metabolismo intracelular de aminoácidos sulfurados, desempenham papel importante no crescimento, desenvolvimento e metabolismo de humanos e outros mamíferos. Por outro lado, radicais sulfatos podem bioativar alguns compostos

relacionados a processos de carcinogênese, como no caso de aminas heterocíclicas (Dawson, 2011; He *et al.*, 2019; Townsend *et al.*, 2004). O consumo diário de S, via aminoácidos, varia de 13 a 25 mg kg<sup>-1</sup> para um adulto, sendo a proteína da carne a principal fonte de ingestão deste elemento. Valores abaixo do recomendado podem acarretar carência de S no organismo que, por sua vez, resultam em unhas e cabelos quebradiços, perda de cabelo e aumento do risco cardíaco, além de outros distúrbios. (Parcell, 2002)

A determinação de S pode ser realizada por diversas técnicas, desde as clássicas, como gravimetria e volumetria, além das instrumentais como espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis e fluorescência de Raio-X, porém, tratando-se de técnicas espectroscópicas, as comumente utilizadas são as espectrometria de emissão ótica ou de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP OES e ICP-MS, respectivamente). (Ozbek & Baysal, 2017) A determinação de S por estas técnicas apresenta algumas limitações, a análise por ICP OES é dificultada devido ao fato de suas linhas de ressonância situarem-se na região de UV de vácuo, abaixo de 180 nm, na qual os gases da atmosfera também absorvem radiação. O mesmo é válido para a técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS), que nos primórdios da determinação de S por esta técnica foi utilizada uma lâmpada de descarga sem eletrodo, para aumentar a quantidade de radiação emitida, ou uma lâmpada de catodo oco de As que emite radiação no comprimento de onda de 206,98 nm, mesma região de absorção da molécula SO<sub>2</sub>. Welz *et al.*, 2007)

Tratando-se da determinação por ICP-MS, existe a interferência isobárica do dímero <sup>16</sup>O<sub>2</sub><sup>+</sup> sobre o isótopo mais abundante do enxofre (<sup>32</sup>S), com abundância relativa de 94,93 %, sendo necessário o uso de instrumentação com célula de reação/colisão para corrigir esta interferência, além do fato do S apresentar alta eletronegatividade e, por consequência, baixa eficiência de ionização no plasma de Ar (cerca de 20 %). Portanto, o uso da espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF MAS) torna-se uma alternativa interessante para determinação de S, por apresentar limites de detecção e quantificação considerados satisfatórios para a determinação do S em diversas matrizes, aliada à menor possibilidade de interferências espectrais devido às suas bandas de absorção molecular com estrutura rotacional fina, entre 257 nm e 259 nm com largura na metade da altura máxima (FWHM, do inglês *full width at half*



*maximum*) semelhantes às linhas de absorção atômica. (Ferreira *et al.*, 2010; Heitmann *et al.*, 2006; Welz *et al.*, 2005)

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é desenvolver um método para determinar S em cabelo humano, utilizando como preparo da amostra a dissolução ácida, e a espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite (HR-CS GF MAS) para quantificação elementar via absorção molecular.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Estudar o comportamento térmico do S em soluções aquosas preparadas a partir de diferentes formas químicas do analito (sulfato, tiourea e L-cisteína), e nas amostras, após dissolução ácida, com curvas de pirólise e vaporização na ausência e presença de diferentes modificadores químicos sob a forma permanente (W) e sua mistura com modificadores em solução (Pd+Mg).

- Avaliar qual a forma química do S mais apropriada para emprego na calibração do método pela medida de curvas analíticas preparadas a partir de padrões aquosos utilizando sulfato, tiourea e L-cisteína.

- Ajustar o programa de temperatura do forno de grafite para a determinação de S, a partir de curvas de pirólise e vaporização, e o uso de diferentes modificadores químicos, tanto sob a forma permanente como em solução, e suas misturas.

- Determinar os parâmetros de mérito (limites de detecção e quantificação, faixa linear, precisão) do método proposto.

- Avaliar a exatidão do método proposto pela análise de material certificado de referência (CRM) de cabelo humano, e também pela comparação estatística dos valores obtidos por HR-CS GF MAS e ICP OES.

## 2 Fundamentação Teórica

Pelo fato de a taxa de crescimento do cabelo ser relativamente, a análise de cabelo torna-se uma alternativa viável para elucidar o estado físico do indivíduo em longo prazo. Por não participar do ciclo homeostático do organismo, a concentração dos elementos no cabelo retrata melhor a condição real do indivíduo quando comparada às amostras de sangue ou urina e, por este fato, as concentrações são de 50 a 100 vezes maiores do que nestas outras duas matrizes. Além disso, a coleta de amostras de cabelo é feita de forma menos invasiva e é uma matriz mais estável. Porém, a análise de cabelo ainda não é considerada uma ferramenta aceitável para estudos de biomonitoramento, já que as condições ambientais do local, dieta, entre outros fatores, dificultam o estabelecimento de padrões de referência. (Ozbek & Baysal, 2017; Pozebon *et al.*, 2017)

### 2.1 Cabelo

Para humanos, o cabelo é notoriamente conhecido como um símbolo de força, poder e beleza, levando a uma preocupação com *status* social e estilo que, por sua vez, alimenta o crescimento contínuo das indústrias de cosméticos. Além disso, o cabelo tem sido objeto de estudo nos últimos anos, a fim de determinar sua morfologia e composição. Sabe-se até então que o cabelo é formado por fibras proteicas organizadas em cadeias de  $\alpha$ -queratinas e subdivida em proteínas fibrosas e globulares. As proteínas fibrosas, ou insolúveis, diferenciam-se das globulares pela sua forma alongada e por desempenharem um papel importante na estrutura da célula animal e em tecidos, na sua grande maioria. A cisteína é o aminoácido mais comum presente nas proteínas do cabelo e é um dos elos, junto a demais aminoácidos, que dá origem às pontes de disulfeto. Estas pontes são responsáveis pela baixa solubilidade e alta estabilidade térmica do cabelo. (Popescu & Höcker, 2007; Pozebon *et al.*, 2017)

A fibra capilar, demonstrada na Figura 1, é um tecido multicelular formado por diferentes componentes que possuem propriedades químicas singulares e, de

modo geral, sua estrutura é composta pela cutícula e córtex - podendo haver ou não a presença de uma medula, sua formação estará relacionada ao tipo de células que formam o cabelo, porém sua presença não interfere nas propriedades mecânicas deste. O córtex é a região que compõe a maior massa estrutural do cabelo e é integrado por células corticais, compostas por macrofibrilas e material intermacrofibrilar, e complexo de membrana celular. As macrofibrilas, por sua vez, são formadas por microfibrilas ricas em queratina e filamentos intermediários – associados a proteínas ou não - que juntos irão compor a matriz intermicrofibrilar contendo restos citoplasmáticos e nucleares. (Carneiro, 1999; Peregrino, 2016; Popescu & Höcker, 2007)

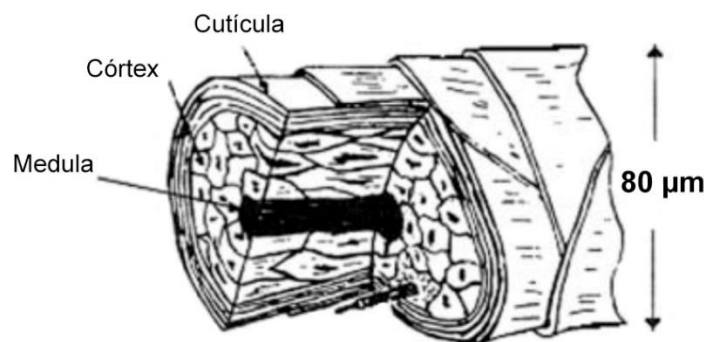


Figura 1 - Morfologia do cabelo (adaptada de Popescu & Höcker, 2007)

A cutícula forma uma camada externa responsável por armazenar a melanina, composto encarregado pela coloração do cabelo, e por proteger o córtex e a medula de possíveis danos causados por tratamentos químicos, exposição excessiva a luz, dentre outros. Cada célula da cutícula é formada por quatro camadas com diferentes teores de disulfetos e ligações isodipeptídicas, encontradas comumente na cisteína, que serão responsáveis pela sua resistência mecânica e característica hidrofóbica, sendo estas: epicutícula, camada A, exocutícula e endocutícula. (Carneiro, 1999; Kintz *et al.*, 2015; Peregrino, 2016; Popescu & Höcker, 2007)

O folículo capilar é o local onde o cabelo irá desenvolver-se, está localizado cerca de 4 mm abaixo da epiderme e estará sempre associado às glândulas sebáceas, no caso de folículos na região da cabeça, e apócrina, encontrada na região da axila e do púbis. A estrutura do folículo capilar é composta por duas camadas, uma externa e outra interna, e o bulbo. A camada externa se encontra mais próxima da

glândula sebácea e é responsável pelo transporte de células que irão promover o crescimento do cabelo e sua pigmentação enquanto a camada interna provê estrutura para a organização celular até a formação do fio cabelo e sua erupção pela derme. (Harkey, 1993; Kintz *et al.*, 2015; Tobin, 2005)

O crescimento do cabelo é dependente de alguns fatores como idade, sexo, gravidez e nutrição, dentre outros, e se dá de forma cíclica dividida em quatro estágios: anágena, catágena, telógena e exógena. A fase anágena – também conhecida como fase de crescimento do folículo capilar – pode durar, em média, de 2 a 6 anos, com uma taxa de crescimento de 10 mm por mês, e ocorre a partir da produção de proteínas no bulbo capilar. A fase catágena, ou estágio de regressão, dura alguns meses e nela ocorre o encerramento da divisão celular e a fibra capilar se descola da papila, assim, o bulbo começa a se degenerar e o folículo emerge em direção a superfície do couro cabeludo. Por fim, a fase telógena, ou fase de repouso, que procede a fase catágena, seguida da fase exógena, onde ocorre a completa expulsão do fio do folículo capilar à medida que um novo fio é formado no bulbo e reiniciando o ciclo. (Carneiro, 1999; Kintz *et al.*, 2015; Peregrino, 2016; Popescu & Höcker, 2007; Pozebon *et al.*, 2017)

## 2.2

### **Análise de cabelo para determinação elementar**

A análise de cabelo remonta ao século XIX, quando houve a preocupação de avaliar a exposição de humanos ao ambiente que viviam. Daí em diante, foi dado início a estudos com objetivo de avaliar se a concentração de elementos encontrados no cabelo refletiria sua real concentração no corpo humano como um todo. No entanto, devido à ausência de valores de referência destas concentrações ocasionado, principalmente, por mudanças de hábitos alimentares, ocupacionais, ambientais - para citar alguns fatores - a análise de urina e sangue ainda eram preferenciais para elaborar esse tipo de diagnóstico. Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e a crescente demanda por análises que pudessem ilustrar, em médio e longo prazo, o perfil de elementos traço em humanos, principalmente para fins nutricionais e toxicológicos, o cabelo tornou-se uma matriz de interesse constante em estudos desenvolvidos a partir da década de 1970. (Pozebon *et al.*, 2017; Wołowiec *et al.*, 2013)

Muito ainda se discute a respeito do emprego do cabelo como um instrumento para biomonitoramento, pois, como citado anteriormente, existem diversos fatores que podem influenciar as concentrações encontradas. Sabe-se que os elementos são incorporados no folículo capilar a partir da interação deles com os grupos tióis dos aminoácidos ou a partir da interação iônica entre cátions e grupos carboxilas presentes na melanina, contudo, torna-se difícil distinguir se a concentração é proveniente de fontes exógenas ou endógenas. Há também pouca concordância sobre o procedimento adotado para o preparo de amostra, incluindo lavagem e dissolução, e valores de referência que podem variar de estudo para estudo. (Popescu & Höcker, 2007; Pozebon *et al.*, 2017)

Um dos trabalhos pioneiros no Brasil foi desenvolvido por Boischio & Barbosa (1993) com o objetivo de quantificar a concentração de mercúrio orgânico em populações ribeirinhas em Rondônia, onde, devido à atividade de garimpo de ouro, grande quantidade deste elemento é liberada e absorvida, principalmente, por peixes que, por sua vez, são a principal fonte de consumo destes indivíduos. Segundo os autores, 51 % das amostras de cabelo analisadas apresentaram valores superiores a 10 ppm, significando elevado risco à saúde podendo resultar, principalmente, em danos severos ao sistema nervoso central.

No trabalho de Llorente Ballesteros *et al.* (2017), foi realizado um levantamento das concentrações de elementos no cabelo de crianças e adolescentes na tentativa de estabelecer valores de referências para a região de Madrid, na Espanha, a fim de ilustrar um quadro de exposição ambiental destes. Os elementos Al, As, Ag, Ba, Bi, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, Tl e Zn foram determinados em 648 crianças e adolescentes, de ambos sexos, utilizando a técnica de ICP-MS. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a concentração da maioria dos elementos tende a diminuir ao longo da idade, com exceção do Zn. Além disso, as concentrações dos elementos foram maiores, com exceção do Tl, em voluntárias do sexo feminino quando comparadas àquelas encontradas em voluntários do sexo masculino.

No estudo realizado por Carneiro *et al.* (2011) na região sul do Brasil, amostras de cabelo de 167 adolescentes, entre 12 e 18 anos, foram analisadas utilizando também a técnica de ICP-MS com o intuito de avaliar as concentrações de elementos considerados nutrientes, como Zn e Cu, e tóxicos, como As e Pb, por exemplo. Os resultados obtidos pelos autores apontaram uma baixa concentração

de elementos tóxicos presentes nos indivíduos de ambos os sexos, no entanto, não houve parâmetro de limites estabelecidos para concentrações destes metais no cabelo. Quando os resultados foram comparados entre indivíduos do sexo masculino e do feminino, pôde-se observar semelhança estatística, com exceção ao Hg que foi encontrado em maior concentração em indivíduos do sexo masculino.

Embora não tenha havido concordância entre os resultados encontrados, pode-se perceber que houve uma relação entre as concentrações de metais e o gênero dos indivíduos, bem como com a idade, fatores nutricionais, habitacionais, dentre outros. De modo geral, as concentrações de alguns metais tendem a diminuir ao longo do tempo - quando os indivíduos não estão sujeitos a algum tipo de contaminação exógena (áreas industriais, por exemplo) -, e outros metais como, por exemplo, Ca e Mg, mostram aumento progressivo nas mulheres se levado em consideração as características fisiológicas do corpo feminino. Outro aspecto relevante é o hábito alimentar, pois o cabelo é considerado um órgão excretor, e os alimentos influenciam as concentrações dos metais no cabelo. Por exemplo, indivíduos que fazem alto consumo de produtos processados têm concentrações elevadas de Na e P, enquanto aqueles que consomem café possuem concentração elevadas de Al, Ni, S e Ti. Além disso, mulheres tendem a ter concentrações maiores de Sr, em relação aos homens, devido a maior ingestão de vegetais, nos quais o Sr é encontrado em grande quantidade. (Tamburo *et al.*, 2016; Zaichick & Zaichick, 2010; Chojnacka *et al.*, 2010)

Os fatores ocupacionais são relevantes principalmente como traçadores de contaminação exógena dos indivíduos por exposição a elementos considerados tóxicos, tais como Pb, As, Cd e Hg. Dentre contaminantes de fonte exógena pode-se citar resíduos de poluição proveniente de atividades industriais, e até de produtos farmacológicos e cosméticos (Pereira *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2008). Outro exemplo de contaminação é citado por Varrica *et al.* (2014) que avalia as concentrações de elementos em amostras de cabelo de crianças que residem próximo a uma mina abandonada na região da Sardenha, Itália. Sabe-se que regiões onde há a atividade de mineração são altamente susceptíveis a poluição do ar e contaminação de solo e água e, com base nisso, o autor pode perceber que as concentrações de elementos tóxicos eram maiores em crianças da região citada quando comparadas àquelas que não estavam expostas a tal contaminação.

Esta exposição a elementos tóxicos, citada no parágrafo anterior, pode acarretar sérios problemas a saúde humana. Com o passar do tempo, tem sido crescente a preocupação em traçar as possíveis consequências destes elementos no organismo e, com isso, a análise capilar torna-se um instrumento interessante para ilustrar o quadro de possíveis doenças não somente ocasionadas por contaminação exógena, como também aquelas que tem como causa fontes endógenas. Contudo, alguns cuidados devem ser tomados durante a construção de um diagnóstico baseado nos resultados encontrados, pois, como o cabelo não participa do ciclo homeostático, as concentrações encontradas nas amostras podem não refletir a biodisponibilidade destes elementos no mesmo. Assim, todos os fatores citados – idade, gênero, ambiental etc. - corroboram para uma difícil determinação do perfil de concentração dos metais presentes em humanos considerados saudáveis que sirva como parâmetro para comparar com aqueles que podem apresentar alguma anomalia fisiológica. (Peregrino, 2016; Pereira *et al.*, 2004; Pozebon *et al.*, 2017; Szyrkowska *et al.*, 2015)

As concentrações de metais essenciais e tóxicos devem respeitar os limites necessários para o bom funcionamento do organismo. Por exemplo, crianças autistas possuem concentrações menores de S no cabelo e aquelas diagnosticados com síndrome de Down possuem concentrações maiores de Mg, P, I, Cr, Si, Zn e Pb. Crianças do sexo masculino com episódios de epilepsia possuem deficiência de Mg, Ca, Cu e Fe. (Grabeklis *et al.*, 2019; Ozbek & Baysal, 2017; Wołowiec *et al.*, 2013). Também, concentrações elevadas de Ni podem estar associadas a valores elevados de colesterol e triglicerídios, assim como as concentrações de Ca e P podem estar relacionadas com equilíbrio ósseo. Em distúrbios mentais e motores, a análise capilar pode ajudar a identificá-las de forma que os cuidados necessários sejam tomados antes de um possível agravamento do quadro. (Carneiro *et al.*, 2002 *apud* Miekeley *et al.*, 2001; Sazakli & Leotsinidis, 2017)

O que contribui para a falta de concordância entre os valores ou intervalos de referência para as concentrações recai também sobre a ausência de padronização dos procedimentos de lavagem e decomposição das amostras, o que põe em xeque, inclusive, os valores apresentados por muitos laboratórios que realizam a análise de mineralograma capilar. Um processo de lavagem ideal é aquele que irá remover exclusivamente metais provenientes de fontes exógenas, deixando apenas aqueles de fontes endógenas, pois serão estes resultados que irão dar suporte para a

construção de um quadro clínico ou toxicológico, por exemplo. Os cuidados com procedimento de decomposição de amostra se dão pelo tipo de técnica que será empregada para a determinação dos elementos traços no cabelo, por conta de possíveis perdas por volatilização de compostos, interferências, entre outros, além de garantir que os resultados sejam confiáveis. (Mikulewicz *et al.*, 2013; Tsanaclis *et al.*, 2018)

Atualmente, as técnicas utilizadas são a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), por serem técnicas de alta capacidade analítica, com baixos limites de detecção para maioria dos metais estudados durante a análise capilar, no entanto, há na literatura estudos que empregam outras técnicas, como espectrometria de absorção atômica com chama ou com atomizador eletrotérmico (F AAS e ET AAS, respectivamente), espectrometria de fluorescência atômica (AFS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS) ou de vapor frio (CV AAS), entre outras. (Pozebon *et al.*, 2017; Raposo *et al.*, 2014)

Apesar das desvantagens apresentadas, a análise capilar mostra-se eficiente em diversos aspectos. A amostragem de cabelo é não-invasiva, portanto, indolor para doadores ou pacientes, exige menor consumo de materiais, como seringas, e as concentrações de elementos são de 50 a 100 vezes maiores do aquelas encontradas em outras matrizes biológicas, como sangue e urina, e, com isso, o cabelo tem capacidade de ilustrar um quadro de exposição em médio a longo prazo, de acordo com a taxa de metabolismo de cada indivíduo, além de ser uma matriz mais estável. (Esteban & Castaño, 2009; Pozebon *et al.*, 2017. Wołowiec *et al.*, 2013)

## 2.3

### Importância do enxofre no organismo

O S é o décimo elemento mais abundante na crosta terrestre e o terceiro mais abundante em plantas e animais. No corpo humano, o S pode ser encontrado de diversas formas e estados de oxidação, como demonstrado na Figura 2. A fonte principal de S para o organismo está relacionada a aminoácidos ricos neste elemento, tais como cisteína e metionina e, destes aminoácidos originam proteínas



importantes, como albumina, que representa cerca de 55 % de todas as proteínas presentes no sangue, e queratina, que é responsável pelo processo de construção do folículo capilar discutido anteriormente. O principal meio de obtenção destes aminoácidos é através da ingestão de proteína animal, em sua maioria, e estes serão responsáveis pela manutenção e integridade do sistema celular, por influenciar no estado redox da célula, e sua capacidade de desintoxicação de compostos tóxicos, radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Não existem valores bem definidos entre as principais agências mundiais de saúde para a quantidade de S necessária para o organismo, no entanto, há um consenso geral de que a ingestão de aminoácidos sulfurados mínima está entre 13 e 25 mg kg<sup>-1</sup> por dia, o que equivale a 910 mg por dia para um adulto de 70 kg, aproximadamente. A Tabela 1 apresenta os valores necessários destes aminoácidos para cada faixa etária. (Dawson, 2011; Ozbek & Baysal, 2017; Parcell, 2002; Townsend *et al.*, 2004)

Tabela 1 - Consumo base de aminoácidos sulfurados de acordo com a idade (Adaptada de Parcell, 2002)

Aminoácidos	3 a 4 meses	Até 2 anos	Entre 10 e 12 anos	Adultos
Metionina + Cisteína (mg kg <sup>-1</sup> por dia)	58	27	22	13

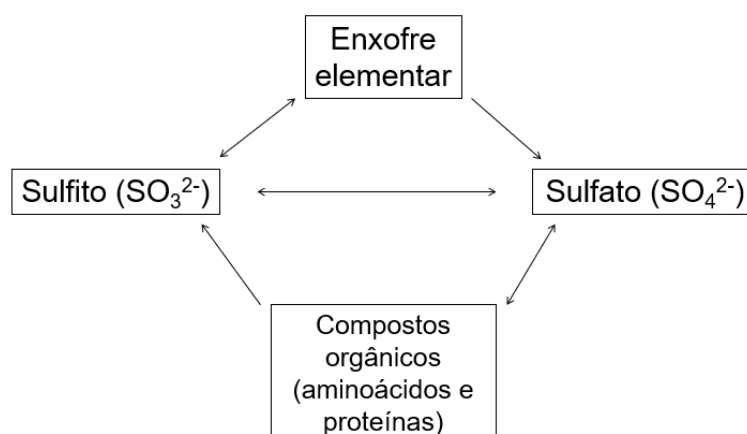


Figura 2 - Ciclo do enxofre no organismo (adaptada de Parcell, 2002)

Estes aminoácidos possuem sítios ativos em sua estrutura que permitem a ligação entre este e metais, formando compostos quelatos que poderão ser excretados do organismo. A cisteína, principal componente da queratina, é o aminoácido sulfurado de maior relevância na matriz capilar devido a sua abundância. É encontrado na sua forma oxidada nas pontes disulfeto responsáveis pela baixa solubilidade e alta estabilidade térmica do cabelo, como já discutido anteriormente. No entanto, a sua deficiência no organismo está relacionada, na literatura, a algumas desordens metabólicas que podem causar doenças de Alzheimer e Parkinson, ou até mesmo ser marcador para a síndrome de Down. (Almeida *et al.*, 2018; Lau *et al.*, 2004; Ozbek & Baysal, 2017) A metionina, por sua vez, é o aminoácido que dará origem aos demais compostos sulfurados, tais como a própria cisteína, sulfatos, taurina, entre outros compostos que fazem parte do ciclo de metabolismo do S no organismo demonstrado na Figura 3. Além disso, é um aminoácido que, por meio de suas enzimas, ajuda a reduzir os efeitos do álcool e da doença de Parkinson. Contudo, o crescimento de células cancerosas, por exemplo, é dependente da metionina. (Parcell, 2002; Pozebon *et al.*, 2017; Townsend *et al.*, 2004)

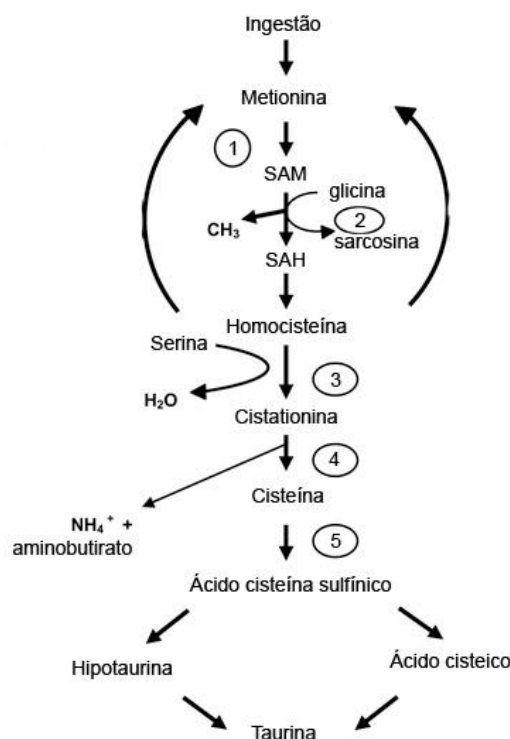


Figura 3 - Ciclo de metabolismo da metionina no organismo. Siglas: SAM – S-adenosilmetionina; SAH – S-adenosilhomocisteína; (1) Metionina adenosiltransferase; (2) Glicina N-metiltransferase; (3) Cistationina β-sintase; (4) γ-cistationina; (5) Ácido cisteína sulfínico descarboxilase (Adaptado de Townsend et al., 2004)

Como demonstrado na Figura 2, os sulfitos, tóxicos para o sistema nervoso, são metabolizados por enzimas a sulfatos que, por sua vez, são compostos fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de mamíferos por participar de processos metabólicos e celulares. Outras fontes de obtenção dos sulfatos são a água mineral ou proteínas animais, ricas em aminoácidos sulfurados, que serão metabolizadas dando origem ao mesmo. No entanto, o ciclo do sulfato no organismo é curto, uma vez que são facilmente excretados pela urina. Com papel fundamental no crescimento e desenvolvimento, os sulfatos tornam-se preponderantes para a formação e evolução do feto durante a gestação, no entanto, o bebê ainda na placenta não possui capacidade de produzir quantidade suficiente do composto, com isso, a principal fonte de obtenção torna-se ingestão maternal. Em contrapartida, os sulfatos podem estar presentes em produtos tóxicos que podem ocasionar a formação de células cancerígenas. (Dawson, 2011; He *et al.*, 2019; Parcell, 2002)

Sabe-se que os compostos sulfurados podem desempenhar, no organismo, tanto um papel benéfico quanto maléfico. No que diz respeito ao câncer, Parcell (2002) e Wang & Guo (2008) abordam em seus trabalhos o uso do S como agente minimizador dos efeitos colaterais que o tratamento contra o câncer, seja radioterapia ou quimioterapia, causa nos pacientes submetidos ao mesmo. O primeiro trabalho (Parcell, 2002) aponta o uso de suplementação de S, na forma purificada, antes da radioterapia em pacientes em câncer cervical que, segundo os resultados apresentados, proporcionou uma diminuição significativa na reação do organismo à radiação, pois, uma vez que o objetivo é retardar o processo de reprodução do DNA modificado, os grupos tióis tendem a proteger contra a radiação excessiva mitigando os efeitos colaterais. Já no segundo trabalho (Wang & Guo, 2008), foi estudado o papel do S no tratamento quimioterápico utilizando platina e chegou-se à conclusão de que, embora o S pudesse prevenir o organismo contra a toxicidade apresentada pelo tratamento, dependendo da sua forma química metabolizada, poderia também afetar a efetividade da droga no combate da doença.

## 2.4

### **Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS)**

#### 2.4.1

#### **Histórico**

A espectrometria de absorção atômica com fonte contínua (CS AAS) surgiu com objetivo de tornar a AAS uma técnica mais competitiva frente a outras técnicas de espectrometria conhecidas, tais como ICP OES e ICP-MS, pois, diferentemente da absorção atômica com fonte de linha (LS AAS), característica para determinação monoelementar, permitia a determinação multielementar simultânea ou sequencial com uma lâmpada de radiação contínua e um monocromador de alta resolução. No entanto, as fontes utilizadas tornavam a quantificação pelas linhas de absorção deixadas no espectro contínuo da luz, princípio da técnica de absorção atômica, menos interessantes frente à determinação pelas linhas de emissão dos átomos, proposta para a técnica de ICP OES. (Welz *et al.*, 2005)

Outros estudos utilizando ou a fonte contínua ou uma série de lâmpadas de catodo oco de forma sequencial, de modo que viabilizasse também a análise multielementar, foram realizados ao longo dos anos. Porém, o uso da técnica ainda era limitado devido às falhas no sistema de correção de fundo e baixa sensibilidade, que resultavam em interferências espectrais, curva analítica com regressão linear ruim e resultados não confiáveis. Estas dificuldades começaram a ser superadas à medida que novas tecnologias foram sendo propostas como, por exemplo, o uso de uma lâmpada de deutério (ou de neônio) como sistema de correção de fundo, um monocromador de alta resolução contendo uma rede de difração do tipo Echelle para melhorar a seleção dos comprimentos de onda e da lâmpada de arco curto de Xe como fonte de radiação contínua. Todos estes elementos associados deram origem ao primeiro equipamento de HR-CS AAS proposto por Becker-Ross e Welz, cujo esquema instrumental é demonstrado na Figura 4. (Ferreira *et al.*, 2018; Welz *et al.*, 2007)

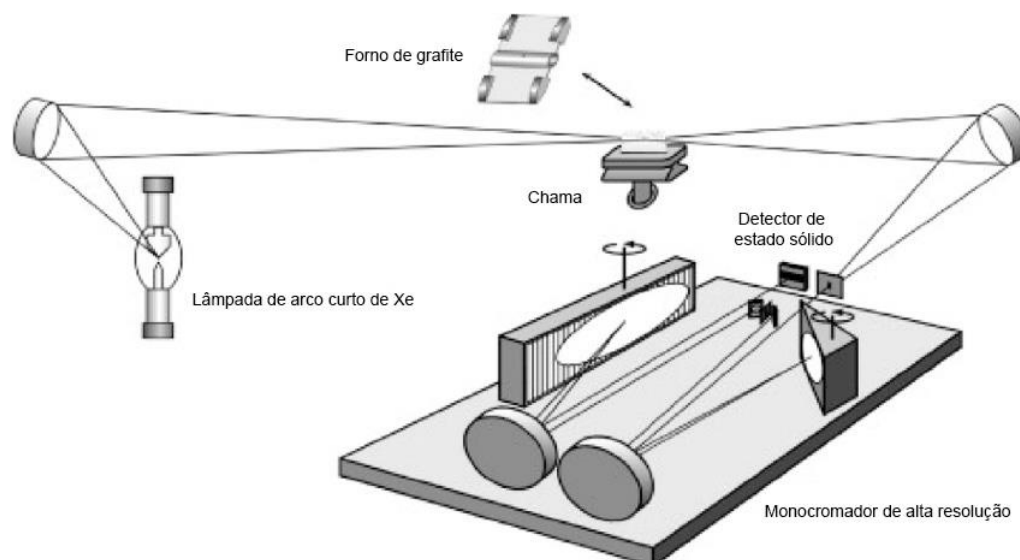


Figura 4 - Esquema do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (adaptada de Welz *et al.*, 2007)

Em relação ao equipamento convencional para medidas de absorção atômica que trabalha com fonte de linha, isto é, requer uma lâmpada de catodo oco para cada elemento a ser determinado, o HR-CS AAS apresenta algumas vantagens como maior estabilidade de sinal do analito, melhor correção do fundo - que é realizada com auxílio da própria fonte de radiação - e análise multielementar sequencial ou simultânea, no entanto, sua aplicação como tal é limitada devido à janela de observação do espectro, disponível para este equipamento, ser de apenas 0,2 nm. (Resano *et al.*, 2013; Welz *et al.*, 2005)

#### 2.4.2 Lâmpada de arco curto de Xe

Para substituir as lâmpadas de catodo oco da absorção atômica de linha era necessário uma fonte contínua que pudesse emitir radiação em toda região do espectro visível e ultravioleta de vácuo (comprimentos de onda menor do que 190 nm) com intensidade e amplitude de banda superior àquela emitida pelas fontes de linha, a fim de obter melhores limites de detecção que justificassem seu uso. Com isso, uma lâmpada de arco curto de Xe foi desenvolvida e passou a ser utilizada como fonte de radiação. Nela, dois eletrodos são posicionados numa distância menor que 1 mm e a lâmpada é preenchida com gás Xe com pressão de 17 bar, quando desligada. Assim, quando uma diferença de potencial é aplicada,

forma-se uma descarga elétrica capaz de formar um plasma no interior da lâmpada que alcança temperatura de aproximadamente 10000 K, este fenômeno é chamado de *hot-spot mode* na literatura. A lâmpada opera com potência de 300 W e sua ignição é iniciada a partir de um pulso de alta voltagem, aproximadamente 30 kV, e para manter a temperatura de trabalho controlada sem sofrer superaquecimento, um sistema de resfriamento a água é utilizado. O tempo de vida útil de uma lâmpada deste tipo irá variar de acordo com seu uso, porém, estima-se que após 1000 h de trabalho, sua eficiência diminua cerca de 25 %. (Welz *et al.*, 2003, 2005)

### 2.4.3

#### Sistemas de atomização

Os sistemas de atomização da absorção atômica são: chama e atomização eletrotérmica. No sistema de atomização com chama, mais comum técnica em absorção atômica, a amostra passará pelo processo de dessolvatação, fusão e atomização. A composição da chama pode ser alterada de acordo com as propriedades físico-químicas do analito de interesse, isto é, alguns metais refratários, como, por exemplo, V, requerem um tipo de chama composta por  $N_2O$  e  $C_2H_2$  por fornecer mais energia para sua atomização (Welz & Sperling, 1999). Entretanto, tratando-se da determinação realizada por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS) neste trabalho, o enfoque será dado ao sistema de atomização eletrotérmica por forno de grafite por apresentar valores de limites de detecção e quantificação menores em relação a chama, além de permitir melhor simplificação da matriz da amostra durante as etapas de aquecimento.

O uso da atomização eletrotérmica na espectrometria de absorção atômica (ET AAS) foi iniciado em 1959 com objetivo de diminuir a quantidade de amostra utilizada para determinação e melhorar os limites de detecção para alguns elementos, porém, devido às dificuldades para otimização desta técnica, seu emprego passou a ter maior aceitabilidade somente a partir dos estudos realizados por L'vov que introduziu o conceito da plataforma, comercialmente feita de grafite pirolítico, dentro do tubo (conceito STPF). No entanto, a rápida mudança do sinal de fundo do equipamento, derivado de componentes da matriz da amostra, ainda era um desafio que mesmo os mais sofisticados sistemas de correção da época, por

efeito Zeeman, não eram suficientes para retificá-lo, porém, com o surgimento da lâmpada de arco-curto de Xe e sua capacidade de emitir radiação de alta intensidade numa faixa contínua, tais interferências passaram a ser minimizadas. A partir daí, com a utilização dos tubos com plataforma, a concentração do analito na amostra tornou-se função de uma absorvância integrada que é medida pelo número de átomos absorvidos em relação ao tempo do vapor atômico gerado dentro da zona analítica. (Sadagov & Katskov, 2001; Welz & Sperling, 1999)

Havia também a possibilidade do aquecimento do forno de grafite ser feita tanto na forma transversal quanto na forma longitudinal. Um fator que possuía, e ainda possui, peso relevante na atomização por forno de grafite é o tempo que cada análise demandava e isso dava-se também pelo fato do tempo perdido durante cada etapa de aquecimento do tubo. Os tubos com aquecimento longitudinal não apresentavam aquecimento homogêneo ao longo de toda sua estrutura, o que levava ou a mais tempo de aquecimento ou a maior energia empenhada para tal, partindo-se, por exemplo, para a atomização a partir da temperatura ambiente. Com isso, os tubos com aquecimento transversal passaram a ser empregados, pois apresentavam melhor distribuição do calor ao longo de todo seu comprimento, diminuição do tempo de análise, minimização de interferências de matriz e extinguindo a necessidade de resfriamento das paredes entre cada etapa de aquecimento. Além disso, uma grande vantagem do forno de grafite é a possibilidade de simplificar a matriz da amostra a partir de etapas progressivas de aquecimento (pirólise) que, uma vez otimizadas, minimizarão interferências causadas por efeito de matriz da amostra. (Li *et al.*, 1993; Valdivia *et al.*, 2018; Welz *et al.*, 2007). A técnica de amostragem de sólidos em conjunto com a de fonte contínua possibilita a análise da amostra diretamente inserida na plataforma do forno sem necessidade de decomposição ou extração do analito, reduzindo o tempo de preparo e gastos com materiais e solventes.

#### **2.4.3.1** **Modificadores químicos**

Outro avanço importante na absorção atômica com uso de forno de grafite foi a utilização de modificadores químicos na tentativa de facilitar o processo de atomização de elementos refratários, minimizando a formação de carbeto

termicamente estáveis e/ou estabilização térmica de espécies voláteis. Os modificadores podem ser aplicados de duas formas, seja em solução ou em forma permanente como revestimento da plataforma do forno, e os mais comuns utilizados são metais com elevado ponto de fusão, tais como Pd, Pt, Ir, W e Zr, por exemplo, ou suas misturas. (Silva *et al.*, 2007; Valdivia *et al.*, 2018)

Segundo Ortner *et al.* (2002), o mecanismo de funcionamento dos modificadores ainda não é claro, porém, existem alguns “fatos”, citando os autores, que são pertinentes a todos os tipos de modificadores utilizados na espectrometria de absorção atômica com vaporização eletrotérmica com forno de grafite (GF AAS) e serão listados a seguir:

- Modificadores permanentes: como já mencionado, a formação de carbetos com analito de interessante torna-se um impeditivo para a análise utilizando forno de grafite devida à elevada estabilidade térmica que demandará maior energia para que se rompa a ligação formada. Porém, ao utilizar, por exemplo, Zr ou W como modificador permanente, na forma de recobrimento da plataforma do forno, evita-se a formação de carbetos com o analito, aumentando, assim, a sensibilidade do método e prolongando o tempo de vida útil do forno. Este recobrimento pode ser realizado tanto por impregnação, adição de um montante sobre a plataforma do forno, ou por eletrólise, onde aplica-se uma diferença de potencial para que o elemento se deposite sobre a plataforma;
- Penetração de analitos na plataforma do forno: durante a etapa de secagem e de pirólise da amostra, tanto analito quanto modificador podem penetrar em até 30  $\mu\text{m}$  na plataforma de grafite, o que dificulta a sua liberação durante a etapa de atomização. Modificadores como Pd e Mg, ou sua mistura, por exemplo, facilitam a retenção do analito na fase gasosa, evitando perdas por volatilização, e sua posterior liberação durante a atomização. De acordo com Sadagov & Katskov (2001), o Pd, como modificador em solução, transfere energia para os átomos do analito na fase vapor de forma a promover sua excitação e reduzir o tempo de residência do mesmo no interior do forno;
- Metais do grupo da platina ou formadores de carbetos são utilizados para se intercalarem, não somente com o carbono presente na



plataforma do forno, como também para a formação de compostos junto com o analito de interesse que, posteriormente, serão atomizados. No entanto, compostos presentes na matriz da amostra também podem promover tal intercalação. Por exemplo, uma matriz rica em  $\text{HNO}_3$  poderá, por este processo, resultar numa queda de sensibilidade com poucas queimas e, com isso, reduzirá o tempo de vida útil do forno por corrosão;

Assim, os modificadores possuem papel fundamental na análise por forno de grafite de modo a combinar-se tanto com o analito quanto com a matriz da amostra com objetivo de prevenir perda de analitos voláteis antes da sua atomização, permitindo a decomposição da matriz da amostra, e de reduzir possíveis interferências espectrais por átomos ou moléculas, concomitantes ao analito, que possam absorver a radiação da lâmpada, causando sobreposição no espectro. (Schlemmer & Welz, 1986)

A vida útil do forno de grafite pode ser dividida em 3 fases: a primeira, que dura aproximadamente 20 ciclos de queimas, é caracterizada por elevados valores de desvio-padrão e desvio-padrão relativo (RSD). A intermediária, marcada por alta sensibilidade e baixo RSD, é considerada a fase ótima de trabalho de um forno de grafite e pode durar até centenas de ciclos de queima a depender, principalmente, da temperatura necessária para atomização do analito. E a terceira – e última – fase do forno é caracterizada pela diminuição da sensibilidade e consequente degradação da repetitividade. Nesta fase, atinge-se o tempo de vida útil de um forno, pois suas paredes e plataforma estarão mais deterioradas, tanto pelos ciclos de queimas contínuos, quanto pelo ataque que muitas vezes ocorre por componentes da matriz da amostra. Isto contribui para o aumento de formação de carbetos estáveis, que diminuirão também a sensibilidade do analito. Portanto, o recobrimento da plataforma do forno com modificadores permanentes é uma forma eficaz de amenizar esta indesejada formação, além de elevar o tempo de vida útil do forno, fazendo com que o mesmo possa suportar centenas de ciclos de queimas sem comprometer sua capacidade analítica. (Burylin & Temerdashev, 2013; Ortner *et al.*, 2002)

#### 2.4.4

#### Monocromador de alta resolução

A técnica de HR-CS AAS utiliza um monocromador de alta resolução formado por um prisma e uma rede de difração do tipo Echelle. Em relação aos monocromadores utilizados na LS AAS, este tipo de monocromador fornece resolução superior, de 2 a 3 ordens de magnitude, e, por conseguinte, maior possibilidade de evitar a sobreposição de linhas espectrais. Existem dois tipos de monocromadores: DEMON (*Double Echelle Monochromator*), modelo disponível comercialmente, e ARES (*Array Echelle Spectrograph*). Ambos funcionam com o mesmo princípio, em que o feixe de luz da lâmpada de arco curto de Xe, após ter passado pelo atomizador, é colimado pela fenda de entrada e espelhos, para, em seguida, passar duas vezes pelo prisma antes de chegar à rede de difração e, em seguida, chegar ao detector. A diferença entre estes dois tipos de monocromadores está na montagem e realização da análise sequencial. Enquanto o DEMON é montado na configuração Littrow e precisa que os analitos de interesse possuam linhas espectrais sensíveis suficientes para sua quantificação, e que respeitem a janela espectral de 0,2 nm, o ARES atende pela conformação tipo tetraédrica e permite a melhor separação das linhas espectrais, bem como a medição da intensidade de sinal do fundo - causado por outros elementos ou moléculas presentes na amostra - e separação deste sinal de fundo do sinal emitido pelo analito, além de permitir a análise simultânea. Ao monocromador ARES ainda pode ser acoplado o DSI (*Dispersive Slit Illumination*) para melhorar a resolução das linhas espectrais que estão localizadas na região do UV, possibilitando um intervalo de medida de comprimentos de onda entre 200 e 800 nm emitidos pela fonte contínua. (Fernández *et al.*, 2018; Welz *et al.*, 2005; Welz & Sperling, 1999)

#### 2.4.5

#### Detector

Após o feixe de luz atravessar a fenda de saída, este precisará ser convertido de intensidade de sinal para valores que representem, de fato, a radiação absorvida pelo analito durante a etapa de atomização. De modo geral, segundo Welz *et al.* (2005) um detector utilizado em um equipamento de absorção atômica com fonte contínua deve fornecer elevada eficiência quântica da região do UV até o

infravermelho, baixo ruído, leituras rápidas e sequenciais, alta capacidade de saturação e resolução espacial para um número de pixels bidimensionais, além do baixo custo. Para tal, os detectores mais comumente utilizados na absorção atômica são os tubos fotomultiplicadores ou dispositivos de carga acoplada. O dispositivo de carga acoplada (CCD) é mais utilizado em trabalhos envolvendo HR-CS AAS. Ele permite a determinação multielementar simultânea ou sequencial, além de valores considerados satisfatórios para a saturação, distribuição dos pixels e ruído de fundo. (Fernández *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2018; Welz *et al.*, 2007)

#### **2.4.6**

##### **Interferências**

Segundo a IUPAC, em técnicas espectrométricas, a interferência é um erro sistemático em uma medida causada pela presença de um concomitante na amostra. Estas interferências são normalmente divididas em espectrais e de matriz. Interferências espectrais são causadas devido ao isolamento incompleto da radiação absorvida pelo analito de outra radiação ou radiação absorvida detectada e processada pelo sistema de medição. Com interferências de matriz, o número de átomos de analito livres, e, portanto, o sinal medido, é afetado diretamente.

##### **2.4.6.1**

##### **Interferências espectrais**

Assim como na LS AAS, a HR-CS AAS também está sujeita a este tipo de interferência, ainda mais tratando-se de uma lâmpada de fonte contínua, emitindo radiação em toda região do visível e algumas regiões do UV e do infravermelho. Os tipos de interferências espectrais mais comuns são: sobreposição de linhas espectrais de outros elementos ou moléculas, que absorvem radiação no mesmo comprimento de onda do analito de interesse, radiações coincidentes que não foram devidamente separadas pelo monocromador e dispersão da radiação causada por partículas. A sobreposição de linhas espectrais de outros elementos, primárias ou secundárias, pode ser eliminada ou minimizada pelo monocromador de alta resolução citado anteriormente, a melhor separação das linhas espectrais pela dupla passagem do feixe pelo prisma e, posteriormente, pela rede de difração, faz com que as chances de ocorrerem este tipo de interferência espectral sejam basicamente

nulas. No entanto, em relação às bandas de absorção molecular, o HR-CS AAS conta com sistema de correção de fundo (*background correction*) desempenhado com a própria fonte de radiação, que permite a medição em tempo real do sinal de fundo e, com isso, a minimização deste tipo de interferência extrapolando o sinal gerado por comprimentos de onda adjacentes através de método matemático de mínimos quadrados. (Welz *et al.*, 2005; Welz *et al.*, 2007; Welz & Sperling, 1999)

No forno de grafite, a absorção de radiação por componentes da matriz da amostra pode também causar interferências espectrais, portanto, faz-se necessária a otimização adequada do programa de temperatura em prol de eliminá-las ou minimizá-las. Outra forma de minimizar possíveis interferências espectrais é com o uso de modificadores químicos que irão agir de forma a prevenir, por exemplo, a co-volatilização de outras espécies que poderão absorver radiação naquele mesmo comprimento de onda de interesse (Welz & Sperling, 1999). Por exemplo, na determinação de S em amostras biológicas realizada por Ferreira *et al.* (2010), os autores utilizaram W como modificador permanente e Pd como modificador em solução, para estabilizar termicamente a molécula CS e evitar a co-volatilização de outras espécies que poderiam causar interferências espectrais no sinal do analito de interesse.

#### **2.4.6.2** **Interferências de matriz**

As interferências de matriz causam uma variação na quantidade de átomos do analito na nuvem atômica e, por consequência, afeta diretamente a medida de absorvância. A interferência de matriz mais comum de se encontrar ocorre devido à supressão do sinal do analito. Outra possibilidade se dá pelo efeito de solvente, no entanto, este torna-se mais fácil de contornar pois a curva analítica deverá ser construída utilizando o mesmo solvente, conhecido como assemelhamento de matriz, logo, a análise das amostras estará sob a mesma condição, minimizando efeitos de transporte. Especificamente no forno de grafite, as interferências podem estar relacionadas a co-volatilização do analito junto ao solvente durante a etapa de pirólise, isto pode ocorrer pela forte interação do analito com o solvente que não foi apropriadamente resolvida pela temperatura, rampa e tempo de aquecimento, ou pela rápida expansão dos gases formados, expulsando o analito do forno. Por outro

lado, o analito também poderá formar compostos com a matriz da amostra que são formadores de carbetos termicamente estáveis que não serão atomizados, a não ser com uso de grande quantidade energia para romper a ligação ou, preferencialmente, com o uso de modificadores químicos. (Fernández *et al.*, 2018; Welz *et al.*, 2007; Welz & Sperling, 1999)

Outro tipo comum de interferência é o efeito de memória. Este efeito ocorre quando a energia fornecida, durante a etapa de atomização, não é suficiente para que todo o analito, presente na nuvem atômica, seja atomizado, com isso, a plataforma do forno continuará com uma concentração remanescente deste (elementos refratários) causando um efeito acumulativo na plataforma do forno. Assim como no caso anterior, a utilização de modificadores químicos é a melhor alternativa a fim de minimizar esta interferência por reduzir a quantidade de energia necessária para a atomização destes elementos, tais como o V cuja literatura aponta para o uso de Pd em solução e/ou W, Rh ou Ir, como modificadores permanentes depositados na plataforma do forno de grafite. (Quadros *et al.*, 2010; Valdivia *et al.*, 2018, Welz & Sperling, 1999).

## 2.5

### Determinação de S por espectrometria de absorção molecular

No caso de moléculas diatômicas, como CS, por exemplo, a transição eletrônica é ponto chave para a determinação do enxofre, haja vista que suas linhas de ressonância encontram-se no UV (181 nm no caso do S), região na qual o O<sub>2</sub> também irá absorver a radiação, causando interferências ou exigindo condições muito específicas de operação do sistema ótico do equipamento, como, por exemplo, o uso da purga com Ar, para que consiga quantificar estes elementos numa região de UV de vácuo, tornando-a inviável financeiramente. (Ferreira *et al.*, 2010; Welz *et al.*, 2005)

Segundo Welz *et al.* (2005), a transição eletrônica é caracterizada pelos seguintes passos: ordem energética do estado eletrônico da molécula, o spin total dos elétrons, o momento angular dos elétrons em relação ao eixo vertical da molécula e as propriedades simétricas da função de onda dos elétrons envolvidos que irão descrever a probabilidade de encontrá-los em qualquer local da nuvem

eletrônica da molécula. A respeito da molécula CS, foco deste trabalho, as principais bandas de absorção, característico de pequena molécula, encontram-se entre os comprimentos de onda 257,594 nm e 258,056 nm e é resultado da transição eletrônica entre os estados  $X^1\Sigma^+$  e  $A^1\Pi$ , como demonstrado na Figura 5, a seguir.

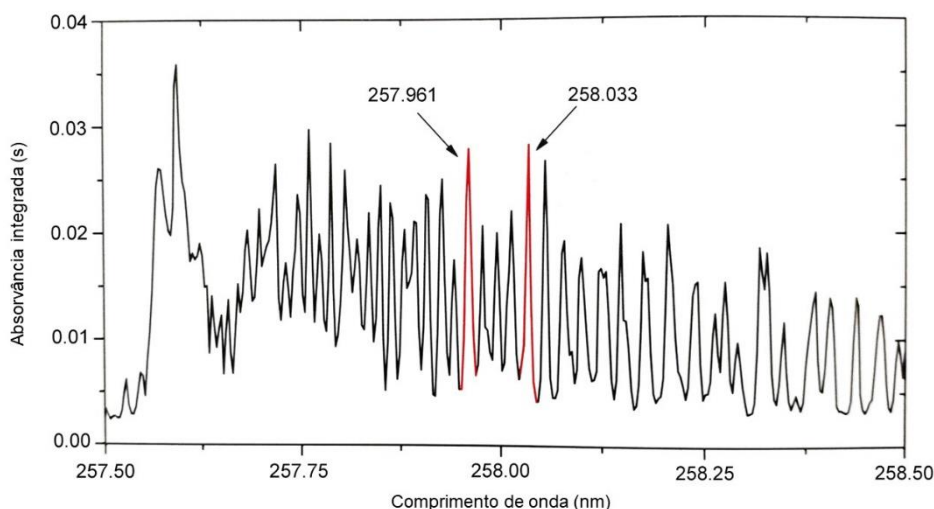


Figura 5 - Espectro de absorção da molécula CS. Resultado da transição eletrônica entre os estados  $X^1\Sigma^+$  e  $A^1\Pi$  destacando-se os comprimentos de onda de 257,961 nm e 258,033 nm utilizados neste trabalho (adaptada de Welz *et al.*, 2005)

A determinação de S normalmente é realizada por técnicas volumétricas, gravimétricas, por espectrofotometria de UV-vis, cromatografia de íons, fluorescência de raio-X, entre outras. (Ferreira *et al.*, 2010) A técnica gravimétrica é uma das mais antigas para determinação de S, o método consiste na precipitação de  $\text{SO}_4^{2-}$ , na forma de  $\text{BaSO}_4$ , e sua posterior determinação para, em seguida, correlacionar a concentração desta espécie à concentração de S total na amostra, porém, esta técnica demanda elevado tempo de preparo das alíquotas e grande quantidade de reagentes utilizados neste propósito que, por consequência, aumentam significativamente a quantidade de resíduo gerado. (Chesnin & Yien, 1951; Ozbek & Baysal, 2017<sup>a</sup>) De forma a contornar o problema com gasto de tempo e reagentes, a turbidimetria passou a ser utilizada. O trabalho pioneiro desenvolvido por Treon & Crutchfield (1942) determinava a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  em amostras de urina. Contudo, assim como a técnica gravimétrica, permitia apenas quantificações de concentrações elevadas S, onde os resultados eram expressos em unidade de percentagem.

As técnicas de espectrofotometria de UV-vis (Kass & Ivaska, 2001), cromatografia de íons (He *et al.*, 2019 ; Zhong *et al.*, 2012) e fluorescência de raio-X (Drews, 2008), além dos problemas citados nas técnicas anteriores, são altamente susceptíveis a interferências de matriz. Por exemplo, a determinação de espectrofotometria de UV-vis é limitada pela absorção de íons concomitantes ao analito que irão absorver radiação emitida, a cromatografia de íons requer a combustão completa da amostra, o que poderá resultar em perda de frações voláteis de S, e a razão de C, H e O, em relação ao S, afeta a precisão dos resultados obtidos pela determinação via fluorescência de raio-X.

Com isso, as técnicas espectrométricas de absorção atômica, de massas ou de emissão com plasma indutivamente acoplado (AAS, ICP-MS e ICP OES, respectivamente) tornaram-se uma via alternativa para sua determinação. No entanto, como citado anteriormente, as linhas de ressonância do S encontram-se na região de UV onde a sua determinação é interferida pelo oxigênio presente no ar. Isto poderia ser superado com um sistema de purga de Ar, porém, deixaria a análise mais custosa e demorada, fazendo com que o uso das técnicas de ICP OES e AAS seja desconsiderado dadas as circunstâncias. Quanto a análise por ICP-MS, existe a interferência isobárica do dímero  $^{16}\text{O}_2^+$  sobre o isótopo mais abundante do enxofre ( $^{32}\text{S}$ ) sendo necessário uso de uma célula de reação/colisão para superar este problema, tornando a análise mais trabalhosa e cara. Sendo assim, a análise via absorção molecular (HR-CS GF MAS) torna-se uma alternativa viável para a determinação de S, já que o sistema de correção de fundo do equipamento permite medição em tempo real possibilitando sua determinação por moléculas diatômicas concomitantes ao analito na amostra. (Baumbach *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2010; Ozbek & Baysal, 2017<sup>a</sup>)

A determinação de S via absorção molecular pode ser feita através de moléculas diatômicas, tais como a molécula CS, já mencionada, ou GaS, SnS, entre outros sulfetos. No entanto, a parte fundamental da seleção da molécula que será utilizada é o comprimento de onda e a força da ligação que une o elemento não-metálico ao seu contra-íon. A molécula diatômica comumente utilizada para determinação S é o sulfeto de carbono (CS), cuja força de ligação é igual a  $713 \text{ kJ mol}^{-1}$  e apresenta bandas de absorção de alta intensidade em 257,961 nm e 258,033 nm, como mostrado na Figura 5. Ainda assim, a determinação de S via absorção molecular está sujeita a interferências devido ao diferente comportamento

térmico das espécies de S. Em relação às interferências, estas estão basicamente relacionadas à formação da espécie  $\text{CS}_2$  durante a etapa de pirólise, esta espécie é altamente volátil, e, para torná-la termicamente estável, faz-se necessário o uso de modificadores químicos. Os mais comuns e que apresentaram melhores resultados, segundo a literatura, são Pd ou Pd+Mg, em solução, em combinação com W ou Zr, como modificador permanente. Em relação ao comportamento térmico das diferentes espécies de S, ainda mais acentuado quando se faz uso do forno de grafite como atomizador, o mais adequado é realizar um estudo de temperatura para estas espécies e verificar qual apresenta maior similaridade em relação à amostra que será analisada. Contudo, sabe-se que espécies inorgânicas de S, tais como  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{SO}_3^{2-}$ , são mais estáveis termicamente do que as espécies orgânicas, como tiourea e L-cisteína. (Ferreira *et al.*, 2010; Heitmann *et al.*, 2006; Ozbek & Baysal, 2017<sup>a</sup>; Pereira *et al.*, 2018)

Por exemplo, o método proposto por Camera *et al.* (2017) buscava determinar a concentração de S em amostras de coque verde de petróleo utilizando HR-CS GF MAS. As amostras foram tratadas com Triton X-100 e as medidas realizadas no comprimento de onda de 258,033 nm. O modificador químico KOH (1,0 %) foi empregado para estabilização térmica da espécie CS e solução-padrão de  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$  utilizada para construção da curva analítica. Segundo o estudo de temperatura realizado, as temperaturas de pirólise e vaporização escolhidas foram 1000 °C e 2600 °C, respectivamente, e a validação da exatidão do método feita com material certificado de referência NIST 2718 que apresentou bons valores de recuperação, de acordo com os autores do trabalho.

Embora grande parte das determinações de S, na literatura, seja feita via absorção da molécula CS, outras moléculas, como, por exemplo, SnS também podem ser utilizadas levando em consideração os critérios descritos anteriormente. No trabalho realizado por Cadorim *et al.* (2016) foi desenvolvido um método para determinação de S em amostras de petróleo cru. A banda de absorção da molécula SnS selecionado foi no comprimento de onda de 271,624 nm e os modificadores químicos Ir, Pd, Ru e Zr foram testados. Os autores concluíram que o melhor modificador para a determinação do S foi o Pd, utilizando temperatura de pirólise e vaporização de 600 °C e 2000 °C, respectivamente.

A respeito dos modificadores químicos que podem ser empregados na determinação de S, Nakadi *et al.* (2014) utilizou nanopartículas de Pd, sintetizadas



partir de soluções de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  e de  $\text{PdCl}_2$ , para a determinação de S, via absorção da molécula CS no comprimento de onda de 258,056 nm, em amostras de diesel a partir de uma emulsão formada ou com surfactantes (Triton X-100 ou Triton X-114) ou com álcool (etanol, n-propanol, isopropanol ou n-butanol), além da introdução direta da amostra na plataforma do tubo de grafite. Os resultados obtidos mostraram que o emprego de nanopartículas, tanto derivado da solução de  $\text{NO}_3^-$ , quanto de  $\text{Cl}^-$ , foi eficiente para estabilização térmica das espécies de S, e que a emulsão formada com utilização do etanol mostrou-se mais adequada. Neste estudo, uma solução-padrão de tioureia foi considerada mais adequada para calibração do método proposto o que, segundo Ozbek & Baysal (2017<sup>a</sup>), é esperado, uma vez que espécies orgânicas, presentes na amostra analisada e na solução-padrão, são melhor estabilizadas com modificadores na forma metálica (como nanopartículas, no caso citado).

Vieira *et al.* (2019) testou a aplicação de Zr, como modificador permanente, combinado a mistura de Pd e Ca, como modificador em solução, para a determinação de S, via HR-CS GF MAS monitorando a banda de absorção da molécula CS no comprimento de onda de 258,056 nm, pela introdução direta de sólidos na plataforma do tubo de grafite. Os autores utilizaram uma mistura de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$  e  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$  para construção da curva analítica e encontram bons resultados para regressão linear entre pontos de concentração de 0,2 µg a 4,0 µg de S. As temperaturas de pirólise e vaporização utilizadas foram 400 °C e 2300 °C, respectivamente. A validação da precisão do método foi realizada a partir da análise dos materiais certificados de referência NIST 8415, 8414 e 1648<sup>a</sup> que, segundo os autores do trabalho, apresentaram resultados de recuperação satisfatórios.

No entanto, a determinação de S em cabelo desenvolvida por Ozbek & Baysal (2017) via HR-CS GF MAS não faz menção ao uso de modificadores químicos, tanto em solução, como na sua forma permanente, para estabilização térmica das diferentes espécies químicas de S que podem ser geradas durante o processo de queima. Para isso, as amostras de cabelo foram tratadas com  $\text{HNO}_3$ , aquecidas a 110 °C e imediatamente analisadas a fim de evitar a perda de frações voláteis. Os autores monitoraram a banda de absorção da molécula CS no comprimento de onda de 258,056 nm e reportaram valores satisfatórios de recuperação para o material certificado de referência NCS DC73347 e ZC 81002b empregando temperaturas de

pirólise e vaporização de 1000 °C e 2400 °C, respectivamente, a solução-padrão de Na<sub>2</sub>S para construção da curva analítica.

### 3

## Materiais e Métodos

### 3.1

#### Instrumentação

Todos os experimentos para o desenvolvimento do método para determinação de S via absorção molecular da espécie CS foram realizados utilizando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua Analytik Jena ContrAA 700, equipado com forno de grafite com aquecimento transversal e tubos de grafite com plataforma integrada e recobrimento pirolítico, amostrador automático modelo MPE 60 (Analytik Jena), lâmpada de arco curto de Xe de 300 W de potência operando em modo *hot-spot* e gás argônio (99,9 %) usado como gás de purga. A característica da alta resolução do espectrômetro se dá pelo uso do duplo monocromador DEMON e um detector CCD, com resolução de 5 pm por pixel, além disto, o equipamento permite que dois ou mais comprimentos de onda sejam utilizados para medidas simultâneas. As medições foram realizadas, simultaneamente, nos comprimentos de onda de 257,961 nm e 258,033 nm (pixel central  $\pm 2$ ) que, dentro do espectro de absorção da molécula da CS, são as bandas de maior intensidade, como demonstrado na Figura 5. Estes comprimentos de onda foram reportados como 257 nm e 258 nm, respectivamente, na construção deste trabalho.

As análises por ICP OES foram feitas em um espectrômetro Optima 7300 DV Perkin Elmer (USA), empregando condições operacionais recomendadas pelo fabricante e apresentas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais do ICP OES para determinação de S em cabelo

$\lambda$ (nm)	181,975
Vazão de Ar no plasma (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,60
Taxa de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,55
Potência (W)	1400
Modo de observação	Axial
Taxa de aspiração (mL min <sup>-1</sup> )	1,5

Balança analítica digital Sartorius, modelo BL210S, com precisão de 0,1 mg, foi utilizada para pesagem de amostras e materiais de referência certificado.

### 3.2

#### Materiais e Reagentes

Água ultra-pura (Gehaka, Master All, Resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm), HNO<sub>3</sub> 65 % (m/m) (Vetec, Brasil) bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (v/v) (Suprapur, Merck, Brasil), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO P.A. (Isofar, Brasil) foram os reagentes utilizados no preparo das amostras.

Solução-padrão de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1000 mg L<sup>-1</sup>), cloridrato de L-cisteína monohidratada (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S.HCl.H<sub>2</sub>O) (Vetec, Brasil) e tioureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S) (Vetec, Brasil) foram empregados, devidamente diluídos com água ultrapura, para construção de curva analítica de calibração externa com pontos de concentração de S equivalentes a 20, 40, 60 e 80 mg L<sup>-1</sup>. A determinação por ICP OES se deu utilizando a mesma solução de calibração de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para a construção da curva de calibração externa com pontos de concentração igual a 10, 20, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> de S.

O material de referência de cabelo NCS DC73347a (*China National Analysis Center*, Beijing, China) foi analisado em paralelo para avaliar a exatidão do método.

Soluções de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10.000 mg L<sup>-1</sup> (Merck KGaA, Alemanha) foram apropriadamente diluídas para serem empregadas como modificadores

químicos em solução. Uma solução-padrão de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  1000 mg  $\text{L}^{-1}$  (Merck KGaA, Alemanha) foi utilizada para deposição do modificador permanente.

### 3.2.1

#### Amostragem e preparo das amostras

As 14 diferentes amostras de cabelo foram cortadas da parte de trás da cabeça (nuca), utilizando uma tesoura sem ponta, rente ao couro cabeludo, sendo retirada uma ou mais mechas, de modo a obter uma massa de aproximadamente 1 g de cabelo. Os primeiros 5 cm de comprimento, a partir da raiz, foram separados para análise, sendo descartado o restante. Para cabelos mais curtos do que 5 cm, foram retiradas várias mechas pequenas até completar a massa requerida. As amostras foram identificadas e armazenadas em sacos plásticos para serem tratadas no laboratório. O procedimento adotado é o recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). (Ryabukhin, 1976)

Seguindo o procedimento descrito por Miekeley *et al.* (1998), as amostras de cabelo foram lavadas com 3 ciclos intercalados de 20 mL de acetona e 20 mL de água deionizada em banho ultrassônico por 15 min, encerrando-se a lavagem com acetona. Em seguida, as amostras foram levadas para secagem em estufa a 60 °C durante 12 h e depois pesadas. Este procedimento de lavagem, além de remover contaminantes de fonte exógenas, remove os tratamentos pelos quais o cabelo pode ter sido submetido.

### 3.2.2

#### Dissolução das amostras

Assim como o método de lavagem considerado adequado para remover impurezas das amostras, provenientes de fonte exógenas, muito também se discute a respeito do melhor procedimento de dissolução da amostra para análise multielementar de cabelo. (Pozebon *et al.*, 2017). O procedimento adotado é descrito e adaptado de Carneiro (1999), no qual cerca de 0,25 g das amostras de cabelo foi pesado, com auxílio de balança analítica, em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL, e tratadas com 2,5 mL de  $\text{HNO}_3$  (14 mol  $\text{L}^{-1}$ ) bidestilado por período de 12 h. Em seguida, as amostras foram submetidas a aquecimento em banho-maria, em frasco fechado, a 100 °C por 5 h até que uma solução límpida

fosse formada. Após, foi adicionado 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e as amostras submetidas ao aquecimento, novamente a 100 °C por 15 min e, por fim, os tubos foram avolumados a 25 mL com água ultra-pura. Antes da determinação instrumental, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi adicionada a um novo tubo de polipropileno e avolumadas a 10 mL, resultando num fator de diluição final de, aproximadamente, 1000 vezes em relação à massa de amostra utilizada. O material certificado de referência foi submetido ao mesmo procedimento de decomposição e diluição, assim como um branco da amostra foi preparado a partir da adição dos reagentes citados a um frasco sem amostra, seguindo também o procedimento descrito. Uma das amostras foi selecionada ao acaso para a realização do estudo de temperatura de pirólise e vaporização, discutido na seção posterior.

### 3.3

#### Modificadores químicos

Uma solução mista contendo  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , com concentração equivalente a 1500 mg  $\text{L}^{-1}$  e 1000 mg  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente, foi empregada com o objetivo de estabilizar as espécies químicas de S no forno de grafite. Comumente, neste caso em particular, modificadores químicos agem para uniformizar e estabilizar termicamente as espécies químicas de S, evitando a perda de analito pela volatilização da espécie  $\text{CS}_2$  durante a etapa de pirólise (Pereira *et al.*, 2018). Desta forma, em um frasco de polipropileno de 10 mL, foram adicionados 1,5 mL da solução de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ , 1,0 mL da solução de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  e, a seguir, avolumadas, para 10 mL com água ultra-pura. No momento da introdução da amostra no forno, 10  $\mu\text{L}$  da solução foi depositada sobre a amostra antes que o programa de temperatura do forno se iniciasse.

Ainda segundo Ferreira *et al.* (2010) e Pereira *et al.* (2018), com objetivo de evitar a formação de carbetos de S e aumentar o sinal analítico, uma solução-padrão de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  1000 mg  $\text{L}^{-1}$  foi empregada como modificador permanente depositado na plataforma do tubo de grafite. Assim, antes do início da análise das amostras propriamente dita, a plataforma do forno de grafite foi revestida com 20 injeções de 40  $\mu\text{L}$  da solução em questão e submetida ao programa de temperatura descrito na Tabela 3, totalizando uma massa de 800  $\mu\text{g}$  de W depositados sobre a plataforma.

Pelo programa de recobrimento utilizado no software do equipamento, primeiro a solução foi introduzida 20 vezes e o programa foi realizado até a etapa 2, para, em seguida, dar sequência às demais etapas. Durante a análise das amostras e do material de referência, aproximadamente a cada 20-25 ciclos de queima, novos recobrimentos foram realizados com objetivo de evitar a perda de sensibilidade.

Tabela 3 - Programa de temperatura de revestimento do forno de grafite com solução padrão de W 1000 mg L<sup>-1</sup>

	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tempo de espera (s)
Etapa 1	90	5	40
Etapa 2	130	1	60
Etapa 3	1200	300	30
Etapa 4	2100	500	15

### 3.4 Análise estatística e tratamento dos dados

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, comparadas utilizando a técnica de ICP OES e tratadas estatisticamente pelo teste t-pareado por meio do *software* R versão 3.5.3, R *Core Team* (2015).

O *software* R é um programa com linguagem computacional para tratamento de dados estatísticos e criação de gráficos. Ele fornece uma gama de tratamentos estatísticos, tais como modelagem linear ou não-linear, análise de séries temporais, testes estatísticos clássicos, dentre outros, além de saídas gráficas para os dados gerados, com qualidade de publicação, produzida com símbolos matemáticos e fórmulas. O *software* R é de livre acesso e pode ser encontrado facilmente em qualquer mecanismo de busca eletrônico, além disso, como possui código-fonte aberto, qualquer usuário com conhecimento de linguagem computacional pode incluir ou modificar pacotes, desenvolver novas funções etc., tornando-o uma ferramenta colaborativa. (Urbanek & Plummer, 1993)

O teste de *Shapiro-Wilk*, proposto em 1965, é um teste estatístico para avaliar a normalidade da distribuição dos dados coletados a partir de uma análise significativa de um grupo em relação ao outro. Este teste é uma ferramenta

importante para posteriores testes estatísticos por determinar a natureza dos dados que estão sendo tratados. Os valores de probabilidade irão, por sua vez, indicar se pode-se rejeitar ou não a hipótese nula de que a distribuição não decorre de uma população normal. Assim, em caso de valores maiores que 0,05, entende-se que os resultados seguem uma distribuição normal. (Shapiro & Wilk, 1965) A estatística do teste de *Shapiro-Wilk* é regida pela Equação 1 a seguir.

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=0}^n (x_{(i)} - \bar{x})^2} \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

$$b = \begin{cases} \sum_{i=1}^{n/2} a_{n-i+1} \times (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) & \text{se } n \text{ é par} \\ \sum_{i=1}^{(n+1)/2} a_{n-i+1} \times (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) & \text{se } n \text{ é ímpar} \end{cases}$$

O teste t de *Student* é um teste estatístico para tratamento de dados paramétricos baseados na média amostral de duas (ou mais) populações. A Equação 2 rege o teste e se o valor de  $t_{\text{calculado}}$  for maior que  $t_{\text{tabelado}}$ , rejeita-se a hipótese nula (Paternelli & Mello, 2011). No caso do teste t-pareado, analisa-se um conjunto de dados obtidos por amostras relacionadas, criando uma relação de dependência. Este tipo de análise é utilizado, principalmente, para tratamento de resultados obtidos entre dois métodos analíticos, a fim de compará-los e avaliar se pode-se aceitar ou não a hipótese nula de que não há diferença significativa entre eles. A Equação 3 a seguir rege o teste t-pareado. (Massart *et al.*, 1988; Rietveld & Van Hout, 2017)

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

$\bar{X}$ : média amostral;

$\mu$ : média populacional;

s: desvio-padrão amostral;

n: tamanho da amostra.

$$t_{\text{pareado}} = \frac{\bar{d}}{s_d / \sqrt{n}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}$  : somatório dos resíduos;



$$s_d = \sqrt{\frac{\sum d_i^2 - [\sum d_i]^2 / n}{n-1}} : \text{desvio-padrão dos resíduos;}$$

n: tamanho da amostra.

## 4 Resultados e Discussão

A espécie CS absorve radiação de forma estruturada na região espectral em torno de 258 nm, como pode ser observado na Figura 6. Este espectro rotacional é referente à transição eletrônica  $X^1\Sigma^+ \rightarrow A^1\Pi$ , apresentado em formato tridimensional, obtido para o material certificado de referência NCS ZC81002b, empregado por Ozbek & Baysal (2017) na determinação de S em amostras de cabelo de crianças com autismo. O perfil das bandas de absorção encontradas neste estudo foi semelhante. Nela, pode-se perceber todas as linhas rotacionais de absorção de radiação na região de 257,915 nm a 258,198 nm, com seus respectivos valores de absorvância em função do tempo de integração. Com isso e com a versatilidade do HR-CS GF MAS para monitorar mais de um comprimento de onda numa mesma janela espectral, foram selecionados os comprimentos de onda de 257,961 nm e 258,033 nm.

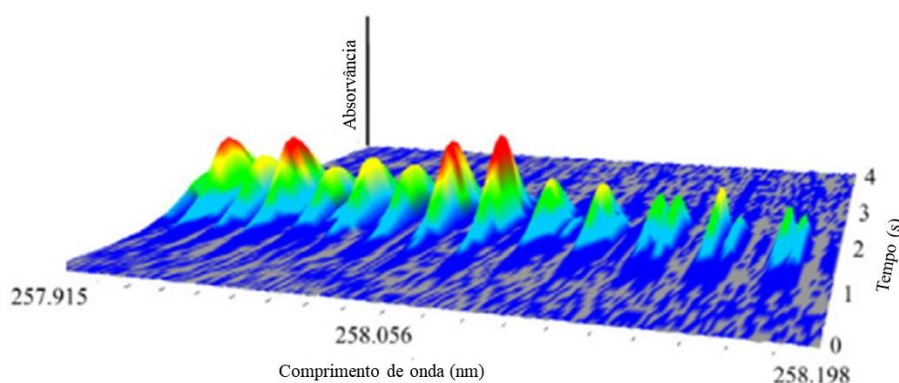


Figura 6 - Espectro tridimensional da espécie CS do material certificado de referência NCS ZC81002b medido em 258,056 nm (adaptado de Ozbek & Baysal, 2017)

### 4.1 Otimização do programa de temperatura

O primeiro passo para a otimização do programa de temperatura do forno de grafite foi construir as curvas de temperatura de pirólise e vaporização, feitas a

partir de uma amostra de cabelo submetida ao procedimento de lavagem e dissolução descrito na seção anterior. Com isso, pode-se estabelecer as condições ideais de temperatura de pirólise e vaporização que são apresentadas na Figura 7, onde (a) apresenta as curvas obtidas no forno sem revestimento de W na plataforma e (b) com revestimento de 800  $\mu\text{g}$  de W.

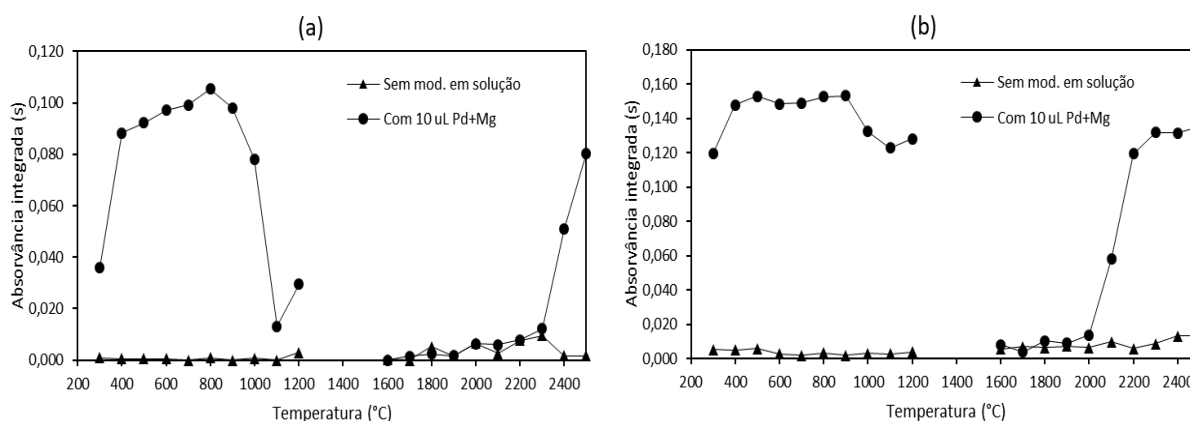


Figura 7 - Estudo de temperatura de pirólise e vaporização para a espécie CS em uma amostra de cabelo medido em 258 nm em plataforma: (a) sem e (b) com revestimento de 800  $\mu\text{g}$  de W

Ao analisar as curvas obtidas, foi possível perceber que o modificador Pd+Mg em solução desempenhou fundamental para a estabilização térmica do analito aumentando o sinal da absorvância consideravelmente. Com relação ao uso do revestimento de W na plataforma, pode-se perceber que a absorvância, com seu uso junto ao modificador em solução, foi até 2 vezes maior em relação à absorvância no forno sem o revestimento.

Após o estudo realizado, pode-se observar que os valores de absorvância para temperaturas de pirólise entre 500 °C e 900 °C são semelhantes, apresentando uma queda a partir da temperatura de 1000 °C, porém, ainda que com uma amostra extremamente diluída, a matriz biológica requer elevadas temperaturas de pirólise para que os compostos presentes sejam decompostos a fim de minimizar possíveis interferências desta natureza. Com isso, fez-se necessário avaliar os perfis temporais para temperaturas elevadas (neste caso, para temperatura de pirólise de 900 °C e 1000 °C) apresentados na Figura 8.

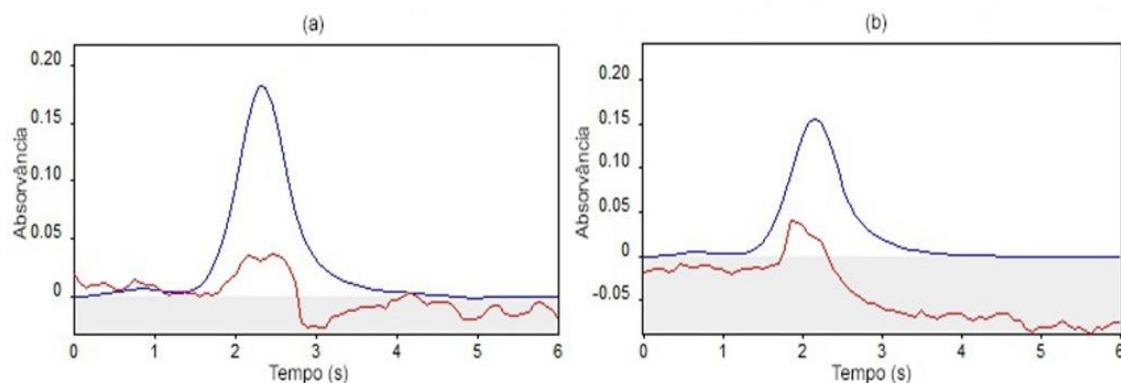


Figura 8 - Perfis de absorção temporal na temperatura de pirólise de 900 °C (a) e de 1000 °C (b) para uma amostra de cabelo medida em 258,033 nm

Avaliando os gráficos apresentados, pode-se observar que, em ambas temperaturas, os perfis de absorção temporal estão bem definidos e não sofrem influência do sinal de fundo. Embora o valor de absorvância, em função da área integrada, em 900 °C seja maior que em 1000 °C (0,15326 e 0,13227, respectivamente), este valor foi obtido analisando-se apenas uma replicata, logo, pouco pode-se afirmar sobre sua repetitividade. Ainda assim, considerando a matriz biológica, foi escolhida a temperatura de pirólise de 1000 °C em prol da melhor decomposição térmica da amostra e, consequentemente, da minimização de interferências relacionadas a esta.

Voltando ao gráfico apresentado na Figura 7, nota-se que os melhores valores de absorvância encontram-se entre 2300 °C e 2500 °C, portanto, se fez necessário avaliar os perfis temporais obtidos nestas temperaturas, perfis estes apresentados na Figura 9.

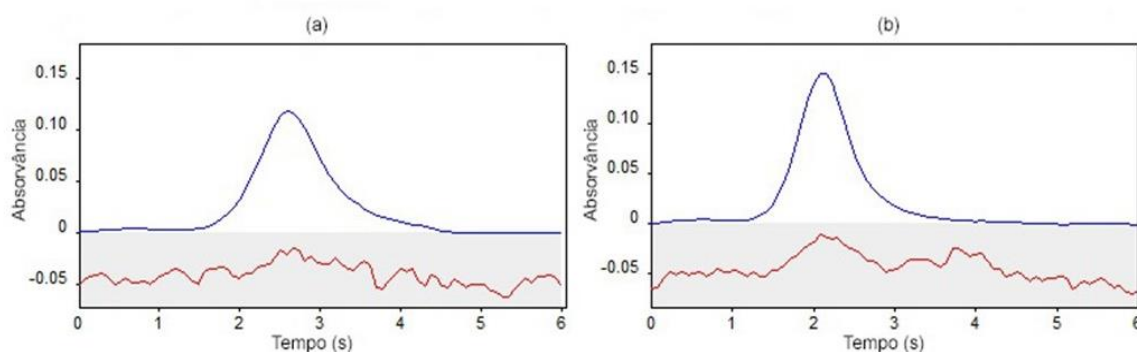


Figura 9 - Perfis de absorção temporal nas temperaturas de vaporização de 2300 °C (a) e de 2400 °C (b) para uma amostra de cabelo medida em 258,033 nm

Pelos perfis temporais apresentados, pode-se observar que, em ambas temperaturas, os perfis de absorção temporal estão bem definidos e não sofrem influência do sinal de fundo, tornando desnecessário o emprego da temperatura de 2500 °C, o que levaria um desgaste mais acelerado do tubo de grafite. Com isso, analisando os valores de absorvância, em função da área integrada, nota-se que estes foram próximos tanto em 2300 °C quanto em 2400 °C (0,13192 e 0,13165, respectivamente), porém, a fim de diminuir o tempo de queima nesta etapa e aumentar o tempo de vida útil do tubo de grafite, foi escolhida a temperatura de 2400 °C por apresentar um tempo de integração menor.

Tratando-se da determinação de S via absorção molecular da molécula CS estar sujeita a formação da espécie CS<sub>2</sub> na fração volátil ocasionando incertezas na sua determinação, fez-se necessário avaliar a melhor condição de secagem da amostra. Foram realizadas duas etapas de secagem, a primeira necessariamente fixa em 90 °C e a segunda etapa foi analisada variando temperaturas entre 90 °C e 120 °C considerando a resposta da absorvância em relação a cada uma e o tempo de espera necessário para a secagem da amostra na plataforma do tubo de grafite. Os valores, medidos para uma amostra de cabelo, foram apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação da condição ideal de temperatura de secagem para uma amostra de cabelo com 10 µL de Pd+Mg em solução e revestimento de 800 µg de W na plataforma

Secagem (°C)		Absorvância em 257 nm	Absorvância em 258 nm
Etapa 1	Etapa 2		
90	90	0,15861	0,15265
	100	0,14942	0,14288
	110	0,15198	0,14052
	120	0,15220	0,15767

Com isso, em posse dos estudos realizados, por auxílio das curvas de temperaturas de pirólise e vaporização, e da otimização das etapas de secagem, pode-se chegar ao programa de temperatura descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Programa de temperatura para determinação de S via absorção molecular da espécie CS

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Rampa (°C s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo de espera (s)</b>	<b>Vazão de Ar (L min<sup>-1</sup>)</b>
Secagem	90	5	18	2,0
Secagem	120	5	12	2,0
Pirólise	1000	300	20	2,0
Vaporização*	2400	1500	4	0,0
Limpeza	2650	500	5	2,0

\* Medida de sinal analítico

## 4.2

### Avaliação do uso de modificador químico em solução

Como já previsto por Ferreira *et al.* (2010), o recobrimento com W na plataforma do forno é necessário para aumentar a sensibilidade do analito à medida que o W impede o contato do S com o carbono pirolítico presente na plataforma do forno na fase condensada, o que, por sua vez, diminuirá significativamente a formação da molécula CS<sub>2</sub>. Outros elementos formadores de carbetos, como Zr, também foram testados pelos autores, no entanto, o W apresentou sensibilidade semelhante e maior. Com isso, foi estudado o volume de modificador Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) em solução a ser utilizado para a determinação do S em uma amostra de cabelo. A Figura 10 mostra a variação da absorvância integrada em relação ao volume de modificador nas mesmas condições de temperatura e em ambos comprimentos de onda que foram utilizados para análise de amostras.

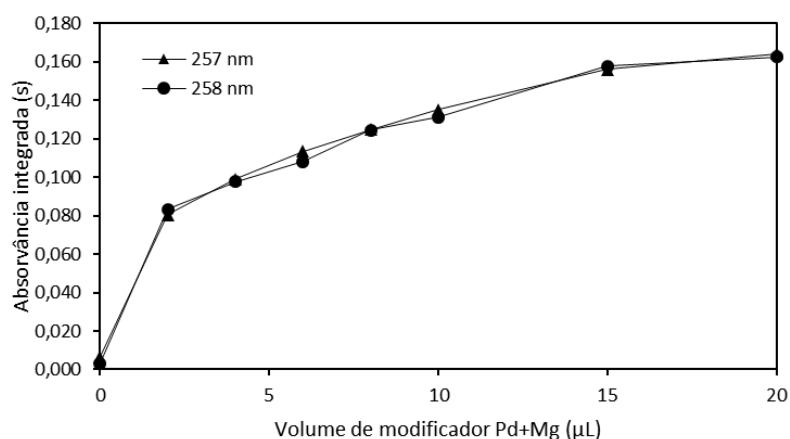


Figura 10 - Estudo de volume de modificador Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) em solução, em ambos comprimentos de onda, para amostra de cabelo com concentração de S igual a 45 mg L<sup>-1</sup>

Pelo gráfico apresentado, nota-se que o uso de modificador em solução, junto ao modificador permanente na forma de recobrimento da plataforma do tubo de grafite, foi necessário para a estabilização térmica do analito durante a etapa de pirólise e vaporização. Este fato foi corroborado pela análise dos perfis temporais apresentados na Figura 11.

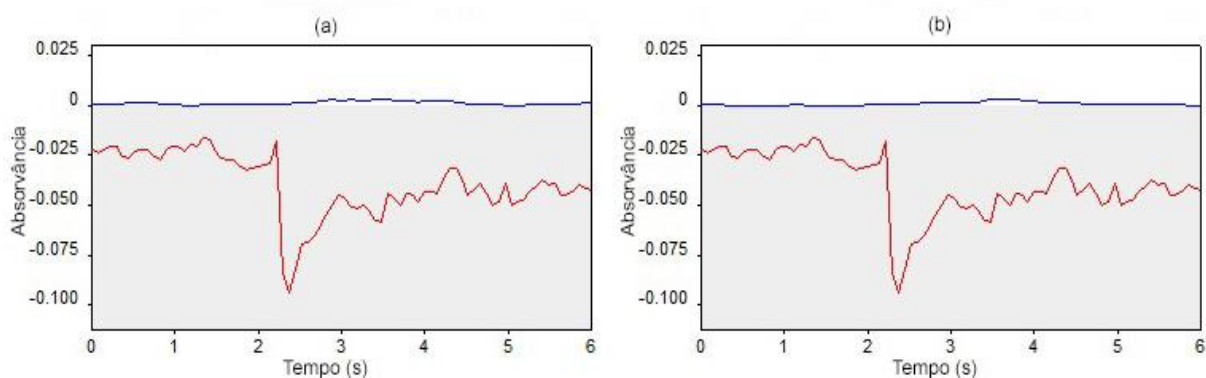


Figura 11 - Perfis de absorção temporal para uma amostra de cabelo, em forno revestido com 800 μg de W, medidos em 257,961 nm (a) e 258,033 nm (b) nas condições de  $T_p = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_v = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tratando-se de uma matriz biológica, temperaturas de pirólise mais altas, como demonstrado na curva de pirólise da amostra, são imprescindíveis para minimização de interferências, por outro lado, as mesmas podem ocasionar a perda do analito na fração volátil, devido à formação da molécula CS<sub>2</sub> já discutida. Portanto, como pode-se observar na Figura 10, um aumento significativo da absorvância foi notado a partir da injeção da mistura Pd+Mg junto à amostra.

Notoriamente, as melhores condições estariam com volumes de modificador Pd+Mg maiores que 15  $\mu\text{L}$ , no entanto, um acentuado sinal de fundo foi notado para utilização deste volume e, com isso, foi considerada a introdução de 10  $\mu\text{L}$  deste modificador a partir da avaliação dos perfis temporais apresentados na Figura 12. Além disso, deve-se levar em consideração o volume final depositado na plataforma que, por sua vez, poderá implicar num programa de temperatura mais demorado. Este volume resultou numa massa de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  igual a 15 e 10  $\mu\text{g}$ , respectivamente, adicionados à amostra.

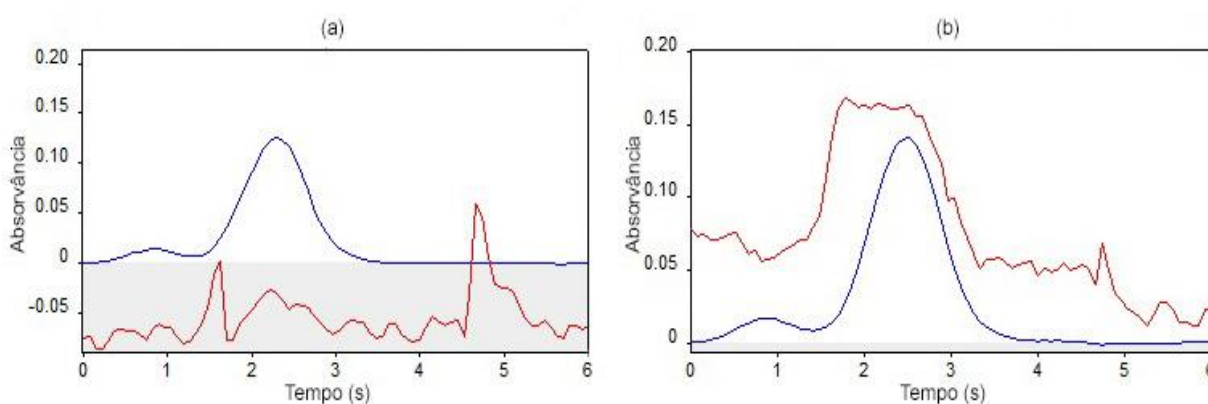


Figura 12 - Perfis de absorção temporal com volume de modificador Pd+Mg ( $1500:1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de 10  $\mu\text{L}$  (a) e de 15  $\mu\text{L}$  (b) para uma amostra de cabelo, medidos em 258,033 nm, em forno revestido com 800  $\mu\text{g}$  de W e em condições de  $T_p = 1000^\circ\text{C}$  e  $T_v = 2400^\circ\text{C}$

### 4.3

#### Estudo sobre a natureza do padrão de calibração

Como discutido por Pereira *et al.* (2018), as espécies químicas de S possuem diferente comportamento térmico durante as etapas de aquecimento do tubo de grafite, portanto, a escolha da espécie química que foi utilizada como solução de calibração do método passou também pela estabilização do analito durante a etapa de pirólise. Com isso, os estudos de temperatura de pirólise e vaporização de soluções de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , L-cisteína e tiourea, todas na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , foram apresentas na Figura 13, respectivamente, com o intuito de avaliar sua estabilidade nas mesmas condições que foram utilizadas com as amostras.



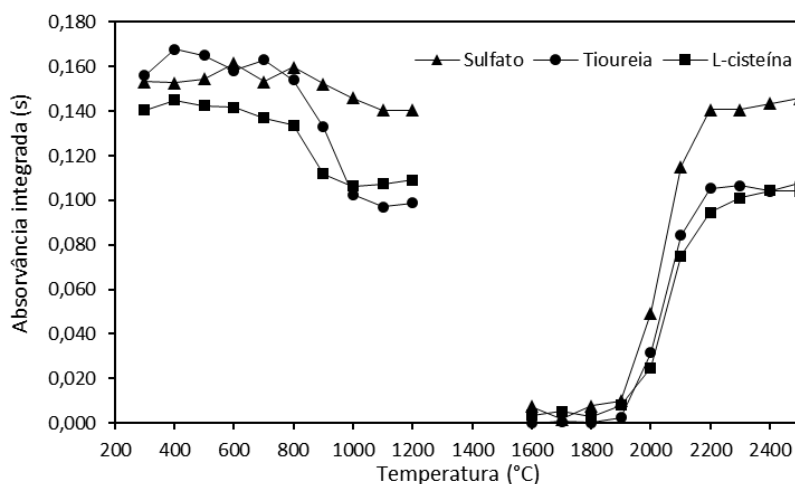


Figura 13 - Estudo de temperatura de pirólise e vaporização das diferentes espécies químicas de S, medidas em 258,033 nm, utilizando forno revestido com 800 µg de W e 10 µL de uma solução de Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>)

As curvas de pirólise e vaporização para todas as espécies químicas de S estudadas (sulfato, tioureia e L-cisteína), sem uso de modificadores químicos, tanto sob a forma permanente quanto em solução, não apresentaram valores de absorvância devido à perda do analito nas etapas de aquecimento do tubo de grafite e, portanto, foram considerados desprezíveis para a construção do gráfico.

Contudo, nota-se que as mesmas espécies químicas de S estudadas apresentaram estabilidade térmica semelhantes quando utilizados os modificadores químicos propostos, isto se dá pela capacidade do Pd em uniformizar as diferentes formas químicas do S geradas durante a etapa de queima. (Pereira *et al.*, 2018; Sadagov & Katskov, 2001) O uso do W, como modificador permanente, também se fez necessário, uma vez que será responsável por intercalação com o carbono presente no revestimento pirolítico da plataforma do tubo de grafite evitando a formação da espécie CS<sub>2</sub>, como já discutido na seção anterior. Ainda assim, na ausência do modificador em solução, os valores de absorvância obtidos para as espécies foram praticamente nulos, com exceção do sulfato, como mostrado na Figura 14.

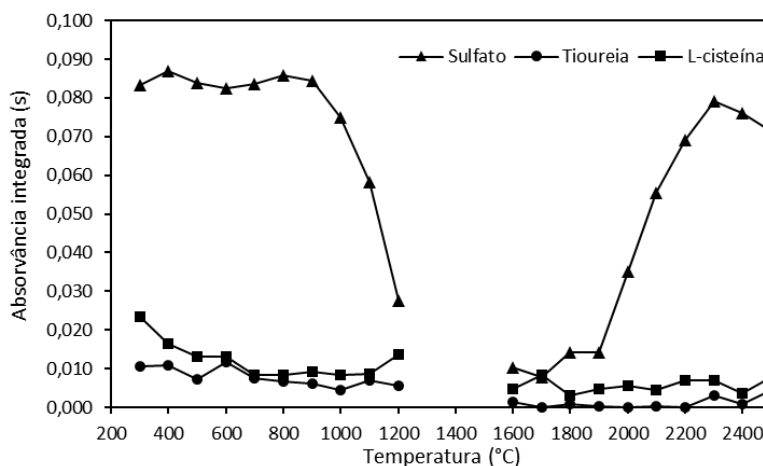


Figura 14 - Estudo de temperatura de pirólise e vaporização das diferentes espécies química de S, medidas em 258,033 nm, utilizando forno revestido com 800 µg de W

Portanto, pode-se perceber que, nas condições apresentadas nas Figura 13 e Figura 14, a solução de sulfato foi que apresentou melhor estabilidade térmica durante as etapas de queima. Isto se dá ao fato do sulfato ser uma espécie mais estável termicamente, como citado por Pereira *et al.* (2018), enquanto padrões orgânicos são menos estáveis mesmo na presença do modificador em solução devido às diferentes formas químicas que podem ser geradas durante a queima destes e à influência do carbono presente no funcionamento do modificador em solução.

Por último, foi importante também avaliar as condições de linearidade das curvas analíticas utilizando os padrões citados. Na Figura 15 são apresentadas as curvas analíticas (n=3) obtidas para as diferentes espécies químicas de S estudadas medidas em 257 nm e 258 nm. Os limites de detecção (LOD) instrumental, calculado a partir de 3 vezes o desvio-padrão de 10 medidas do branco dividido pela sensibilidade, e os limites de quantificação (LOQ) instrumental, calculado a partir de 3,3 vezes o resultado encontrado no LOD, bem como dados da regressão linear e valores de F estão apresentados na Tabela 6.

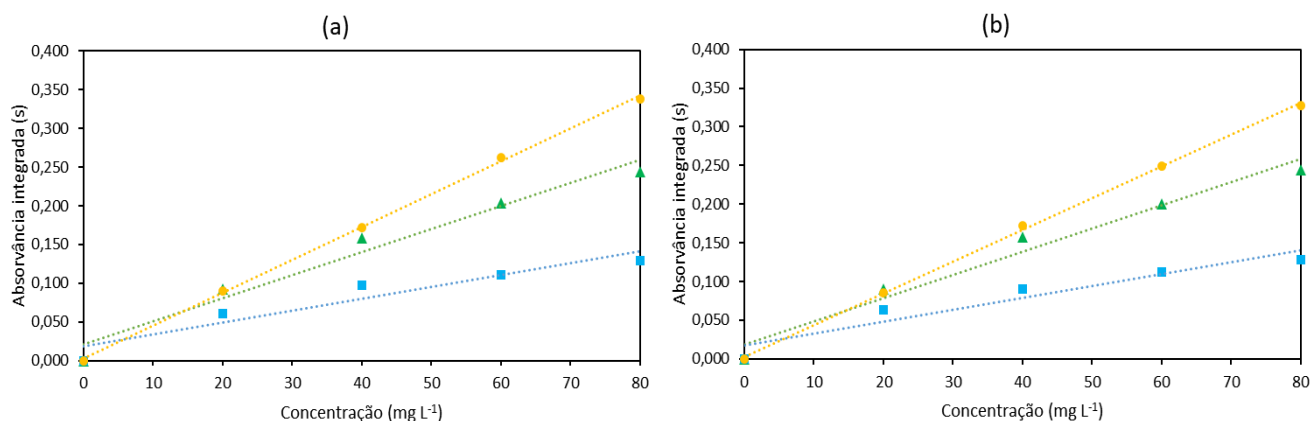


Figura 15 - Curvas analíticas, medidas em 257 nm (a) e 258 nm (b), para as soluções-padrão de tioureia (▲), L-cisteína (■) e sulfato (●) nas condições de  $T_p = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_v = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$  utilizando  $10\text{ }\mu\text{L}$  de Pd+Mg ( $1500:1000\text{ mg L}^{-1}$ ) em solução e revestimento de  $800\text{ }\mu\text{g}$  de W na plataforma

Tabela 6 – Coeficiente de determinação ( $R^2$ ), Slope ( $\text{s/mg L}^{-1}$ ), Limites de detecção e quantificação instrumentais ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e valores de F calculado ( $g\text{L} = 4$ ) para as diferentes espécies químicas de S a serem utilizadas para calibração do método em 257 e 258 nm

	Sulfato		Tioureia		L-cisteína	
	257 nm	258 nm	257 nm	258 nm	257 nm	258 nm
$R^2$	0,9993	0,9992	0,9673	0,9711	0,9123	0,9180
Slope	0,0042	0,0041	0,0033	0,0033	0,0018	0,0018
$\text{LOD}_{\text{instrumental}}$	0,32	1,33	0,59	0,40	1,09	4,17
$\text{LOQ}_{\text{instrumental}}$	1,07	4,39	1,96	1,33	3,61	13,76
$F_{\text{calc}} (F_{\text{tab}} = 7,7086)$	88,715	100,69	31,197	34,232	4091,2	3849,6

As curvas analíticas apresentadas na Figura 15 geraram os gráficos de resíduos mostrados na Figura 16. A partir destes gráficos, da análise dos dados da regressão linear e do teste F, pode-se observar que todas as espécies estudadas poderiam ser empregadas para construção da curva analítica por apresentarem valor de F calculado maior que o F tabelado, para grau de liberdade igual a 4, guardando uma relação linear, além de apresentarem uma distribuição aleatória dos resíduos das curvas analíticas e valores de LOD e LOQ satisfatório para a determinação do S, porém, analisando os coeficientes de determinação e sensibilidades, nota-se que o sulfato apresentou melhores resultados em relação aos demais. Sendo assim, estes dados corroboram os resultados encontrados na literatura sobre as espécies inorgânicas de S serem mais estáveis termicamente do que as espécies orgânicas, muito embora também sejam aplicadas em diversos trabalhos sobre a determinação de S. (Ferreira *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2018)

Pode-se perceber que as curvas analíticas construídas com padrões orgânicos começam a perder sua característica linear à medida que a concentração aumenta, isto pode estar relacionado a deterioração do funcionamento dos modificadores químicos. Uma vez que a carga orgânica aumenta, junto com a concentração de S, novas espécies podem estar sendo geradas durante as etapas de queima. Este fato, no entanto, só poderia ser corroborado a partir de uma análise termogravimétrica para observar o perfil de decomposição destas, porém, sabe-se que o teor de C presente irá influenciar diretamente no funcionamento do modificador químico e degradar os resultados da regressão linear obtidos.

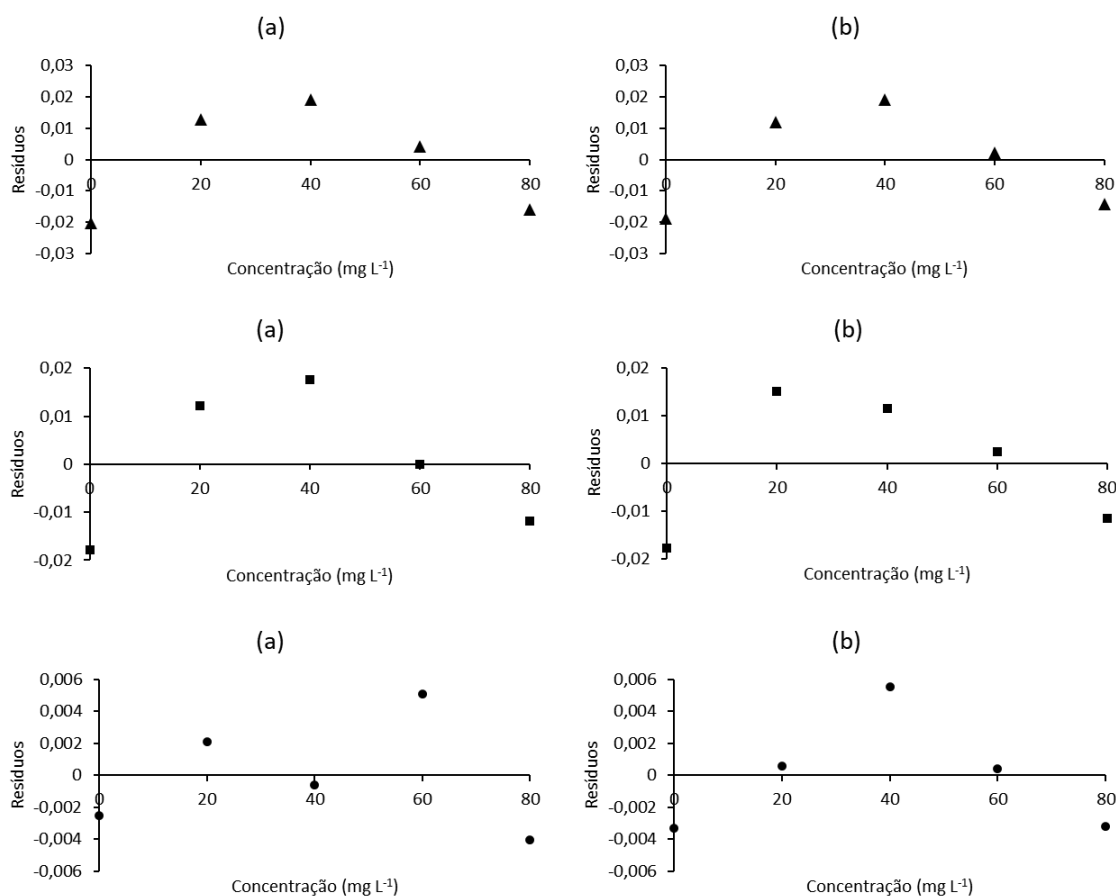


Figura 16 - Gráfico de resíduos das curvas analíticas, medidas em 257 nm (a) e 258 nm (b), para as soluções-padrão de tiourea (▲), L-cisteína (■) e sulfato (●) nas condições de  $T_p = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_v = 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$  utilizando  $10\text{ }\mu\text{L}$  de Pd+Mg (1500:1000 mg L<sup>-1</sup>) em solução e revestimento de  $800\text{ }\mu\text{g}$  de W na plataforma

#### 4.4

#### Determinação de S por HR-CS GF MAS

#### 4.4.1

##### Parâmetros de mérito

A avaliação da exatidão e precisão do método foi realizada, por meio do material certificado de referência, e os parâmetros de mérito, tais como limites de detecção instrumental ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e limites de quantificação considerando o fator de diluição da amostra ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), ambos para  $n=10$ , obtidos nesta determinação são apresentados na Tabela 7 a seguir. A validação da exatidão dos resultados encontrados por ICP OES foi feita com o mesmo material certificado de referência NCS DC73347a e a concentração e sua recuperação correspondente encontram-se também Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de LOD instrumental, LOQ do método e a concentração de S na amostra certificada NCS DC73347a obtidos por HR-CS GF MAS e por ICP OES.

$\lambda$ (nm)	LOD instrumental ( $\text{mg L}^{-1}$ )	LOQ método ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Concentração obtida para o CRM ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	RSD (%)	Recuperação (%)
257	0,50	2411	41120 $\pm$ 760	1,9	98,1
258	1,44	2647	41330 $\pm$ 310	0,8	98,6
ICP-OES	0,04	72,8	40610 $\pm$ 510	1,3	96,9

Pode-se observar que os valores encontrados para o material certificado de referência NCS DC73347a foram concordantes com o valor certificado de  $41900 \pm 1100 \text{ mg kg}^{-1}$  (vide Anexo I), e concordantes para os dois métodos empregados, de acordo com o teste t de *Student* com 95 % de confiança. Além disso, os parâmetros de mérito e faixa linear foram considerados satisfatórios quando levadas em consideração as concentrações de S nas amostras.

#### 4.4.2

##### Análise de amostras e comparação com ICP OES

Seguindo o procedimento descrito, submeteu-se as amostras ao programa de temperatura otimizado, os resultados encontrados para a determinação de S em amostras de cabelo nos comprimentos de onda de 257,961 nm e 258,033 nm foram

apresentados na Tabela 8. Nela, pode-se observar as médias e desvios-padrão das concentrações medidas em triplicatas, bem como seus respectivos RSD (%).

Tabela 8 - Resultados das concentrações (em mg kg<sup>-1</sup>) de S em amostras de cabelo por HR-CS GF MAS e ICP-OES

Amostra	Técnica					
	HR-CS GF MAS				ICP-OES	
	257 nm	RSD (%)	258 nm	RSD (%)	181 nm	RSD (%)
337	44680 ± 460	1,0	44870 ± 620	1,4	44810 ± 240	0,5
338	43880 ± 520	1,2	43570 ± 540	1,2	43240 ± 130	0,3
339	44600 ± 840	1,9	45270 ± 680	1,5	44180 ± 320	0,7
340	42920 ± 1380	3,2	43550 ± 1360	3,1	42010 ± 270	0,6
341	41480 ± 170	0,4	41690 ± 150	0,4	41540 ± 130	0,3
342	45400 ± 770	0,8	46520 ± 220	0,5	46430 ± 210	0,4
343	43900 ± 680	1,5	44210 ± 690	1,6	44490 ± 90	0,2
344	44100 ± 1140	2,6	44750 ± 1140	2,6	44680 ± 200	0,4
345	43380 ± 590	1,4	43730 ± 60	0,1	43690 ± 180	0,4
346	43100 ± 1070	2,5	43180 ± 730	1,7	43590 ± 110	0,2
347	42080 ± 1600	3,8	42170 ± 1340	3,2	43610 ± 250	0,6
348	44530 ± 1350	3,0	43430 ± 160	0,4	43340 ± 20	0,1
349	42310 ± 2570	6,1	42870 ± 2450	5,7	42380 ± 170	0,4
350	41610 ± 470	1,1	42830 ± 790	1,8	41450 ± 310	0,8

A título de avaliar estatisticamente os resultados obtidos pela técnica de HR-CS GF MAS, além da análise por ICP OES, foram realizados o teste de Shapiro-Wilk e teste t-pareado bicaudal, com auxílio do *software* R, para determinar, estatisticamente, se existiu uma distribuição normal dos resultados e também se houve diferença entre os resultados obtidos tanto para os comprimentos empregados na técnica de HR-CS GF MAS, quanto na comparação dos mesmos com a técnica de ICP OES, como mostrado na Figura 17.

Os resultados estatísticos e os valores de probabilidade obtidos para o teste de Shapiro-Wilk para 257 nm, 258 nm e para ICP OES (n = 14) foram:

1. 257 nm: Estatística = 0,9386; p = 0,4011;
2. 258 nm: Estatística = 0,9735; p = 0,9201;

3. ICP OES: Estatística = 0,9606;  $p = 0,7291$ .

Esses valores apontam que os resultados encontrados apresentam uma distribuição normal que, por sua vez, permitiu a aplicação do teste t-pareado para tratamento de dados paramétricos. Com isso, os resultados estatísticos e os valores de probabilidade para o teste t-pareado comparando os dados obtidos entre métodos ( $n = 14$ ) foram:

1. 257 nm e 258 nm: Estatística = -2,1397;  $p = 0,05192$ ;
2. 257 nm e ICP OES: Estatística = -0,6118;  $p = 0,5512$ ;
3. 258 nm e ICP OES: Estatística = 1,1329;  $p = 0,2777$ .

Estas análises estatísticas, baseadas nos resultados apresentados na Tabela 8, originaram os histogramas de distribuição dos resultados para ambos comprimentos de onda, empregados na técnica de HR-CS GF MAS, e para ICP OES, bem como o gráfico do tipo *boxplot*, com intervalo igual a 1,5, com valores de mediana das concentrações obtidas. Os gráficos resultantes estão apresentados na Figura 17.

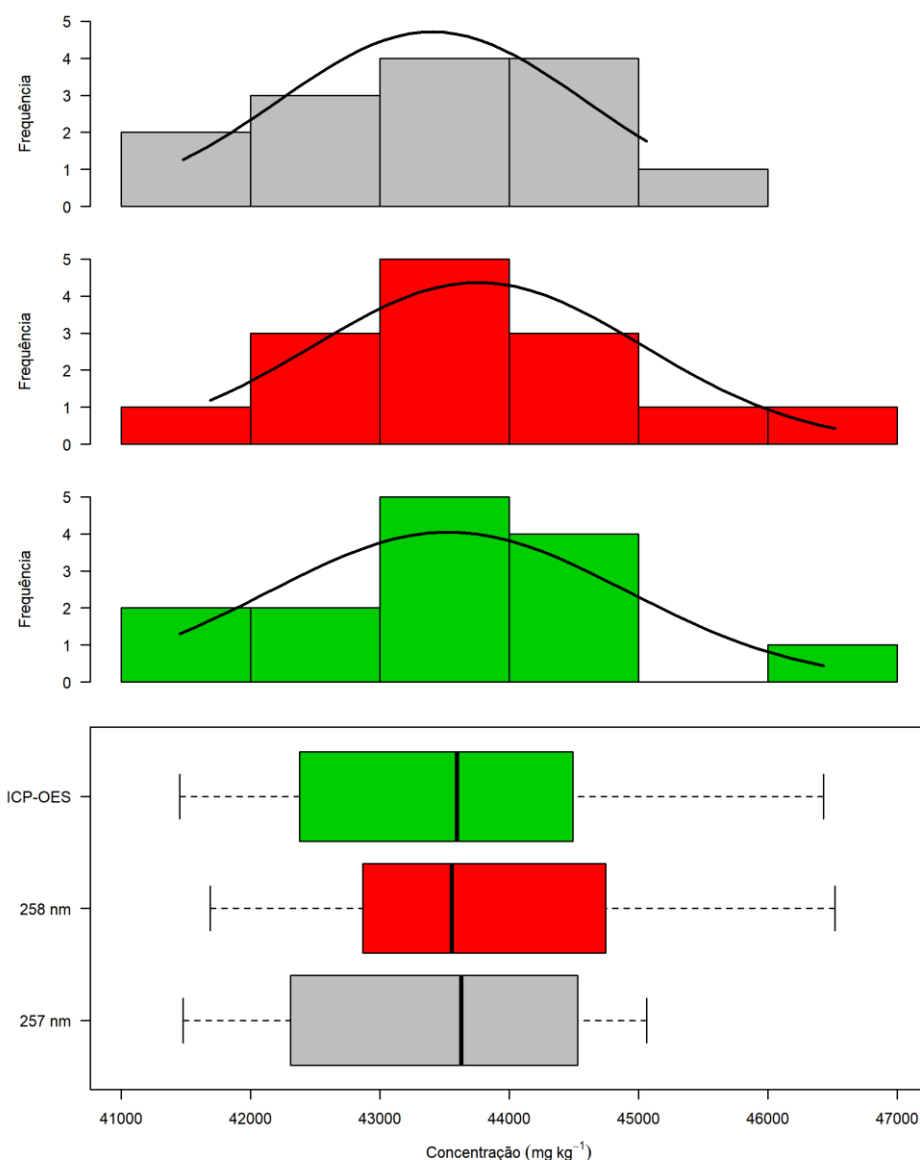


Figura 17 - Histograma e boxplot da distribuição dos resultados obtidos para determinação de S em cabelo por HR-CS GF MAS e ICP-OES

Considerando que os resultados encontrados para  $p$  foram maiores que 0,05, rejeitou-se a hipótese nula de que não há diferença significativa entre os resultados encontrados para ambos comprimentos de onda e técnicas aplicadas. Embora o valor de  $p$  para o teste t-pareado entre os comprimentos de onda 257 nm e 258 nm tenha se situado próximo do valor limite, como citado anteriormente, e analisando as concentrações de S, seus respectivos desvios-padrão e desvios-padrão relativos (RSD, %), nota-se que os valores foram bastante próximos, adequados para o tipo de análise e amostra. A Figura 18 a seguir demonstra o gráfico de distribuição das concentrações obtidas entre os métodos e suas respectivas diferenças.



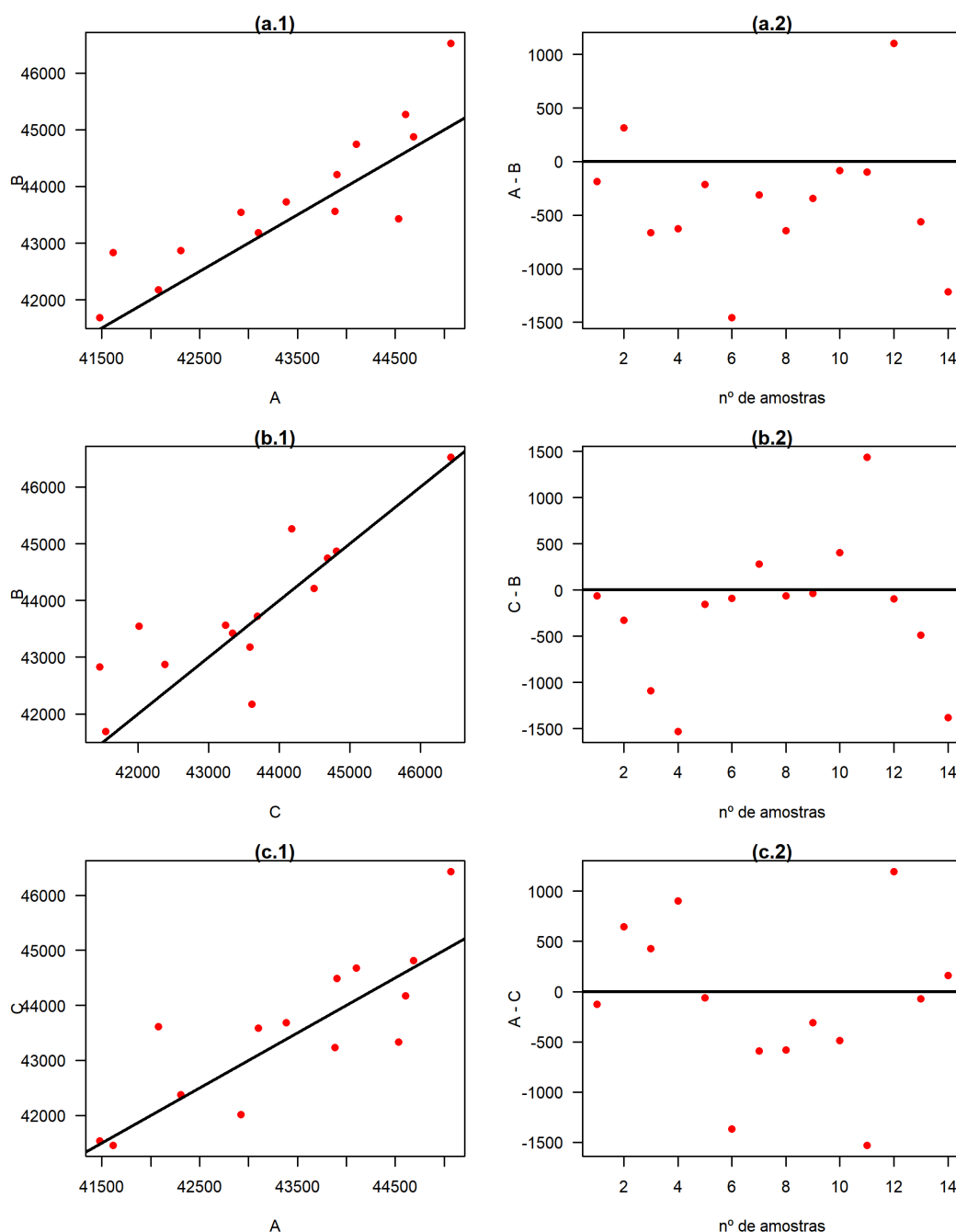


Figura 18 - Distribuição linear das concentrações (em  $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtidas em 257 nm (A), 258 nm (B) e por ICP-OES (C) (a.1, b.1, c.1) e o desvio relativo entre as mesmas (a.2, b.2, c.2) para  $n=14$

Os gráficos a.1, b.1 e c.1 mostraram a diferença relativa entre os valores encontrados comparando-se os métodos aplicados, enquanto os gráficos a.2, b.2, e c.2 apontaram a diferença entre estes. Embora o resultado encontrado para o teste t-pareado, comparando os dois comprimentos de onda empregados na determinação por HR-CS GF MAS, tenha, mesmo que no seu limite, concluído que as

concentrações obtidas não são estatisticamente diferentes, nota-se pelo gráfico (a.2) que os resultados encontrados em 257 nm parecem ser sistematicamente menores do que os encontrados em 258 nm, quando deveria haver uma distribuição aleatória dos mesmos, como demonstrado nos gráficos (b.2) e (c.2). Para confirmar se existe uma tendência nos resultados, seria necessário analisar mais amostras ou aplicar testes estatísticos específicos para esse fim, que poderá ser feito em trabalho futuro.

## 5 Conclusão

A partir dos estudos de temperatura de pirólise e vaporização das diferentes espécies químicas de S, conclui-se que a curva analítica construída a partir do  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  apresentou valores de linearidade e sensibilidades melhores que os obtidos para as demais espécies estudadas, além de melhor estabilidade térmica quando empregado os modificadores químicos estudados. Em relação a estes, conclui-se que o uso do recobrimento de 800  $\mu\text{g}$  de W na plataforma do tubo de grafite em conjunto com a introdução de 10  $\mu\text{L}$  de solução de Pd+Mg (1500:1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) mostraram-se eficientes para estabilização térmica da espécie de S presente nas amostras tornando viável sua determinação pela técnica estudada. O programa de temperatura otimizado utilizado no forno de grafite demonstrou ser adequado apresentando os resultados esperados quando comparado ao valor obtido para o CRM e para outra técnica aplicada.

Com isso, os resultados apresentados permitem concluir que o método proposto para a determinação de S via HR-CS GF MAS em amostras de cabelo apresentou boa exatidão, a partir dos resultados encontrados para o CRM expressos na Tabela 7, e precisão, considerando os valores de RSD expressos na Tabela 8. Por fim, a partir dos resultados obtidos para os testes estatísticos aplicados, permitiu-se concluir que não houve diferença significativa entre as técnicas aplicadas com nível de confiança de 95 %.

### 5.1 Perspectivas

A perspectiva futura deste trabalho é utilizar o método desenvolvido para a determinação de S em cabelo de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico contra o câncer. Uma vez que o S é um elemento fundamental na formação e desenvolvimento do tecido epitelial, esse método pode ajudar a elucidar se a queda de cabelo, que acomete os pacientes expostos a este tipo de tratamento, é devida à diminuição da sua concentração no cabelo ou por outros mecanismos de

ação do fármaco nos aminoácidos e proteínas, que formam e dão sustentação ao folículo capilar durante todas as suas etapas de construção.

ALMEIDA, J. S.; MEIRA, L. A.; TEIXEIRA, L. S. G. Indirect determination of cysteine in pharmaceutical formulations by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 155–159, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X18303382#bb0070>>. Acesso em: 27/5/2019.

BAUMBACH, G.; LIMBURG, T.; EINAX, J. W. Quantitative determination of sulfur by high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 295–299, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.08.011>>. .

BOISCHIO, A. A. P.; BARBOSA, A. Exposição ao mercúrio orgânico em populações ribeirinhas do Alto Madeira, Rondônia, 1991: resultados preliminares. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 9, n. 2, p. 155–160, 1993. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X1993000200006&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1993000200006&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 15/8/2019.

BURLIN, M. Y.; TEMERDASHEV, Z. A. Permanent chemical modifiers in electrothermal atomic absorption spectroscopic analysis: A review. **Inorganic Materials**, v. 49, n. 14, p. 1264–1271, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0020168513140033>>. Acesso em: 9/7/2019.

CADORIM, H. R.; PEREIRA, É. R.; CARASEK, E.; WELZ, B.; DE ANDRADE, J. B. Determination of sulfur in crude oil using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the SnS molecule in a graphite furnace. **Talanta**, v. 146, p. 203–208, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.088>>. .

CAMERA, A. S.; ARCÊNIO, P. P.; PACHECO FILHO, W. DE O.; et al. Method development and validation for sulfur determination via CS molecule in petroleum green coke by high resolution continuum source molecular absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 301–308, 2017. Elsevier B.V.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.022>>. .

CARNEIRO, M. F. H.; MORESCO, M. B.; CHAGAS, G. R.; 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. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-010-8947-z>>. Acesso em: 8/11/2018.

CARNEIRO, M. T. W. D. **Determinação de elementos menores e traços em cabelo humano por ICP-MS, visando o estabelecimento dos intervalos de referência para populações urbana e rural**, 1999. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

CARNEIRO, M. T. W. D.; SILVEIRA, C. L. P. DA; MIEKELEY, N.; FORTES, L. M. DE C. Intervalos de referência para elementos menores e traço em cabelo humano para a população da cidade do Rio de Janeiro &lt;FONT FACE=Symbol&gt;-&lt;/FONT&gt; Brasil. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 37–45, 2002. SBQ. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000100008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000100008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 22/11/2018.

CHESNIN, L.; YIEN, C. H. Turbidimetric Determination of Available Sulfates1. **Soil Science Society of America Journal**, v. 15, n. C, p. 149, 1951. Soil Science Society of America. Disponível em: <<https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/15/C/SS01500C0149>>. Acesso em: 19/8/2019.

CHOJNACKA, K.; ZIELIŃSKA, A.; MICHALAK, I.; GÓRECKI, H. The effect of dietary habits on mineral composition of human scalp hair. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 188–194, 2010. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668910001134>>. Acesso em: 9/5/2019.

DAWSON, P. A. Sulfate in fetal development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 6, p. 653–659, 2011. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952111000425>>. Acesso em: 18/10/2018.

DREWS, A. Standard Test Method for Sulfur in Petroleum Products by X-Ray Spectrometry. **Manual on Hydrocarbon Analysis, 6th Edition**, v. i, p. 402-

402–4, 2008.

E., T.; D., V.; G., D. Gender as a key factor in trace metal and metalloid content of human scalp hair. A multi-site study. **Science of The Total Environment**, v. 573, p. 996–1002, 2016. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716318812#bb0430>>. Acesso em: 8/5/2019.

ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 438–449, 2009. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008001992#bib24>>. Acesso em: 21/5/2019.

FERNÁNDEZ, B.; LOBO, L.; PEREIRO, R. **Atomic Absorption Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Capabilities**. 3º ed. Elsevier Inc., 2018.

FERREIRA, H. S.; LEPRI, F. G.; WELZ, B.; CARASEK, E.; HUANG, M.-D. Determination of sulfur in biological samples using high-resolution molecular absorption spectrometry in a graphite furnace with direct solid sampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 1039, 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b925739j>>. .

FERREIRA, S. L. C.; BEZERRA, M. A.; SANTOS, A. S.; et al. Atomic absorption spectrometry e A multi element technique. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 1–6, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.012>>. .

GONÇALVES, R. **Estudo da variação temporal e espacial de metais tóxicos em sedimentos na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil**, 2018. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

GRABEKLIS, A. R.; SKALNY, A. V.; SKALNAYA, A. A.; et al. Hair Mineral and Trace Element Content in Children with Down's Syndrome. **Biological Trace Element Research**, v. 188, n. 1, p. 230–238, 2019. Biological Trace Element Research.

HARKEY, M. R. Anatomy and physiology of hair. **Forensic Science International**, v. 63, n. 1–3, p. 9–18, 1993. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0379073893902559>>. Acesso em: 26/2/2019.

HE, X.; MEI, Y.; WANG, Y.; SUN, W.; SHEN, M. Determination of inorganic anions in the whole blood by ion chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 163, p. 58–63, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708518305934>>. Acesso em: 18/10/2018.

HEITMANN, U.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HUANG, D. Determination of non-metals via molecular absorption using high- resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. , p. 1314–1320, 2006.

KASS, M.; IVASKA, A. Spectrophotometric determination of sulphur dioxide and hydrogen sulphide in gas phase by sequential injection analysis technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 449, n. 1–2, p. 189–197, 2001. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267001013642>>. Acesso em: 19/8/2019.

KINTZ, P.; SALOMONE, A.; VINCENTI, M. **Hair analysis in clinical and forensic toxicology**. .

LAU, C.; QIN, X.; LIANG, J.; LU, J. Determination of cysteine in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis with a chemiluminescence detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, n. 1, p. 45–49, 2004. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267004000297>>. Acesso em: 27/5/2019.

LI, Z.; CARNRICK, G.; SLAVIN, W. Rapid analysis with transversely heated graphite furnace atomic absorption spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 48, n. 11, p. 1435–1443, 1993. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/058485479380130M>>. Acesso em: 7/6/2019.

LLORENTE BALLESTEROS, M. T.; NAVARRO SERRANO, I.; IZQUIERDO ÁLVAREZ, S. Reference levels of trace elements in hair samples from children and adolescents in Madrid, Spain. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 43, p. 113–120, 2017. Urban & Fischer. Disponível em:



<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X16302486#bib0090>>. Acesso em: 22/11/2018.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. **Chemometrics: a textbook**. New York: Elsevier B.V., 1988.

MIEKELEY, N.; DIAS CARNEIRO, M. T. .; PORTO DA SILVEIRA, C. . How reliable are human hair reference intervals for trace elements? **Science of The Total Environment**, v. 218, n. 1, p. 9–17, 1998. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969798001855>>. Acesso em: 26/11/2018.

MIKULEWICZ, M.; CHOJNACKA, K.; GEDRANGE, T.; GÓRECKI, H. Reference values of elements in human hair: A systematic review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 1077–1086, 2013. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913002044#bib0015>>. Acesso em: 8/11/2018.

NAKADI, F. V.; CARCINONI SOARES, A. L.; MESQUITA SILVA DA VEIGA, M. A. Determination of sulfur in diesel via CS molecule by high-resolution molecular absorption spectrometry applying palladium nanoparticles as chemical modifier. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 29, n. 10, p. 1871–1879, 2014. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4JA00203B>>. Acesso em: 8/11/2018.

ORTNER, H. M.; BULSKA, E.; ROHR, U.; et al. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry — mechanisms of action ( A tutorial review ) □. , v. 57, n. April, p. 1835–1853, 2002.

OZBEK, N.; BAYSAL, A. Determination of sulfur by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry: Review of studies over the last 10 years. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 88, p. 62–76, 2017a. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993616301522#bib6>>. Acesso em: 19/8/2019.

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

**Atomic Spectroscopy**, v. 130, p. 17–20, 2017b. Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S058485471630310X>.

Acesso em: 9/7/2018.

PARCELL, S. Sulfur Review Sulfur in Human Nutrition and Applications in Medicine. , v. 7, n. 1, 2002.

PEREGRINO, G. DOS S. **Estudo da composição mineral de cabelo relacionada com o uso de tratamentos estéticos**, 2016. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

PEREIRA, É. R.; WELZ, B.; VIEIRA, A. A. A systematic look at the carbon monosulfide molecule and chemical modifiers for the determination of sulfur by HR-CS GF MAS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 8, p. 1394–1401, 2018.

PEREIRA, R.; RIBEIRO, R.; GONÇALVES, F. Scalp hair analysis as a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal). **Science of The Total Environment**, v. 327, n. 1–3, p. 81–92, 2004. Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969704000580#BIB20>. Acesso em: 16/5/2019.

PETERNELLI, L. A.; MELLO, M. P. **Conhecendo o R: uma visão estatística**. Viçosa: Editora UFV, 2011.

POPESCU, C.; HÖCKER, H. Hair—the most sophisticated biological composite material. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 8, p. 1282, 2007. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b604537p>. Acesso em: 28/11/2018.

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. Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267017310632>. Acesso em: 18/10/2018.

QUADROS, D. P. C.; CHAVES, E. S.; LEPRI, F. G.; et al. Evaluation of brazilian and venezuelan crude oil samples by means of the simultaneous determination of ni and v as their total and non-volatile fractions using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Energy and Fuels**, v. 24, n. 11, p. 5907–5911, 2010.

RAPOSO, J. C.; NAVARRO, P.; SARMIENTO, A.; et al. Analytical proposal for trace element determination in human hair. Application to the Biscay province population, northern Spain. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 125–134, 2014. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X1400071X>>. Acesso em: 26/11/2018.

RESANO, M.; FLÓREZ, M. R.; GARCÍA-RUIZ, E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 85–97, 2013. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854713001596#bb0090>>. Acesso em: 3/6/2019.

RIETVELD, T.; VAN HOUT, R. The paired t test and beyond: Recommendations for testing the central tendencies of two paired samples in research on speech, language and hearing pathology. **Journal of Communication Disorders**, v. 69, p. 44–57, 2017. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002199241630199X>>. Acesso em: 27/6/2019.

RODRIGUES, J. L.; BATISTA, B. L.; NUNES, J. A.; PASSOS, C. J. S.; BARBOSA, F. 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. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896970800661X>>. Acesso em: 15/5/2019.

RYABUKHIN, Y. S. **Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants**. 1976.

SADAGOV, Y. M.; KATSKOV, D. A. Effect of palladium modifier on the analyte vapor transport in a graphite furnace atomizer. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 8, p. 1397–1405, 2001. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854701002506#BIB3>>. Acesso em: 7/6/2019.

SAZAKLI, E.; LEOTSINIDIS, M. Hair biomonitoring and health status of a

general population exposed to Nickel. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 43, p. 161–168, 2017. Urban & Fischer. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X16302516#bib0055>>. Acesso em: 16/5/2019.

SCHLEMMER, G.; WELZ, B. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 41, n. 11, p. 1157–1165, 1986. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0584854786801756>>. Acesso em: 28/6/2019.

SHAPIRO, A. S. S.; WILK, M. B. Biometrika Trust An Analysis of Variance Test for Normality ( Complete Samples ) Published by : Oxford University Press on behalf of Biometrika Trust Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2333709> Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance. **Biometrika**, v. 52, n. 3, p. 591–611, 1965.

SILVA, M. M.; DAMIN, I. C. F.; VALE, M. G. R.; WELZ, B. Feasibility of using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry for speciation analysis of volatile and non-volatile compounds of nickel and vanadium in crude oil. **Talanta**, v. 71, n. 5, p. 1877–1885, 2007. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914006005959#bib9>>. Acesso em: 22/5/2018.

SZYNKOWSKA, M. I.; MARCINEK, M.; PAWLACZYK, A.; ALBIŃSKA, J. Human hair analysis in relation to similar environmental and occupational exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 402–408, 2015. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668915300302>>. Acesso em: 8/11/2018.

TOBIN, D. J. Biology of Hair. The Biogenesis and Growth of Human Hair. In: D. J. Tobin (Org.); **Hair in Toxicology**. p.1–33, 2005. Cambridge: Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847552518-00001>>. Acesso em: 28/11/2018.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Sulfur containing amino acids and human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 1, p. 47–55,

2004. Elsevier Masson. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332203001926>>. Acesso em: 18/10/2018.

TREON, J. F.; CRUTCHFIELD, W. E. Rapid Turbidimetric Method for Determination of Sulfates. **Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition**, v. 14, n. 2, p. 119–121, 1942.

TSANACLIS, L.; ANDRAUS, M.; WICKS, J. Hair analysis when external contamination is in question: A review of practical approach for the interpretation of results. **Forensic Science International**, v. 285, p. 105–110, 2018. Elsevier. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073818300422#bib0020>>. Acesso em: 21/5/2019.

URBANEK, S.; PLUMMER, M. R Software. Disponível em:  
<<https://www.r-project.org/about.html>>. .

VALDIVIA, A. C.; ALONSO, E. V.; GUERRERO, M. M. L.; et al. Simultaneous determination of V, Ni and Fe in fuel fly ash using solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 179, n. July 2017, p. 1–8, 2018. Elsevier B.V. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.033>>. .

VARRICA, D.; TAMBURRO, E.; MILIA, N.; et al. Metals and metalloids in hair samples of children living near the abandoned mine sites of Sulcis-Inglesiente (Sardinia, Italy). **Environmental Research**, v. 134, p. 366–374, 2014. Academic Press. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935114002734>>. Acesso em: 2/5/2019.

VIEIRA, A. A.; PEREIRA, É. R.; CARASEK, E.; WELZ, B. The use of Ca + Pd + Zr as modifiers in the determination of sulfur by HR-CS GF MAS with solid sampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 3, p. 498–503, 2019. The Royal Society of Chemistry. Disponível em:  
<<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8JA00445E>>. Acesso em: 20/8/2019.

WANG, X.; GUO, Z. The Role of Sulfur in Platinum Anticancer Chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 19–34, 2008.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. **High-**

**Resolution Continuum Source AAS.** 1<sup>a</sup> ed. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry: what can we expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 220–229, 2003. Brazilian Chemical Society. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532003000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532003000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 4/6/2019.

WELZ, B.; BORGES, D. L. G.; LEPRI, F. G.; et al. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — An analytical and diagnostic tool for trace analysis ☆. , v. 62, n. November 2006, p. 873–883, 2007.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry.** Third ed. Uhlidingen: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999.

WOŁOWIEC, P.; MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; MIKULEWICZ, M. Hair analysis in health assessment. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 139–171, 2013. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898113000405>>. Acesso em: 18/10/2018.

ZAICHICK, S.; ZAICHICK, V. The effect of age and gender on 37 chemical element contents in scalp hair of healthy humans. **Biological Trace Element Research**, v. 134, n. 1, p. 41–54, 2010.

ZHONG, Z.; LI, G.; ZHU, B.; et al. A rapid distillation method coupled with ion chromatography for the determination of total sulphur dioxide in foods. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1044–1050, 2012. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461101363X>>. Acesso em: 19/8/2019.

# Anexo I

Cópia adaptada do certificado do material de referência NCS DC73347a de cabelo humano aprovado pela China National Analysis Center of Iron and Steel (Beijing, China) emitido em 2007. (Valor de S apresentado em % m/m)

Certified values and uncertainty

Element	Certified values	Element	Certified values	Element	Certified values
Ag(10 <sup>-6</sup> )	(50)	Ce(10 <sup>-6</sup> )	(0.35)	Fe(10 <sup>-6</sup> )	36 ± 5
Al(10 <sup>-2</sup> )	(2)	Cl(10 <sup>-2</sup> )	(0.018)	Gd(10 <sup>-6</sup> )	20 ± 5
As(10 <sup>-6</sup> )	0.28 ± 0.05	Co(10 <sup>-6</sup> )	0.045 ± 0.009	Ge(10 <sup>-6</sup> )	
B(10 <sup>-6</sup> )	2.9 ± 0.5	Cr(10 <sup>-6</sup> )	0.41 ± 0.12	Hf(10 <sup>-6</sup> )	(0.6)
Ba(10 <sup>-6</sup> )	11.4 ± 0.6	Cs(10 <sup>-6</sup> )	(0.003)	Hg(10 <sup>-6</sup> )	670 ± 100
Be(10 <sup>-6</sup> )	110 ± 7	Cu(10 <sup>-6</sup> )	14.3 ± 1.6	Ho(10 <sup>-6</sup> )	4.6 ± 1.8
Bi(10 <sup>-6</sup> )	21 ± 2	Dy(10 <sup>-6</sup> )	20 ± 7	I(10 <sup>-6</sup> )	0.8 ± 0.2
Br(10 <sup>-6</sup> )	(1.1)	Er(10 <sup>-6</sup> )	14 ± 5	K(10 <sup>-2</sup> )	(0.002)
Ca(10 <sup>-2</sup> )	0.145 ± 0.020	Eu(10 <sup>-6</sup> )	3.7 ± 1.1	La(10 <sup>-6</sup> )	0.16 ± 0.04
Cd(10 <sup>-6</sup> )	0.07 ± 0.01	F(10 <sup>-6</sup> )	(11)	Li(10 <sup>-6</sup> )	(1.6)

Element	Certified values	Element	Certified values	Element	Certified values
Lu(10 <sup>-6</sup> )	(2.8)	Rb(10 <sup>-6</sup> )	(0.06)	Ti(10 <sup>-6</sup> )	(3.3)
Mg(10 <sup>-2</sup> )	(0.014)	Si(10 <sup>-2</sup> )	4.19 ± 0.11	Tl(10 <sup>-6</sup> )	7.7 ± 1.1
Mn(10 <sup>-6</sup> )	2.0 ± 0.3	Sb(10 <sup>-6</sup> )	(0.065)	Tm(10 <sup>-6</sup> )	21 ± 0.7
Mo(10 <sup>-6</sup> )	0.17 ± 0.03	Sc(10 <sup>-6</sup> )	(0.018)	U(10 <sup>-6</sup> )	99 ± 15
Ni(10 <sup>-2</sup> )	13.9 ± 0.5	Se(10 <sup>-6</sup> )	0.58 ± 0.12	V(10 <sup>-6</sup> )	0.50 ± 0.18
Na(10 <sup>-6</sup> )	0.0089 ± 0.0012	Si(10 <sup>-2</sup> )	(0.06)	Y(10 <sup>-6</sup> )	11.2 ± 1.7
Nd(10 <sup>-6</sup> )	0.093 ± 0.020	Sm(10 <sup>-6</sup> )	19 ± 6	Yb(10 <sup>-6</sup> )	15 ± 6
Nb(10 <sup>-6</sup> )	0.43 ± 0.12	Sn(10 <sup>-6</sup> )	(0.2)	Zn(10 <sup>-6</sup> )	137 ± 9
P(10 <sup>-2</sup> )	0.014 ± 0.002	Sr(10 <sup>-6</sup> )	7.7 ± 0.4	Ash(%)	(5.5)
Pb(10 <sup>-6</sup> )	5.7 ± 0.5	Tb(10 <sup>-6</sup> )	3.3 ± 0.9		
Pr(10 <sup>-6</sup> )	25 ± 6	Th(10 <sup>-6</sup> )	0.064 ± 0.011		

Note: Data behind "±" are uncertainty; Data with \* means percent. Data in ( ) is reference value.

1. The certified value is the mean of analytical results of no less than 6 independent laboratories.

2. Standard uncertainty U is got by

$$U = t_{0.05(n-1)} \cdot \sqrt{U_A^2 + U_B^2} = t_{0.05(n-1)} \cdot \sqrt{(s/\sqrt{n})^2 + [R/(2 \cdot \sqrt{3}m)]^2}$$

U<sub>A</sub>, U<sub>B</sub> is type A and type B standard uncertainty respectively, t is t value of t distribution from 95% confidence interval

and degree of freedom n-1; S is standard deviation; n is number of data; R is the max difference of the mean of analytical method; m is number of analytical methods for statistic (n ≥ 2). If there is only one kind of method,

3 •  $s/\sqrt{N}$  is used to estimate the uncertainty.

3. The sample is packed in bottle with size less 80 meshes. The minimum weight for analysis is 0.2g.

The sample should be stored at 80 °C for 4 hours before using (for elements that easy to evaporate the temperature is 60 °C).

The package is 6g/bottle.

4. The sample should be tight sealed after each use and stored in drier at dark and cool place.

5. The certification will expire in Dec. 2015, although we reserve the right to make change as issue revisions.

The material was provided by Institute of Geophysical and Geochemical Exploration.