

## DETERMINAÇÃO DE FLÚOR EM FÍGADO ANIMAL POR CROMATOGRÁFIA DE ÍONS APÓS A COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS

CATARINA FERREIRA SANTOS MORAES<sup>1</sup>; TAMIRES DA CONCEIÇÃO RAMIRES<sup>1</sup>; JENIFER HELLER CERQUEIRA<sup>1</sup>; PRISCILA TESSMER SCAGLIONI<sup>2</sup>; MÁRCIA FOSTER MESKO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [cj.ta@hotmail.com](mailto:cj.ta@hotmail.com); [tamires.ramires@hotmail.com](mailto:tamires.ramires@hotmail.com); [jenyferheller@hotmail.com](mailto:jenyferheller@hotmail.com); [marciamesko@yahoo.com.br](mailto:marciamesko@yahoo.com.br);

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande – [priscilascaglioni@gmail.com](mailto:priscilascaglioni@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A eficácia do flúor no combate e prevenção a cárie dentária é comprovada cientificamente, sendo este elemento amplamente utilizado em produtos de higiene bucal, e na fluoretação da água potável em muitos países, como Brasil, Canadá, China e Estados Unidos (CRAIG et al, 2015). Em 1974 tornou-se obrigatória a fluoretação das águas de abastecimento público no Brasil, sendo que a concentração máxima de flúor permitida na água potável é de 1,5 mg L<sup>-1</sup>, conforme Lei nº 6.050 do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1989). Já em dentifrícios, as concentrações de flúor devem estar entre 1000 e 1500 mg L<sup>-1</sup> e em enxaguantes bucais entre 202,5 e 247,5 mg L<sup>-1</sup> conforme a Portaria n.º 22 20/12/1989 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Entretanto, apesar de ser considerado fundamental para a saúde bucal, diversos especialistas discutem a respeito da toxicidade do flúor. Muitos pesquisadores afirmam que tanto a quantidade utilizada na água fluoretada quanto nos produtos de higiene bucal é inofensiva, enquanto alguns estudos demonstram que o acúmulo deste elemento no organismo pode causar danos à saúde. Dentre os danos, destaca-se a fluorose dentária, assim como possíveis danos hepáticos, tendo em vista que o fígado é um sítio ativo do metabolismo corporal, este órgão pode estar especialmente suscetível à intoxicação pelo flúor (CHAN, et al, 2013; JOHNSON, 2020).

Neste sentido, destaca-se a importância de estudos e desenvolvimento de métodos para a determinação de flúor, assim como para a avaliação das consequências causadas por concentrações deste elemento no organismo humano. A falta de métodos universais de análise aumenta a necessidade do desenvolvimento de estratégias, muitas vezes devido aos métodos clássicos e/ou oficiais se encontrarem ultrapassados ou não atenderem as demandas atuais. O estudo para determinação de halogênios deve seguir uma sequência analítica, onde uma das etapas de maior importância é o preparo de amostras, que tem por objetivo converter a amostra em uma forma adequada para introdução no instrumento em que será feita a quantificação.

A combustão iniciada por micro-ondas (MIC), é uma alternativa satisfatória para o preparo de amostras que contenham flúor, pois este método consiste na digestão da amostra por meio da reação de combustão, possibilitando a utilização de soluções diluídas, especialmente as alcalinas, que são consideradas adequadas para a absorção de halogênios, como o flúor, minimizando a perda dos analitos. A MIC possibilita a obtenção de uma eficiente decomposição da amostra em sistema fechado assistido por radiação micro-ondas (KRUG, 2019). Dentre as técnicas analíticas para determinação de flúor, a cromatografia de íons com detector por condutividade (IC-CD) é promissora, pois apresenta melhor sensibilidade, quando

comparada ao emprego do eletrodo íon seletivo, e menor custo de operação, quando comparada às técnicas espectrométricas (MELLO et al., 2013).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um método analítico adequado para determinação de flúor em fígado utilizando a IC-CD após decomposição por MIC.

## 2. METODOLOGIA

Neste estudo, foram avaliados diferentes métodos de pré-tratamento utilizando amostras de fígado bovino, adquiridas em comércio local da cidade de Pelotas-RS. Os pré-tratamentos foram realizados em triplicata e consistiram em : i) secagem em estufa a 55 °C; ii) secagem em estufa a 100 °C, e iii) liofilização a -55 °C. Após a etapa de secagem ou liofilização, as amostras passaram pela etapa de maceração, com a utilização de um gral e pistilo, todos os materiais foram previamente descontaminados com água ultrapura e álcool bidestilado.

A fim de avaliar a massa máxima de amostra possível de ser utilizada com eficiência na MIC, foram feitos testes de massa, em que foram testados 500 e 600 mg de amostra, estas foram pesadas e envolvidas em filmes de polietileno, formando invólucros posteriormente selados com uma fonte de aquecimento. Para cada condição de pré-tratamento, 55 °C, 100 °C e -55 °C, foi realizado o preparo das amostras por MIC em triplicata. Os invólucros preparados foram depositados, separadamente, em suportes de quartzo contendo papel filtro previamente umedecido com 50 µL de solução ignitora de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 6 mol  $\text{L}^{-1}$ , sendo inseridos, em seguida, no interior de frascos de quartzo contendo 6 mL da solução absorvedora. Os frascos foram fechados com suas respectivas tampas, fixados ao rotor, pressurizados a 20 bar de  $\text{O}_2$  e levados ao forno micro-ondas (Multiwave 3000®, Anton Paar, Áustria). Foi selecionado o programa de irradiação por 5 min de 1400 W, seguido por 20 min da etapa de resfriamento 0 W. As soluções obtidas foram recolhidas, avolumadas à 20 mL com água ultrapura e armazenadas em frascos de polipropileno. Neste estudo, para cada pré-tratamento foram avaliadas diferentes concentrações da solução absorvedora de hidróxido de amônio, as quais foram de 100, 150 e 200 mmol  $\text{L}^{-1}$ . Foram realizados dois ensaios de recuperação, conforme descrito na Tabela 1. O ensaio 1 teve como objetivo verificar a influência do pré-tratamento na recuperação de flúor, enquanto que o ensaio 2 focou na avaliação da influência do preparo das amostras na recuperação. Para ambos ensaios de recuperação a solução padrão de fluoreto foi preparada a partir de fluoreto de sódio (Merck, Alemanha).

**Tabela 1.** Condições experimentais dos ensaios de recuperação por adição de padrão.

Ensaio de recuperação	Concentração da solução padrão de fluoreto (mg $\text{L}^{-1}$ )	Volume da solução padrão utilizado (mL)	Massa de amostra (g)	Momento da adição	Concentração final esperada (mg $\text{L}^{-1}$ )*
1	2,1	0,5	5	Antes do pré-tratamento	0,05
2	1000	0,02	0,5	Após o pré-tratamento	0,05

\*correspondente a 100% de recuperação.

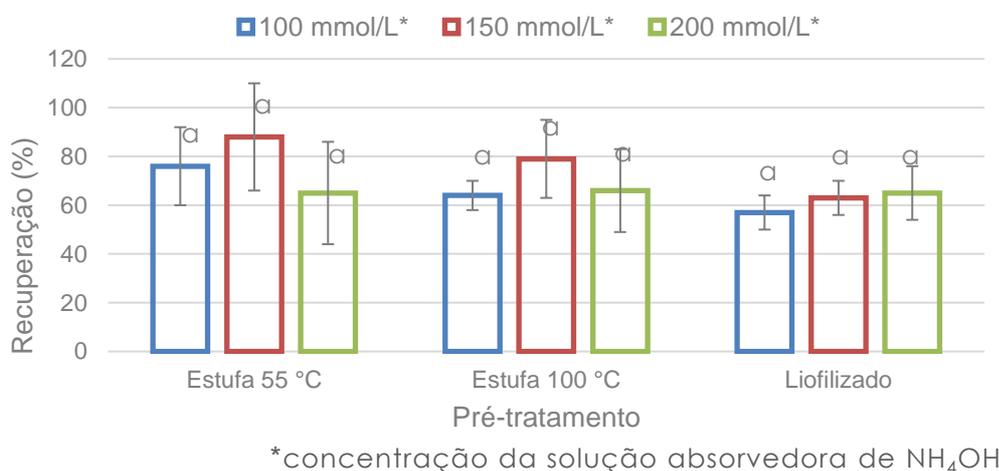
A determinação de fluoreto foi realizada em um cromatógrafo de íons (ICS5000, Dionex/Thermo Fisher Scientific, USA) equipado com supressora de ânions eletroliticamente regenerada (Dionex ERS 500) e detecção por

condutividade. Os resultados foram obtidos por meio do software Chromeleon 7.0 (Thermo Fisher Scientific), sendo determinados com a integração da área dos picos gerados nos cromatogramas. Foi utilizada uma curva padrão de fluoreto com cinco pontos, com concentrações de 0,01 a 0,1 mg L<sup>-1</sup>. A análise estatística dos resultados foi realizada por ANOVA seguido do teste *t-Student* com intervalo de confiança de 95%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No pré-tratamento de 55 °C, a secagem foi realizada por aproximadamente 19 h, até a obtenção de peso constante da massa final da amostra, demonstrando que a umidade presente na amostra havia sido removida. Nos pré-tratamentos à 100 °C e por liofilização foram necessários tempos de secagem menores (aproximadamente 10 h) até a obtenção de peso constante da amostra.

Com o ensaio de massa, foi possível determinar que 500 mg foi a massa máxima de amostra a ser completamente decomposta por MIC, tendo em vista que quando utilizada a massa de 600 mg, foram verificados resíduos no frasco e no suporte, o que indicaram uma combustão incompleta da amostra. Posteriormente, foi realizada a avaliação da solução absorvedora e pré-tratamentos executados. Tendo em vista que o fluoreto não foi detectado originalmente nas amostras de fígado utilizadas, foi necessária a realização de ensaios de recuperação. O ensaio de recuperação 1 resultou em recuperações de 57 a 88% (Figura 1), não diferindo entre si em um nível de confiança de 95%. O pré-tratamento escolhido foi de secagem em estufa a 55 °C, tendo em vista que este pré-tratamento indicou uma tendência a maior recuperação dos níveis iniciais de flúor adicionados nas amostras.



**Figura 1.** Recuperação (%) de fluoreto em amostras de fígado bovino com adição de padrão anterior ao pré-tratamento das amostras (média ± desvio padrão, n=3). Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferem significativamente (Teste *t-Student*, intervalo de confiança de 95%).

A partir disso, foram efetuados os ensaios de recuperação 2, com a adição da solução padrão após a etapa de secagem a 55°C, obtendo-se uma melhoria da recuperação de fluoreto (Tabela 2). Estes resultados demonstram que o método de preparo de amostras de fígado por MIC é adequado para a posterior determinação de flúor.

**Tabela 2.** Recuperação (%) de fluoreto em amostras de fígado bovino com adição de padrão posterior a secagem da amostra em estufa a 55 °C (média ± desvio padrão, n=3).

Concentração da solução absorvedora (NH <sub>4</sub> OH)	Pré-tratamento
	Estufa 55 °C
100 mmol/L	97 ± 4 <sup>a</sup>
150 mmol/L	102 ± 8 <sup>a</sup>
200 mmol/L	92 ± 8 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente (Teste t-Student, intervalo de confiança de 95%).

As três concentrações da solução absorvedora utilizadas resultaram em recuperações adequadas, sem diferença estatística entre elas, entretanto, a solução absorvedora que apresentou melhor comportamento foi a de 150 mmol L<sup>-1</sup>, uma vez que apresentou recuperações entre 95 e 111%, ressaltando a obtenção de desvios padrão inferiores a 10%, o que caracteriza uma boa repetibilidade dos resultados.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a MIC é um método eficiente para o preparo de amostras, apresentando adequada decomposição da quantidade de amostra avaliada e posterior determinação de flúor por IC-CD por meio da realização de ensaios de recuperação. As soluções absorvedoras possibilitaram a obtenção de recuperações acima de 90% para o ensaio de recuperação 2, indicando uma perda insignificante do analito durante o preparo das amostras. Com isto, vale mencionar que o presente estudo deverá ser continuado por meio de outros ensaios de recuperação utilizando diferentes níveis de concentração dos analitos nas soluções padrão adicionadas, bem como pela utilização de material de referência certificado (CRM). Por fim, o método desenvolvido será aplicado para avaliar as concentrações de flúor presente no fígado de ratos previamente expostos a diferentes concentrações de flúor.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAN, L. et al. Human exposure assessment of fluoride from tea (*Camellia sinensis* L.): a UK based issue. **Food Res.** v.51, p.564-570, 2013.
- CRAIG, L. et al. Recommendations for fluoride limits in drinking water based on estimated daily fluoride intake in the Upper East Region, Ghana, **Sci. Total Environ.** v.532, p.127-137, 2015.
- JOHNSON, L. E. **Excesso de flúor.** Junho 2020. Acessado em 20 de junho de 2022. Online. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/casa/dist%C3%BAr-bios-nutricionais/minerais/excesso-de-fl%C3%BAor>
- KRUG, F. J. et al. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. **EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química.** p.17-18;25-26, 2019
- MELLO, P. A; et al. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.405, n.24, p.7615-7642, 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n.º 22 de 20 Dezembro de 1989. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF. pg. 24111, 1989.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 79, de 28 de agosto de 2000. **Diário Oficial União.** p.1415-1537, 2000.