

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
BROMO E IODO POR *ICP-MS* EM SALIVA DE ORIGEM HUMANA**

Julia Eisenhardt de Mello

PELOTAS, RS

2018

Julia Eisenhardt de Mello

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE BROMO E IODO POR *ICP-MS* EM SALIVA DE
ORIGEM HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção (Área: Toxicologia)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko

PELOTAS, RS

2018

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M527d

Mello, Julia Eisenhardt de

Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de bromo e iodo por ICP-MS em saliva de origem humana / Julia Eisenhardt de Mello. – 78f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2018. – Orientador Márcia Foster Mesko.

1. Preparo de amostras. 2. Saliva. 3. ICP-MS. 4. Bromo. 5. Iodo. I. Mesko, Márcia Foster. II. Título.

CDD: 547.3085

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada "Desenvolvimento e Aplicação de Métodos para a Determinação de Bromo e Iodo por ICP-MS em saliva de origem humana", de autoria de Julia Eisenhardt de Mello.

Banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko (Orientadora) – UFPel



Prof.^a Dr.^a Ethel Antunes Wilhelm – UFPel



Prof.^a Dr.^a Rochele Sogari Picoloto – UFSM

Dedico este trabalho a minha família, por todo o apoio, carinho e compreensão ao longo da minha vida. Principalmente aos meus pais, por serem meus maiores exemplos de dedicação, honestidade e amor ao trabalho exercido, por acreditarem no meu potencial e permitirem seguir os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, pela possibilidade de execução deste trabalho.

À CAPES que fomentou esta pesquisa e me concedeu uma bolsa de estudos durante o período do mestrado, bem como ao CNPq e à FAPERGS pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pelas oportunidades, apoio, incentivo e orientação, na qual contribuíram com o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Érico M. M. Flores da Universidade Federal de Santa Maria, pela parceria realizada durante esta pesquisa, a qual me possibilitou realizar parte do trabalho em seu laboratório.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, Carla Harwtig, Diogo Novo, Fernanda Balbinot, Filipe Rondan, Janaína Brum, Natália Bielemann, Priscila Scaglioni e Rodrigo Pereira, pelo apoio, amizade e auxílio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que fizeram parte do início desta pesquisa, Gilberto Coelho, Luan Passos, Tainá Teixeira e Vanize da Costa, pela motivação, parceria e amizade criada nesse pouco tempo de convivência.

Em especial, agradeço a minha família e amigos por ser a base fundamental da minha vida, por todo o apoio, amizade, compreensão e incentivo. Também deixo o agradecimento a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente durante este período.

Sumário

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
A glândula tireoide e suas disfunções.....	15
A atividade do bromo e iodo no organismo humano	18
Uso de amostras biológicas na avaliação do estado de saúde humana	19
Uma abordagem acerca da saliva: Propriedades, aspectos gerais e técnicas utilizadas para a determinação de bromo e iodo.....	21
Preparo de amostras	24
Preparo de amostras com soluções alcalinas	26
Combustão iniciada por micro-ondas.....	27
Técnicas de determinação de halogênios.....	29
Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
Instrumentação	33
Reagentes	34
Materiais Diversos	35
Amostra	36
Métodos de preparo de amostras avaliados para saliva	37
Combustão iniciada por micro-ondas.....	37
Dissolução assistida por radiação micro-ondas	39
Centrifugação.....	40
Determinação de bromo e iodo por ICP-MS	40
Determinação de carbono por ICP OES	42
Limites de detecção	42

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
Métodos de preparo de amostras	45
Preparo da amostra por combustão iniciada por micro-ondas	45
Otimização do volume de amostra.....	45
Tempo de ignição e combustão	47
Otimização da solução absorvedora para a determinação de bromo e iodo após a MIC	48
Branco analítico e limites de detecção	50
Preparo da amostra por dissolução assistida por radiação micro-ondas	51
Avaliação da solução dissolvente e otimização do volume de amostra	51
Avaliação do programa de irradiação com micro-ondas	54
Análise da saliva após centrifugação.....	57
Comparação entre os diferentes métodos de preparo de amostra avaliados	58
5 CONCLUSÃO.....	62
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programa de irradiação utilizado no processo de combustão iniciada por micro-ondas	39
Tabela 2. Programa de irradiação utilizado na dissolução assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.....	39
Tabela 3. Parâmetros operacionais para a determinação de bromo e iodo por ICP-MS.....	40
Tabela 4. Parâmetros operacionais para a determinação de carbono por ICP OES.....	42
Tabela 5. Volume de saliva e massa de celulose microcristalina utilizadas para a decomposição por MIC.....	46
Tabela 6. Limites de detecção de bromo e iodo, obtidos por ICP-MS após MIC, utilizando 0,2 mL de amostra, 300 mg de celulose microcristalina e NH ₄ OH 50 mmol L ⁻¹ como solução absorvedora.....	49
Tabela 7. Concentração de bromo e iodo após o preparo de amostra por dissolução assistida por radiação micro-ondas, utilizando diferentes soluções dissolutoras, e posterior determinação por ICP-MS (média ± sd, µg mL ⁻¹ , n = 3)	52
Tabela 8. Concentração de bromo e iodo em saliva por ICP-MS, após diferentes métodos de preparo de amostras (média ± sd, µg mL ⁻¹ , n = 3).....	57
Tabela 9. Comparação entre as concentrações de bromo e iodo após o preparo de amostras por MIC e por dissolução assistida por radiação micro-ondas em amostras de 5 indivíduos diferentes. Determinação por ICP-MS (média ± sd, µg mL ⁻¹ , n = 3)	58
Tabela 10. Limites de detecção para bromo e iodo obtidos por ICP-MS após os diferentes métodos de preparo de amostras	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização da glândula tireoide.....	15
Figura 2. Estrutura molecular da (A) T ₃ e (B) T ₄	15
Figura 3. Vista lateral da cavidade bucal e localização das glândulas salivares maiores.....	22
Figura 4. Frascos de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas.....	27
Figura 5. (A) Forno de micro-ondas (Multiwave 3000®), (B) rotor equipado com oito frascos para o preparo das amostras, (C) frasco de quartzo utilizado na MIC, (D) frasco de PTFE-TFM utilizado no método de dissolução e (E) suporte de quartzo utilizado no procedimento de MIC	33
Figura 6. (A) Frasco de quartzo contendo a solução absorvedora e suporte de quartzo e (B) suporte de quartzo contendo a amostra na forma de invólucro e o papel filtro umedecido com 50 µL de NH ₄ NO ₃	38
Figura 7. Frascos de quartzo fechados, fixados no rotor e sendo pressurizados com oxigênio	38
Figura 8. Adaptação da capa de proteção e modo de visualização da combustão	47
Figura 9. Recuperações para bromo e iodo em amostras de saliva, decompostas por MIC e determinadas por ICP-MS, após a adição de solução padrão com 50% da concentração inicial	49
Figura 10. Aspecto das soluções obtidas após a dissolução assistida por radiação micro-ondas, de 0,5 a 2 mL de saliva, utilizando NH ₄ OH 25 mmol L ⁻¹ como solução dissolutora	54
Figura 11. Aspecto das soluções obtidas após a dissolução de 2 mL de saliva utilizando NH ₄ OH 25 mmol L ⁻¹ como solução dissolutora; rampa de aquecimento de 5 min até 1000 W e permanência da radiação micro-ondas de (A) 3 min, (B) 5 min, (C) 10 min, (D) 20 min e (E) 50 min	55
Figura 12. Temperaturas atingidas durante a dissolução de 2 mL de saliva com NH ₄ OH 25 mmol L ⁻¹ , em diferentes tempos de permanência em 1000 W	56

LISTA DE ABREVIATURAS

DIT – Diiodotirosina

EDXRF - Espectrometria de fluorescência de dispersão de raios-X, do inglês *energy dispersive X-Ray Fluorescence*

HTMA – Hidróxido de tetrametil amônio

IC – Cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ISE – Eletrodo íon seletivo, do inglês *ion selective electrode*

LD – Limite de detecção

MIC – Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave-induced combustion*

MIT – Monoiodotirosina

NAA - Análise por ativação com nêutrons, do inglês *neutron activation analysis*

PTFE-TFM - Politetrafluoretileno modificado, do inglês *modified polytetrafluoroethylene*

RSD - Desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

T₃ – Triiodotironina

T₄ – Tiroxina

TBG - Globulina ligadora da tiroxina, do inglês *thyroxine-binding globulin*

TRH - Hormônio liberador de tireotrofina, do inglês *thyrotropin-releasing hormone*

TSH - Hormônio estimulante da tiroide, do inglês *thyroid-stimulating hormone*

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados métodos de preparo de amostra visando à posterior determinação de bromo e iodo por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em saliva. Neste sentido, foram avaliados os métodos como a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), dissolução assistida por radiação micro-ondas e a análise direta da saliva (após centrifugação da amostra). Assim, tipos e concentrações de soluções foram avaliadas com o intuito de selecionar a solução mais adequada aos métodos avaliados. Para a MIC, foram utilizados 0,2 mL de saliva e 300 mg de celulose microcristalina, e os analitos foram absorvidos em uma solução de NH_4OH 50 mmol L^{-1} . Os limites de detecção (LD) foram de 0,08 e 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para bromo e iodo, respectivamente. Na dissolução assistida por radiação micro-ondas, foram dissolvidos 2 mL de saliva em uma solução de NH_4OH 25 mmol L^{-1} , LDs inferiores aos da MIC foram obtidos, na ordem de 0,005 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bromo e 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para iodo. Quando realizada a centrifugação das amostras, não foi possível obter recuperações quantitativas para iodo. Os métodos baseados na MIC e na dissolução assistida por radiação micro-ondas mostraram-se adequados para a determinação de ambos os analitos, apresentando adequada exatidão, precisão e baixos LDs.

Palavras-chave: Preparo de amostras, saliva, ICP-MS, bromo, iodo.

ABSTRACT

In this work, sample preparation methods were evaluated for the further determination of bromine and iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in saliva. In this sense, methods such as microwave-induced combustion (MIC), microwave assisted dissolution and direct analysis of saliva (after sample centrifugation) were evaluated. Thus, types and concentrations of solutions were evaluated in order to select the most appropriate solution to the evaluated methods. For MIC, 0.2 mL of saliva and 300 mg of microcrystalline cellulose were used, and the analytes were absorbed in 50 mmol L⁻¹ NH₄OH solution. The limits of detection (LOD) were 0.08 and 0.03 µg mL⁻¹ for bromine and iodine, respectively. In the microwave assisted dissolution, 2 mL of saliva were dissolved in a solution of 25 mmol L⁻¹ NH₄OH, LODs lower than the MIC were obtained in the order of 0.005 µg mL⁻¹ for bromine and 0.001 µg mL⁻¹ for iodine. When the samples were centrifuged, it was not possible to obtain quantitative recoveries for iodine. The methods based on the MIC and microwave assisted dissolution were suitable for the determination of both analytes, presenting adequate accuracy, precision and low LDs.

Keywords: Sample preparation, saliva, ICP-MS, bromine, iodine.

1 INTRODUÇÃO

As disfunções na glândula tireoide têm sido cada vez mais recorrentes pela deficiência ou excesso dos níveis de iodo no organismo, o qual é um elemento essencial ao organismo humano, sendo o precursor para a síntese dos hormônios tireoidianos, a triiodotironina (T_3) e a tiroxina (T_4). Diversos estudos têm demonstrado a importância dos níveis dos hormônios tireoidianos para o bom funcionamento do organismo humano e, também têm elucidado os fatores que podem interferir na produção hormonal. Nesse sentido, é demonstrado que o bromo, embora não apresente uma função fisiológica bem conhecida e seu mecanismo de ação no organismo ser desconhecido, este elemento pode interferir na produção de hormônios tireoidianos por apresentar uma similaridade química com o iodo (SMITH *et al.*, 2002; BENSEÑOR *et al.*, 2011; VANDERPUMP, 2011; PAVELKA, 2016).

Com relação à determinação das concentrações desses elementos no organismo, as amostras biológicas são interessantes ferramentas para o biomonitoramento do estado de saúde no organismo (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005). Apesar de algumas matrizes biológicas, como o sangue e a urina serem consolidadas para esse tipo de avaliação, a determinação de elementos essenciais e não essenciais em saliva ainda é bastante restrita. A saliva tem se destacado no ramo da pesquisa, por ser denominada como um filtrado diluído do sangue, e por esse motivo, apresentar informações dos níveis de elementos no organismo. Outro fator que merece destaque para a avaliação desta amostra, é a simplicidade de coleta, estocagem, transporte e manuseio (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005; URBANOWICZ *et al.*, 2017).

Para a determinação de bromo e iodo, a maioria das técnicas de análise necessitam geralmente que a amostra seja introduzida na forma de uma solução compatível com a técnica de determinação, fazendo-se necessária a realização de uma etapa de preparo de amostra previamente a análise. O preparo de amostras para posterior determinação de halogênios torna-se um desafio, uma vez que a digestão por via úmida, comumente utilizada como método de preparo de amostra não é adequada para a determinação desses elementos, visto que em meio ácido podem ocorrer perdas por volatilização. Neste sentido, métodos

de preparo de amostra envolvendo o uso de soluções alcalinas, a combustão da amostra e sistemas fechados têm sido discutidos com o intuito de obter soluções que forneçam recuperações quantitativas para bromo e iodo e que sejam compatíveis com diferentes técnicas de determinação (KRUG, ROCHA, 2016). A determinação de bromo e iodo foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), por apresentar elevada seletividade e baixos limites de detecção, permitindo a determinação de bromo e iodo em níveis traço (KNAPP *et al.*, 1998).

Os métodos avaliados para o preparo da saliva foram a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), a dissolução assistida por radiação micro-ondas, e ainda, a análise da amostra após o processo de centrifugação.

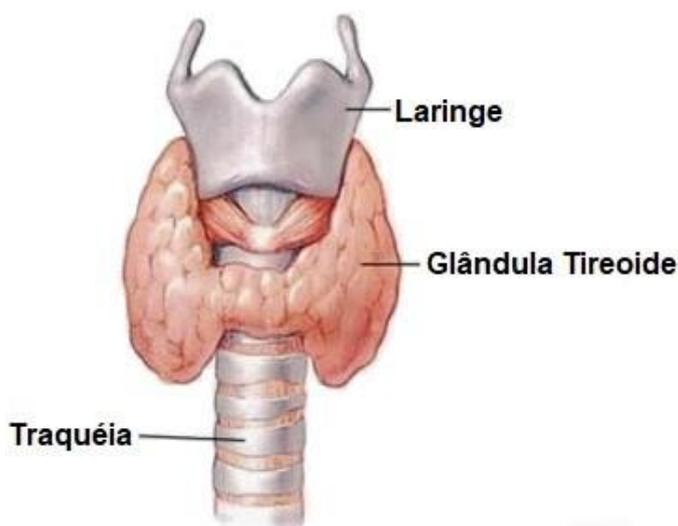
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica está dividida em cinco partes principais. Na primeira delas, é introduzida uma abordagem acerca da glândula tireoide e suas possíveis disfunções. Na segunda parte, são abordados alguns aspectos gerais sobre o bromo e o iodo. Na terceira parte é discutida a importância da avaliação elementar em amostras biológicas de origem humana, com uma abordagem especial para a amostra de saliva. Posteriormente, na quarta parte, é realizada uma descrição sobre os métodos de preparo de amostra comumente utilizados para a subsequente determinação de halogênios em amostras biológicas, sendo dada maior atenção para os métodos utilizados na execução desse trabalho. E para finalizar, na quinta parte, são abordadas técnicas de determinação comumente utilizadas para a determinação de bromo e iodo, sendo dada uma especial atenção a técnica utilizada neste trabalho.

A glândula tireoide e suas disfunções

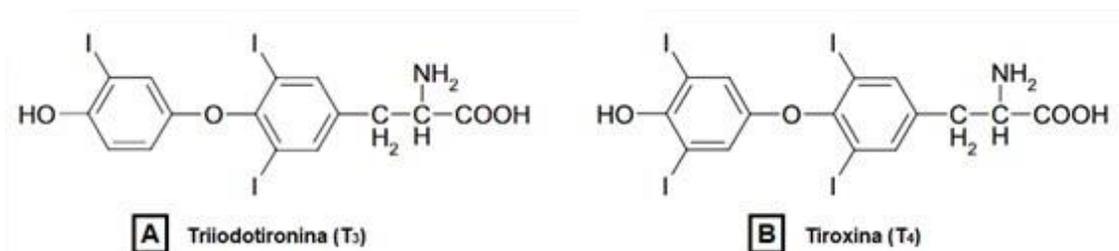
A tireoide é uma das maiores glândulas existente no corpo humano, apresentando o formato de borboleta por ser formada por dois lobos, como pode ser observado na Figura 1. Essa glândula, situa-se na parte anterior do pescoço, abaixo da região conhecida como Pomo de Adão, pesando em torno de 15 a 25 g (SBEM, 2015).

Figura 1. Localização da glândula tireoide (Adaptado de GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia médica).



A glândula tireoide é responsável pela produção de dois importantes hormônios que atuam na regulação do metabolismo do corpo, a triioditironina (T_3) e a tiroxina (T_4). Esses hormônios diferenciam-se apenas pela quantidade de iodo presente em suas estruturas moleculares, nas quais o T_3 apresenta três átomos de iodo, e o T_4 apresenta quatro átomos de iodo, conforme pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Estrutura molecular da (A) T_3 e (B) T_4 (Adaptado de MURRAY *et al.* Harper – bioquímica ilustrada).



A formação dos hormônios tireoidianos se inicia no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi das células epiteliais cubóides, os quais secretam a tireoglobulina, uma glicoproteína formada por cadeias de tirosinas. As tirosinas são os principais substratos que se combinam com o iodo, provenientes da corrente sanguínea, pela enzima peroxidase formando monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT), ficando armazenados no colóide da célula. Quando a glândula recebe estimulação para secretar os hormônios, a enzima peroxidase faz o acoplamento de duas moléculas de DIT, formando o T_4 , e o acoplamento de uma MIT com uma DIT para formar o T_3 . Após serem secretados pela célula, estes são transportados através da corrente sanguínea, geralmente pela proteína globulina ligadora da tiroxina (TBG), para os receptores nucleares, os quais são específicos apenas para o hormônio T_3 . Deste modo, as moléculas de T_4 são convertidas em T_3 (forma ativa) pela enzima 5'-iodinase, através do processo de desiodação (GUYTON; HALL, 2006; CONSTANZO, 2007). É importante mencionar, que o estímulo da produção de T_3 e T_4 é realizado pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH), produzido pela hipófise e liberado após a produção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) pelo hipotálamo (CONSTANZO, 2007).

Os hormônios da tireoide apresentam diversas funções fisiológicas e essencialmente modulam processos metabólicos de proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas. Ainda, associado às rotas metabólicas, os hormônios tireoidianos também afetam a síntese e a degradação de outros hormônios e atuam em fatores de crescimento, influenciando diretamente na sinalização hormonal (SMITH *et al.*, 2002). Entretanto, alguns fatores estimulantes ou inibidores, podem afetar a atividade da glândula tireoide, fazendo com que esta produza hormônios em excesso ou insuficientes. Estes fatores podem estar associados a níveis aumentados ou diminuídos de proteínas como a TBG, bem como da imunoglobulina estimulante da tireoide, ou a fatores como a deficiência de iodo, deficiência da enzima deiodinase ou ingestão excessiva de iodo, uma vez que este elemento pode estar presente na corrente sanguínea, geralmente através da alimentação (CONSTANZO, 2007).

Tendo em vista que a falta ou a deficiência de iodo no organismo causam algumas desordens na produção dos hormônios tireoidianos, pode-se citar duas disfunções que estão totalmente relacionadas com a deficiência ou a falta deste

elemento no organismo, o hipotireoidismo e o hipertireoidismo. O hipertireoidismo ocorre por existir elevada concentração de T₃ e T₄ livre na corrente circulatória, geralmente associadas à doença de Graves, uma doença autoimune resultante da produção de anticorpos que estimulam os receptores de TSH e produzem a secreção excessiva de hormônios da tireoide. Dentro dos sintomas relacionados ao hipertireoidismo, pode-se citar a perda de peso, fraqueza muscular, irritabilidade, ansiedade, taquicardia, tremores, distúrbios do sono, mania e depressão (SMITH *et al.*, 2002). O tratamento do hipertireoidismo é geralmente realizado por fármacos disponíveis no mercado ou pelo tratamento com iodo radioativo. Ainda, a retirada da glândula tireoide associada à suplementação é uma alternativa para este distúrbio.

O hipotireoidismo é resultante da deficiência de iodo no organismo, gerando a produção diminuída dos hormônios da tireoide. Essa doença pode estar relacionada a tireoide de Hashimoto (doença autoimune), cirurgias para hipertireoidismo, deficiência de iodo ou níveis de TSH aumentados (CONSTANZO, 2007). Os sintomas relacionados à produção diminuída de T₃ e T₄ no organismo são fadiga excessiva, sonolência, ganho de peso, intolerância ao frio, fraqueza, dor nas articulações e musculares, pele seca e queda de cabelo (DELANGE, 1994). Para o tratamento do hipotireoidismo, é indicado a levotiroxina sódica, a forma sintética do hormônio produzido naturalmente pela glândula, realizando a reposição hormonal através da suplementação com este fármaco. Esse fármaco é indicado por permitir uma ação farmacológica constante e um tempo de ação prolongado, fazendo-se possível a administração de uma dose única diária (ANVISA, 2015). Com base em estudos epidemiológicos, cabe destacar que o hipotireoidismo é mais recorrente que o hipertireoidismo. Ainda, pode-se citar que em ambos os casos, as mulheres geralmente são mais acometidas que os homens (BENSEÑOR *et al.*, 2011; VANDERPUMP, 2011).

Ainda se tratando da importância dos níveis de iodo no organismo relacionados a produção dos principais hormônios tireoidianos, bem como da suplementação de iodo com fármacos que fazem a suplementação de forma sintética, ressalta-se que o bromo pode interferir no metabolismo dos hormônios tireoidianos e de algumas atividades enzimáticas. Isso está relacionado, geralmente pela similaridade química do bromo com o iodo (PAVELKA, 2016).

Nesse sentido, faz-se necessária a determinação da concentração de bromo e iodo no organismo humano, uma vez que estes elementos podem indicar o bom funcionamento da glândula.

A atividade do bromo e iodo no organismo humano

O bromo e o iodo são elementos químicos da família dos halogênios que fazem parte da composição de importantes hormônios e secreções sintetizados pelo corpo humano. Ainda, podem ser incorporados no organismo através da alimentação, suplementação, meio ambiente, e também devido a relação com alguns hábitos, como por exemplo, o tabagismo.

O bromo não apresenta função fisiológica bem conhecida, uma vez que o seu mecanismo de ação no organismo é desconhecido (ROMARIS-HORTAS *et al.*, 2012). Entretanto, estudos demonstram que o bromo é fundamental para a formação do colágeno IV, proteína importante para o desenvolvimento dos tecidos (MCCALL *et al.*, 2014). O bromo também é um hipnótico sedativo e contribui para a ativação de algumas enzimas do organismo (MORI *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2013). Apesar disso, não existem relatos na literatura quanto aos níveis ideais em que este deve ser encontrado no corpo humano. Entretanto, quando trata-se da deficiência deste elemento no organismo, tem sido relatado que este pode estar associado ao retardo no crescimento e à insônia. Enquanto que ao seu excesso, estão associados dores de cabeça, broncoespasmos, distúrbios gastrointestinais, fadiga e tolerância a atividades físicas (KOHLMEIER, 2003). Ainda, é relatado que quando na forma de bromato (BrO_4^-), apresenta efeito carcinogênico para o ser humano. Ademais, é relatado que o bromo pode interferir no transporte de iodo para a glândula tireoide, competindo pela captação do iodo pela glândula (VOBECKY; BABICKY; LENER, 1996; DEANGELO *et al.*, 1998; DELKER *et al.*, 2006).

Com relação ao iodo, este é um elemento essencial ao organismo humano, sendo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996) uma ingestão de iodo de $150 \mu\text{g dia}^{-1}$ para adultos e adolescentes e $90 \mu\text{g dia}^{-1}$ para crianças de 1 a 12 anos. Além destes níveis de ingestão diária de iodo para crianças e adultos, ainda é indicado o consumo de $35\text{-}40 \mu\text{g dia}^{-1}$ para crianças menores de 1 ano de idade (DELANGÉ, 1994). Dentre os principais efeitos

relacionados a concentrações inadequadas de iodo no organismo humano estão o bócio e cretinismo endêmico, mortalidade infantil, infertilidade, aborto, retardo mental, problemas neuromusculares e nanismo. Ainda, os problemas mais comumente relacionados à falta ou ao excesso de iodo no organismo é o hipotireoidismo e o hipertireoidismo, respectivamente, na qual influencia diretamente na produção diminuída ou em excesso dos hormônios excretados pela glândula tireoide (DELANGE, 1994; WHO, 2007).

Assim, faz-se necessário o conhecimento da concentração de bromo e iodo no organismo humano, tendo em vista que para o bromo, os mecanismos de ação no organismo ainda não são bem elucidados. Para o iodo, apesar de existirem recomendações de níveis de ingestão diários (WHO, 2007), é importante o conhecimento da concentração deste elemento no organismo, visto que em níveis inadequados, pode gerar uma série de distúrbios. Ainda, quando relacionados estes dois elementos, pode-se ressaltar o que vem sendo descrito por alguns autores quanto à similaridade química destes, interferindo em alguns processos do organismo humano (VOBECKY; BABICKY; LENER, 1996; PAVELKA, 2016).

Uso de amostras biológicas na avaliação do estado de saúde humana

A análise de amostras biológicas vem sendo há alguns anos, um dos principais indicadores sobre o estado de saúde humana, visto que, estas apresentam um papel importante para o biomonitoramento de elementos e moléculas essenciais e não essenciais do organismo humano. Desta forma, quando a análise é realizada com êxito, os resultados podem ser utilizados no diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças, além de servirem como uma forma de avaliar o estado de saúde de uma população exposta a toxinas e a ambientes poluídos (PARSONS *et al.*, 2006; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005).

O sangue é a principal amostra biológica utilizada para a avaliação do estado de saúde do organismo humano, uma vez que é o responsável pelo transporte de substâncias importantes para o bom funcionamento do organismo, tais como glicose, proteínas, hormônios, vitaminas, sais minerais, dentre outros. Entretanto, o sangue apresenta complexidade quando refere-se à sua coleta invasiva, tendo em vista os riscos que pode trazer ao indivíduo, a instabilidade dos constituintes da amostra quando refere-se à armazenagem, bem como

durante a manipulação da amostra. Diante disso, outras matrizes biológicas têm sido avaliadas com o objetivo de substituir a análise do sangue e a utilização de coletas invasivas para a avaliação do estado de saúde do organismo humano (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005).

Dentre as amostras obtidas por coletas não invasivas pode-se citar o cabelo, a unha e a saliva. Estas amostras apresentam como principal vantagem a facilidade de estocagem, transporte e manuseio. Quando refere-se ao cabelo e as unhas, estas têm sido amplamente estudadas no ramo da toxicologia, uma vez que os analitos ficam disponíveis na matriz por um longo período de tempo, quando comparado ao sangue ou à saliva (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999; SEIDEL *et al.*, 2001; BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005; SANINOV; ANISIMOV; DROBYSHEV, 2016). Entretanto, quando relacionado a análise da saliva, muitos estudos demonstram a correlação das concentrações de elementos, atividade enzimática e até mesmo da diminuição do fluxo salivar com determinadas patologias, distúrbios e hábitos (TOMITA *et al.*, 2010; CHENG; REES; WRIGHT, 2014; CHOJNOWSKAA *et al.*, 2018).

A saliva tem recebido destaque no ramo da pesquisa, principalmente pela coleta da amostra ser indolor, de baixo custo e relativamente fácil, tendo em vista que o próprio indivíduo pode realizar a coleta, sem sofrer constrangimento. Esta tem sido utilizada como uma amostra biológica em potencial para o diagnóstico de uma série de enfermidades por ser considerada por muitos pesquisadores como um filtrado diluído do sangue (URBANOWICZ *et al.*, 2017). Entretanto, é válido mencionar, que apesar de já existirem algumas metodologias para coleta e armazenamento deste tipo de amostra, ainda existe uma série de incertezas quanto à representatividade destes resultados quando a concentração é correlacionada com o excesso ou à falta dos elementos no organismo, tendo em vista que as concentrações elementares podem estar associadas a fatores exógenos, alimentação e alguns hábitos.

É válido destacar que um maior enfoque vem sendo dado para a determinação de metais essenciais e não essenciais em saliva, sendo restrito o número de trabalhos que visam a determinação de não metais. Com isto, faz-se necessária a determinação e o conhecimento das concentrações de halogênios no organismo humano, para que assim, possa ser relacionado quanto a sua

ausência ou a toxicidade no organismo humano (BARBOSA JUNIOR *et al.*, 2005; WANG; DU; ZHENG, 2008; OLMEDO *et al.*, 2010).

Uma abordagem acerca da saliva: Propriedades, aspectos gerais e técnicas utilizadas para a determinação de bromo e iodo

A saliva é um dos principais fluidos produzidos pelo corpo humano e é constituída por uma variedade de eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonatos e fosfatos. Na saliva, também são encontradas substâncias orgânicas estruturais (estaterrina, aglutinina, lactoferrina, gustina e sialina), enzimáticas (amilase, fosfatase ácida, estearase, lisozima, peroxidase, adidrase carbônica e calicreína) e imunológicas (imunoglobulina salivar e secretora), além de produtos nitrogenados (uréia e amônia). Entretanto, 94-99% da saliva é composta de água, o que a torna um fluido diluído e que pode apresentar baixas concentrações dos componentes citados (KAPLAN; BAUM, 1993; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2008; CARPENTER, 2013; CHOJNOWSKAA *et al.*, 2018).

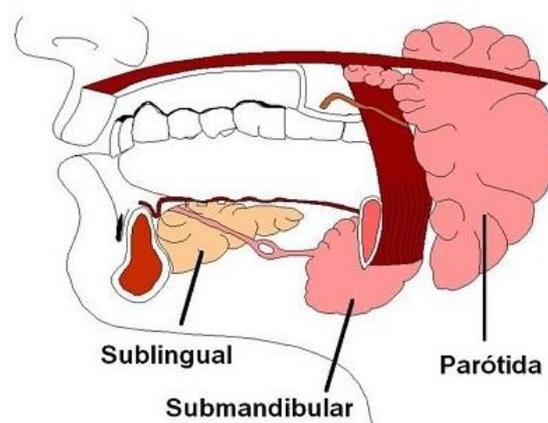
Assim, é válido ressaltar a importância dos elementos e compostos orgânicos presentes na saliva quanto a sua função, visto que desempenham diversas atividades essenciais. Os bicarbonatos e fosfatos, por exemplo, atuam na regulamentação do pH e ativam a capacidade de tamponamento exercida pela saliva. As mucinas, imunoglobulinas e enzimas contribuem para a limpeza, metabolismo da placa dentária e ainda, proporcionam a ação antibacteriana exercida pela saliva. O cálcio, fosfato e algumas proteínas, atuam na solubilização, bem como, na desmineralização e remineralização da saliva. Assim, a saliva torna-se um fluido de grande importância para o organismo humano, tendo em vista os minerais, compostos orgânicos e micro-organismos que fazem parte da sua composição e que contribuem para a remoção de bactérias, o tamponamento do pH da saliva, e em geral para a contribuição da saúde bucal (KAPLAN; BAUM, 1993; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; CARPENTER, 2013).

Como mencionado anteriormente, apesar da saliva ser constituída aproximadamente por 99% de água, este fluido é descrito como não newtoniano, uma vez que a viscosidade diminui com o aumento do cisalhamento dos

alimentos, durante a mastigação. Na prática, isto permite que a saliva possa ser facilmente espalhada sobre as superfícies orais. Esta é uma função importante para a saliva, tendo em vista que nas superfícies da mucosa oral ocorrem as primeiras interações com os micro-organismos ainda na cavidade bucal (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; CARPENTER, 2013). Outra função importante apresentada pela saliva é a formação do *bolus* juntamente com as propriedades umectantes mencionadas acima. Estas propriedades permitem a incorporação da saliva nos alimentos para aglomerar as partículas previamente trituradas. Após a mastigação, um bolo alimentar é formado pela ação da língua e, com a ação da saliva, é lubrificado para passar através da garganta, onde receptores sensíveis ao toque determinam se o bolo alimentar está pronto a ser engolido (ALMEIDA *et al.*, 2008).

A saliva é secretada principalmente por três pares de glândulas anexas exócrinas, a glândula parótida, glândula submandibular e glândula sublingual. Na Figura 3, são apresentadas a localização destas glândulas na cavidade bucal.

Figura 3. Vista lateral da cavidade bucal e localização das glândulas salivares maiores (Adaptado de <http://www.anatomiadocorpo.com>).



Além das glândulas maiores, existem glândulas salivares menores, que ocupam a submucosa na maior parte da cavidade oral. As glândulas salivares são órgãos efetores, que quando recebem estímulos neurais, produzem e liberam uma quantidade de fluidos e eletrólitos para o organismo. O volume de saliva translocado por dia através das glândulas salivares aproxima-se de 20%

do total do volume plasmático (PAPACOSTA; NASSIS, 2011). Entretanto, este estímulo só é influenciado por fome, estímulos olfatórios, dor e alterações hormonais relacionados à gravidez, menopausa, ou a alguns medicamentos de estímulo, podendo assim, alterar o fluxo salivar normal (APS; MARTENS, 2005).

A saliva contribui com a digestão inicial do amido, ainda na cavidade bucal, auxiliando a formação do bolo alimentar. Isto ocorre pela presença e ação da enzima digestiva α -amilase, também chamada de ptialina, na qual tem por função fazer a quebra do amido em glicose, maltose e oligossacarídeos. Esta enzima ainda serve como indicador do funcionamento das glândulas salivares, contribuindo com 40-50% da proteína salivar total produzida pelas glândulas. A maior parte desta enzima (80%) é sintetizada nas parótidas e o restante nas glândulas submandibulares. A ação da α -amilase é inativada nas porções ácidas do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, limitada à cavidade bucal (ALMEIDA *et al.*, 2008).

A atividade da α -amilase salivar tem sido demonstrada como um potencial biomarcador para diversas disfunções do organismo como obesidade, diabetes, síndromes metabólicas e periodontites. Ainda, tem sido relatado que a atividade física aumenta a atividade da enzima e que o estresse diminuiu a atividade da α -amilase na saliva (NAKAJIMA, 2016; HARIRIAN *et al.*, 2018). Em um estudo realizado com ratos tireoidectomizados, foi possível observar que a estimulação da produção de saliva pode ser diminuída, bem como, a concentração de proteínas totais na saliva, sugerindo uma dependência dos hormônios tireoidianos para a produção de saliva (LIMA *et al.*, 2008). Contudo, cabe salientar, que existem poucos trabalhos na literatura que relacionem a avaliação da atividade da α -amilase com as disfunções na glândula tireoide.

Assim, a saliva torna-se uma amostra biológica em potencial para avaliar os níveis de elementos e moléculas presentes no organismo humano, uma vez que esta apresenta frações de compostos presentes no sangue, bem como demonstra as condições fisiológicas do organismo. As glândulas salivares apresentam um alto fluxo sanguíneo e assim, compostos metabólitos são secretados na saliva por diferentes mecanismos, incluindo a difusão passiva, o transporte ativo e a ultrafiltração, além de ser a principal responsável pelo início do processo digestivo (LLENA-PUY, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2008). Na literatura, existem alguns relatos que correlacionam a concentração de elementos traço na

saliva com diferentes hábitos, doenças, idade e consumo de drogas (JIMÉNEZ-REYES; SÁNCHEZ-AGUIRRE, 1996; DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002; PEDERSEN *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005; LLENA-PUY, 2006; SUGIMOTO *et al.*, 2010; SAVINOV; ANISIMOV; DROBYSHEV, 2016; URBANOWICZ *et al.*, 2017). Entretanto, pesquisas que visam determinar as concentrações de elementos em nível traço em amostras de saliva ainda recebem pouca atenção pelo fato das baixas concentrações dos analitos neste tipo de amostras. Além disso, fatores exógenos como alimentação, ingestão de medicamentos e alguns hábitos podem influenciar nas concentrações destes elementos na saliva. Cabe salientar que um maior enfoque vem sendo dado para a determinação de metais essenciais e não essenciais (POLES *et al.*, 2016; WANG; DU; ZHENG, 2008), sendo restrito o número de trabalhos que visam à determinação de não metais, quando relacionado ao bromo e iodo, neste tipo de amostra.

A determinação de bromo e iodo na saliva tem sido comumente realizada por técnicas eletroforéticas, cromatográficas e potenciométricas. Previamente as análises, as amostras são submetidas a uma etapa de centrifugação, visando separar a fase aquosa da fase mucosa da saliva e analisa-se o sobrenadante com o intuito de minimizar as interferências durante a etapa de determinação (TENOVUO; MIKINEN, 1976; SÁDECKÁ; POLONSKY, 2003; XU *et al.*, 2008; MORI *et al.*, 2012). Entretanto, embora esta seja uma forma rápida de pré-tratamento e bastante utilizada para a determinação de elementos traço em saliva, na fase decantada pode conter analitos ligados a matriz orgânica da amostra que não foram liberados para o sobrenadante analisado, comprometendo a exatidão dos resultados (ZAMPERINI *et al.*, 2013; SAVINOV; ANISIMOV; DROBYSHEV, 2016). É válido destacar que não foram encontrados na literatura, trabalhos que avaliam criteriosamente a representatividade das concentrações de bromo e iodo na saliva após a etapa de centrifugação com a concentração dos analitos na amostra total.

Preparo de amostras

Com exceção das técnicas que permitem a análise direta, é importante mencionar que quando almeja-se a determinação de metais e não metais, a maior parte das técnicas requerem que a amostra seja introduzida no

equipamento na forma de uma solução adequada. Desta forma, geralmente, faz-se necessária a realização de uma etapa de preparo de amostra, sendo esta, a etapa da sequência analítica mais suscetível a erros e a problemas que podem comprometer a exatidão dos resultados (FLORES, 2014; KRUG; ROCHA, 2016). Ainda, cabe ressaltar que não existe um método de preparo de amostra universal, fazendo-se necessário avaliar o tipo de matriz, natureza da amostra, o analito a ser determinado bem como, a técnica de determinação utilizada.

Para a determinação de não metais, principalmente quando trata-se dos halogênios, a etapa de preparo de amostras é considerada um desafio, uma vez que estes elementos apresentam instabilidade em meio ácido, e podem formar compostos voláteis e serem assim perdidos (FLORES, 2014; KRUG; ROCHA, 2016). Ainda, a utilização de ácidos concentrados ou a combinação de ácidos com reagentes oxidantes comumente utilizados nessa etapa, podem causar problemas com as técnicas de determinação como a cromatografia de íons (IC), a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), técnicas comumente utilizadas para a determinação de halogênios. Outro fator que deve ser levado em consideração pelo uso de ácidos concentrados é o aumento significativo dos brancos analíticos, bem como o aumento dos limites de detecção (LDs), uma vez que para as soluções serem analisadas faz-se necessária a realização de elevados fatores de diluição, com o intuito de minimizar as possíveis interferências (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2016).

Neste sentido, uma alternativa para o preparo de amostra visando posterior determinação de halogênios, é a utilização de soluções alcalinas. Nóbrega *et al.* (2006), propõe o uso de reagentes fortemente alcalinos como uma alternativa para preparo de amostras envolvendo um grupo apreciável de analitos em diferentes matrizes. Dentre os meios comumente utilizados, pode-se citar as soluções de hidróxido de tetrametilamônio (HTMA), aminas terciárias solúveis em água e bases fortes. Tendo em vista que as soluções alcalinas são meios comumente descritos para extrações ou dissoluções alcalinas, é necessária uma especial atenção na etapa de determinação, uma vez que pode não haver a disponibilização quantitativa dos analitos.

Ainda, deve-se levar em consideração, que a matriz da amostra pode ser um interferente, uma vez que estes são métodos de preparo de amostras não

destrutivos, na qual maior parte da matriz da amostra permanece em solução. Assim, uma alternativa a estes possíveis inconvenientes, é a combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Na MIC, as matrizes orgânicas são oxidadas pela ação direta do oxigênio, sendo assim, convertidas quase que na totalidade aos seus produtos de combustão (CO_2 e H_2O), o que minimiza as interferências durante a determinação dos analitos. Além disso, os analitos são absorvidos em uma solução adequada às características do elemento, bem como a técnica de determinação utilizada para a quantificação dos elementos (BARIN; FLORES; KNAPP, 2006; FLORES *et al.*, 2007).

Assim, nos itens subsequentes serão abordados os métodos de preparo de amostras que utilizam soluções alcalinas, bem como as técnicas de combustão em sistema fechado, em especial a MIC, tendo em vista que este método vem sendo comumente usado para o preparo de amostras para posterior determinação de halogênios.

Preparo de amostras com soluções alcalinas

Como mencionado anteriormente, o uso de soluções alcalinas para o preparo de amostras para subsequente determinação de halogênios, tem sido uma alternativa simples e eficiente para métodos baseados na extração ou dissolução da amostra. Ainda, pode-se ressaltar que o uso de meios alcalinos pode melhorar o desempenho de técnicas que sofrem por efeito de memória devido à acidez residual, além de fornecer métodos relativamente simples e mais seguros, e permitir o uso da radiação micro-ondas sem ocasionar a mudança no estado de oxidação dos analitos (NÓBREGA *et al.*, 2006).

As soluções alcalinas como o carbonato de amônio e hidróxido de amônio, bem como o HTMA tem sido os meios mais utilizados para o preparo de amostras visando a determinação de halogênios (NÓBREGA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2015). O uso destes reagentes no preparo de amostras vem demonstrando uma série de vantagens, na qual merece destaque, a possibilidade de obter recuperações quantitativas para aqueles elementos que apresentam instabilidade em meio ácido. Cabe salientar, que quando associado a sistemas fechados de preparo de amostras e ao uso do aquecimento por radiação micro-ondas, o método apresenta menores valores de brancos analíticos, minimiza a

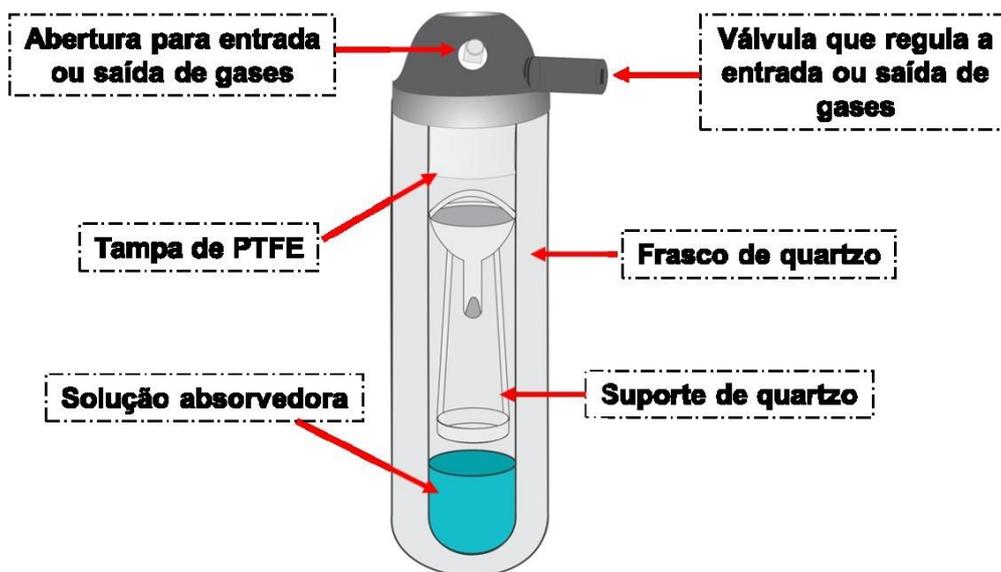
possibilidade de perda dos analitos por volatilização e apresenta rapidez e eficiência na extração ou dissolução dos analitos (NOBREGA *et al.*, 2006; FLORES, 2014). Apesar do uso de sistemas fechados utilizando soluções alcalinas associado ao aquecimento por radiação micro-ondas já ter sido utilizado para o preparo de amostras de matrizes biológicas visando a determinação de halogênios (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999), ainda não existem relatos acerca da sua utilização para o preparo de amostras de saliva.

Combustão iniciada por micro-ondas

A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi proposta com o objetivo de associar vantagens da decomposição por via úmida com o aquecimento por radiação micro-ondas, com as vantagens das técnicas de combustão em sistemas fechados (FLORES *et al.*, 2004). Dentre as vantagens, pode-se citar os baixos valores de branco analítico, redução no tempo de preparo, uso de frascos que suportam altas pressões, possibilidade do uso de quantidades elevadas de amostra, bem como o uso de uma pequena quantidade de reagentes (MESKO, 2008).

Na MIC, a queima da matéria orgânica é iniciada pela incidência da radiação micro-ondas em um papel filtro previamente umedecido com uma solução ignitora (NH_4NO_3 6 mol L⁻¹) em frascos fechados e pressurizados com oxigênio. As amostras são geralmente decompostas na MIC, na forma de comprimidos ou envoltos por um filme de polietileno, dispostos na base de um suporte de quartzo, conforme apresentado na Figura 4. Após a combustão, os analitos são liberados e posteriormente, absorvidos em uma solução apropriada. Ainda, uma etapa de refluxo pode ser aplicada por meio da continuação do programa de radiação, podendo permitir recuperações quantitativas dos analitos (FLORES *et al.*, 2004).

Figura 4. Frascos de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas (Adaptado de PEREIRA, 2014).



Em relação a forma como é introduzida a amostra no sistema, cabe destacar que a utilização de comprimidos tem sido utilizada para amostras sólidas, pois traz como benefício a facilidade no manuseio e a minimização de valores de brancos. Entretanto, quando utilizado amostras com alto teor de umidade, como a saliva, faz-se necessário que estas sejam envoltas por cápsulas ou filmes de polietileno, dispensando o uso de prensas de alta pressão e diminuindo os riscos de perdas por adesão. Ainda, para a decomposição de amostras com alto teor de umidade, auxiliares de combustão, como a celulose microcristalina, tem sido utilizados para promover a combustão completa da amostra (COSTA *et al.*, 2015).

Outra vantagem apresentada pela MIC é a possibilidade de escolher a solução absorvedora mais adequada para a absorção e estabilidade dos analitos e para com a técnica de determinação utilizada. Assim, ao encontro do que foi mencionado anteriormente, para a quantificação de halogênios, a possibilidade da escolha da solução absorvedora possibilita o uso de soluções alcalinas diluídas, e até mesmo de água (FLORES *et al.*, 2007; 2014; 2016; RONDAN *et al.*, 2018). Para bromo e iodo, as soluções comumente utilizadas na MIC têm sido NH_4OH e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, uma vez que diminuem a possibilidade de formação de espécies voláteis por estabilizar os elementos. Além disso, propiciam a obtenção de soluções compatíveis com a maioria das técnicas de determinação (COSTA *et al.*, 2015; MESKO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; TORALLES *et al.*, 2017; RONDAN *et al.*, 2018).

De acordo com o que vem sendo relatado na literatura para a determinação de halogênios, a MIC vem sendo aplicada em amostras com diferentes tipos de matrizes, como carvão (FLORES *et al.*, 2007), coque de petróleo (PEREIRA *et al.*, 2008), amostras farmacêuticas (BARIN *et al.*, 2016; MESKO *et al.*, 2017), alimentícias (COSTA *et al.*, 2015; MESKO *et al.*, 2016; COELHO JR *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; RONDAN *et al.*, 2018), dentre outras (FLORES, 2014; KRUG; ROCHA, 2016). Entretanto, apesar da MIC ter aplicação para diversos tipos de matrizes, não existem relatos na literatura quanto a utilização deste método para o preparo de amostras de saliva. Cabe salientar, que em um estudo recente Costa *et al.* (2015), propôs um método de preparo de amostras de mel, utilizando a MIC para a digestão das amostras visando a posterior determinação de bromo e iodo. Tendo em vista que o mel apresenta um elevado teor de umidade (18%), a celulose microcristalina foi utilizada como auxiliar de combustão. Recuperações adequadas foram obtidas para bromo e iodo utilizando NH_4OH (50 mmol L^{-1}) e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (50 mmol L^{-1}). Assim, a MIC torna-se um método promissor para o preparo de amostras biológicas de saliva, visando a posterior determinação de bromo e iodo.

Técnicas de determinação de halogênios

Algumas técnicas de determinação podem ser utilizadas para a quantificação de bromo e iodo como, por exemplo, a ICP-MS, a IC, a ISE, a espectrometria de fluorescência de dispersão de raios-X (EDXRF), a análise instrumental por ativação de nêutrons (NAA) bem como os métodos titrimétricos. Entretanto, a escolha da técnica a ser utilizada, depende do tipo de amostra, do analito e da concentração do analito a ser determinado (KNAPP *et al.*, 1998).

Dentre as técnicas de determinação mencionadas, a ICP-MS vem sendo amplamente utilizada para a determinação de bromo e iodo em amostras biológicas, e destaca-se por apresentar a capacidade de determinação multielementar com elevada seletividade, sensibilidade e seus baixos limites de detecção (KNAPP *et al.*, 1998). Apesar desta técnica apresentar diversas vantagens, a ocorrência do efeito de memória pode dificultar a determinação de bromo e iodo por ICP-MS. Neste contexto, a utilização de soluções alcalinas durante o preparo de amostras além de possibilitar uma maior estabilidade para

bromo e iodo, também minimiza possíveis efeitos de memória. Ainda, esta mesma solução utilizada para o preparo das amostras, pode ser utilizada para a lavagem do sistema de introdução da amostra, contribuindo para a redução desse efeito (NOBREGA *et al.*, 2006; MESKO *et al.*, 2010).

Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

A técnica de ICP-MS tem como principal vantagem a possibilidade de realizar uma análise multielementar com elevada sensibilidade. A técnica se baseia na geração de íons positivamente carregados (M^+) em um plasma de argônio. Geralmente, as amostras são introduzidas através de um nebulizador, na forma de uma solução, ao longo da passagem da amostra pelas diferentes zonas de aquecimento do plasma, esta é seca, vaporizada, e os seus constituintes são atomizados, excitados e ionizados. Nesse processo, geralmente, são geradas espécies carregadas positivamente, as quais são direcionadas por um sistema de lentes para o analisador de massa, onde são separadas de acordo com a sua razão massa-carga (m/z), no analisador de massas, e finalmente conduzidos até o detector, na qual a corrente elétrica medida é convertida em contagens por segundo (MONTASER, 1998).

Para a determinação de bromo e iodo, apesar da técnica apresentar uma série de vantagens, uma atenção especial deve ser dada devido a possibilidade de algumas interferências espectrais e não-espectrais (BU; WANG; HALL, 2003). Para a determinação de bromo por ICP-MS, por exemplo, alguns cuidados devem ser tomados devido à possibilidade da formação de espécies poliatômicas no plasma que podem interferir na determinação do analito. Dentre essas, pode-se citar a interferência poliatômica $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^1\text{H}$ referente ao isótopo ^{79}Br , bem como a interferência $^{40}\text{Ar}_2\text{H}$, referente ao isótopo ^{81}Br . Cabe salientar que estas interferências podem ser oriundas da interação com os gases utilizados durante a etapa de determinação.

Para a determinação do iodo, não existem problemas relacionados com interferências poliatômicas para o isótopo ^{127}I , entretanto, especial atenção deve ser dada ao efeito de memória, proveniente da formação de espécies voláteis desse elemento na câmara de nebulização e no nebulizador (MONTASER, 1998). Ainda, algumas interferências podem estar atribuídas à presença de

carbono e sais em solução, tendo em vista que pode haver o acúmulo de sais na interface do equipamento, interferindo na ionização e no transporte de elementos para o espectrômetro de massas (MONTASER, 1998). Assim, tendo em vista que os efeitos da matriz e os reagentes utilizados durante esta etapa podem ocasionar em resultados inexatos, uma especial atenção deve ser dada a etapa de preparo de amostra.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os reagentes, equipamentos e amostras utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como, os procedimentos realizados para a coleta e o preparo de amostras para a posterior determinação de bromo e iodo.

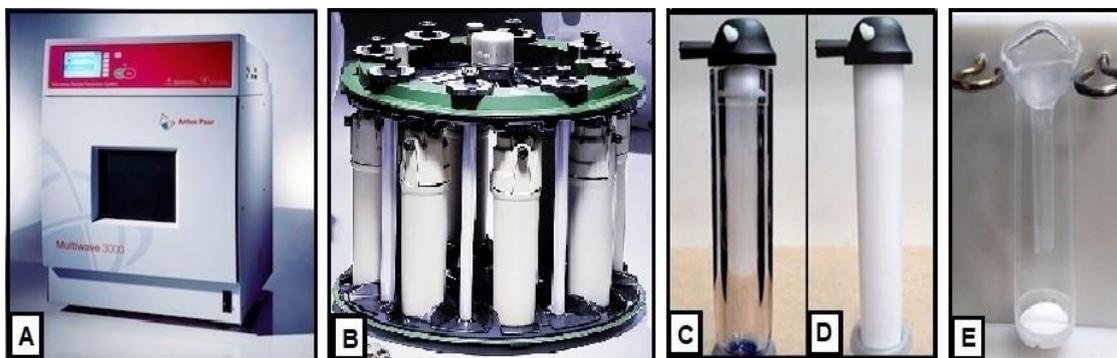
Os métodos de preparo de amostras avaliados foram a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) e a dissolução assistida por radiação micro-ondas para o preparo das amostras, para a subsequente determinação de bromo e iodo por ICP-MS. Além disso, também foi avaliada a centrifugação da saliva previamente a análise. No procedimento de preparo de amostra por MIC, foram avaliados distintos volumes de saliva, massas de auxiliar de combustão e soluções absorvedoras em diferentes concentrações. Para a dissolução assistida por radiação micro-ondas, também foram avaliadas distintas soluções dissolutoras em diferentes concentrações e tempos variados de irradiação com micro-ondas.

Cabe ressaltar que a determinação de bromo e iodo por ICP-MS foi realizada no Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais da Universidade Federal de Santa Maria, com o apoio do grupo coordenado pelo Prof. Dr. Érico M. M. Flores, visto que este equipamento não é disponibilizado pela UFPel.

Instrumentação

Para o preparo das amostras foi utilizado um forno com aquecimento por radiação micro-ondas modelo Multiwave 3000[®] (Anton Paar, Áustria), com capacidade de preparar até 8 amostras por procedimento. O equipamento possui sensores de pressão e temperatura na sua cavidade para o acompanhamento destes parâmetros durante o programa de aquecimento. Quando realizada a dissolução assistida por radiação micro-ondas foram utilizados frascos de politetrafluoretileno modificado quimicamente (PTFE-TFM), com volume interno de 100 mL e condições máximas de potência, temperatura e pressão de 1400 W, 260 °C e 60 bar, respectivamente; enquanto que para a MIC, foram utilizados frascos de quartzo, com volume interno de 80 mL e condições máximas de 1400 W de potência, 280 °C de temperatura e 80 bar de pressão. Para o procedimento de MIC, ainda foram utilizados suportes de quartzo para a introdução da amostra no sistema de combustão. Na Figura 5 são apresentados o A) forno de micro-ondas, B) o rotor, bem como os frascos que podem ser utilizados por este sistema, C) de quartzo e D) de PTFE-TFM e o E) suporte de quartzo utilizado no procedimento de MIC.

Figura 5. (A) Forno de micro-ondas (Multiwave 3000[®]), (B) rotor equipado com oito frascos para o preparo das amostras, (C) frasco de quartzo utilizado na MIC, (D) frasco de PTFE-TFM utilizado no método de dissolução e (E) suporte de quartzo utilizado no procedimento de MIC.



Todas as amostras foram pesadas em uma balança analítica modelo AY220 (Marte, Brasil) com resolução máxima de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. O pH das soluções foi medido através de um medidor de pH modelo mPA-

210 (Tecnopon, Brasil). Quando realizada a centrifugação da saliva, foi utilizada uma centrífuga modelo 80-2B (Daiki, Brasil). Um banho de ultrassom modelo USC-2800 A (UNIQUE, Brasil), com frequência de 40 kHz, foi empregado para a descontaminação dos papéis filtros e invólucros para as amostras, utilizados na MIC, bem como da celulose microcristalina, utilizada como auxiliar de combustão neste mesmo procedimento. Em todos os procedimentos foi empregada água ultrapura (resistividade até 18 M Ω cm) obtida através de um sistema de purificação modelo MegaUp (MegaPurity, Coréia do Sul). Uma capela de fluxo laminar, classe 100, modelo CFLH – 09 (Veco, Brasil) foi utilizada para a secagem e manuseio de vidrarias e materiais diversos utilizados durante os procedimentos.

A determinação de bromo ($m/z = 79$) e iodo ($m/z = 127$), foi realizada por ICP-MS utilizando um espectrômetro modelo NexION 300X (Perkin-Elmer, Canadá) equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, Estados Unidos), uma câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion, Inc., Estados Unidos) e uma tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc.), com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.). Os parâmetros instrumentais utilizados para as determinações, como voltagem da lente iônica e alinhamento da tocha foram otimizados conforme recomendado pelo fabricante.

A determinação de carbono nas soluções absorvedoras, dissolutoras, bem como nos centrifugados, foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) modelo Spectro Ciros CCD (Spectro Analytical Instruments, Alemanha). O equipamento foi utilizado na configuração axial e com sistema ótico selado, sendo equipado com câmara de nebulização de duplo passo e nebulizador do tipo cross-flow.

Reagentes

Como solução absorvedora ou dissolutora foram avaliadas diferentes concentrações de hidróxido de amônio preparadas a partir de uma solução de NH₄OH (27% de NH₃ em H₂O, Synth, Brasil). Adicionalmente, no método de dissolução assistido por radiação micro-ondas, foi avaliado o uso do hidróxido de tetrametilamônio (HTMA) na concentração de 110 mmol L⁻¹ preparada a partir de uma solução de HTMA (25% em água, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Uma

solução de nitrato de amônio 6 mol L^{-1} , foi utilizada para dar início ao processo de combustão e esta solução foi preparada a partir do sal de NH_4NO_3 p.a. (Merck, Alemanha). Todos os materiais utilizados neste trabalho foram descontaminados com ácido nítrico 10% (Synth) e água ultrapura.

Como auxiliar de combustão na MIC, foi utilizada celulose microcristalina de grau farmacêutico com o intuito de auxiliar na decomposição da amostra. A água de elevada pureza usada neste estudo foi destilada, deionizada em coluna de troca iônica e purificada em um sistema de purificação conforme descrito no item 3.1. Oxigênio (White Martins, Brasil) com pureza de 99,999% foi utilizado para a pressurização dos frascos de decomposição por MIC. Argônio (White Martins, Brasil) com pureza de 99,998% foi utilizado para as determinações de bromo e iodo por ICP-MS e carbono por ICP OES.

A curva de calibração para as determinações de bromo e iodo por ICP-MS foi preparada a partir da dissolução dos sais de KI (Merck) e KBr (Merck). Por outro lado, a curva de calibração para a determinação de carbono por ICP OES foi preparada a partir da dissolução de ácido cítrico (Merck) em HNO_3 a $5\% \text{ v v}^{-1}$ (Merck). Além disso, uma solução de ítrio (1 mg L^{-1} , SPEX Certprep, EUA) foi usada como padrão interno para determinação de carbono.

Materiais Diversos

Os filmes de polietileno, bem como, os papéis filtro utilizados no método de MIC foram descontaminados pela imersão em HNO_3 10% em banho ultrassônico por 10 minutos, lavados com álcool bidestilado, seguido da lavagem com água ultrapura e, posteriormente, secos em capela de fluxo laminar. A celulose microcristalina utilizada como auxiliar de combustão, foi previamente descontaminada pela imersão em HNO_3 10%, sonicada durante 20 minutos e filtrada. Posteriormente, a celulose microcristalina foi imergida em álcool bidestilado, sonicada por mais 20 minutos, filtrada à vácuo e seca a 60°C em estufa até a secagem completa.

Os frascos de PTFE-TFM e de quartzo, bem como os suportes de quartzo, utilizados na MIC, foram descontaminados com HNO_3 concentrado sob aquecimento em forno micro-ondas conforme o seguinte programa de aquecimento: *i)* 1400 W por 10 min e *ii)* 0 W por 20 min (etapa de resfriamento).

Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado utilizando água ultrapura, previamente à combustão ou dissolução da amostra, para eliminar os resíduos de ácido.

Amostra

Para os estudos iniciais e avaliação do método mais adequado para o preparo da amostra, foram utilizadas salivas doadas por 4 voluntários. Assim, cerca de 20 mL de saliva foram coletadas em frascos de polipropileno pelos próprios voluntários. Os voluntários estavam em jejum por no mínimo 8h e realizaram 3 enxágues da cavidade bucal com água ultrapura. Posteriormente, as amostras de saliva dos voluntários foram misturadas e homogeneizadas com o intuito de obter um maior volume de amostra (totalizando 74 mL) para a avaliação dos métodos de preparo de amostra. As amostras foram mantidas em um congelador à -4 °C até que fossem realizadas todas as avaliações.

Após avaliados os parâmetros dos métodos de preparo de amostras desenvolvidos, esses foram aplicados para amostras de 2 indivíduos que apresentavam disfunções na glândula tireoide, bem como de 3 indivíduos que declararam não apresentar disfunção na glândula tireoide, todos do sexo feminino. As amostras foram identificadas (do número 1 ao 5) e armazenadas em congelador na mesma temperatura citada anteriormente. As amostras avaliadas de indivíduos que apresentam disfunção na tireoide são oriundas de voluntários com disfunção no estado hipotireoideo e do sexo feminino, tendo em vista a maior incidência desta disfunção em mulheres. Os indivíduos que apresentam a disfunção na tireoide realizam o tratamento com levotiroxina sódica em diferentes concentrações. Ainda, cabe destacar que a idade dos indivíduos avaliados em ambos os grupos, variou de 21 a 30 anos de idade. Estas informações foram obtidas através do preenchimento de um formulário, o qual contou com o consentimento do doador para a coleta da amostra, bem como com a disponibilização de dados como a idade, sexo, se apresenta disfunção na glândula tireoide, e quais os medicamentos utilizados.

Cabe salientar que todos os parâmetros realizados, tanto para a coleta, quanto para os procedimentos realizados com as salivas dos diferentes indivíduos, foram previamente aceitos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da

Universidade Federal de Pelotas, sob o número de parecer 2.292.445, em ANEXO.

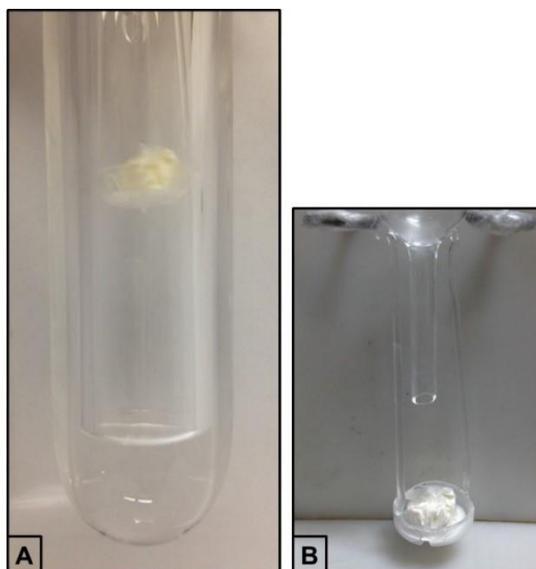
Métodos de preparo de amostras avaliados para saliva

Como métodos de preparo de amostras de saliva, a MIC, a dissolução assistida por radiação micro-ondas e a centrifugação foram avaliadas visando à posterior determinação de bromo e iodo por ICP-MS. A seguir, seguem os itens relacionados aos procedimentos utilizados.

Combustão iniciada por micro-ondas

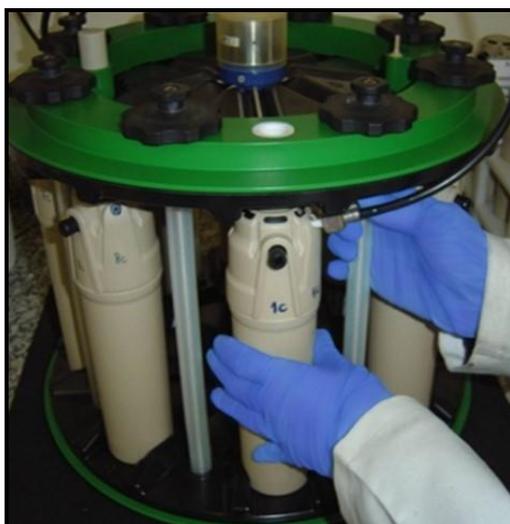
Em um primeiro momento, a introdução das amostras de saliva no sistema de combustão foi avaliada. Desta forma, as amostras de saliva foram misturadas com celulose microcristalina e envolvidas em filmes de polietileno na forma de invólucros. Para isto, a proporção entre o volume de amostra de saliva (0,05 a 0,5 mL) e a massa de celulose microcristalina (100 – 500 mg), foi avaliada. Após a obtenção dos invólucros contendo a amostra e celulose microcristalina, estes foram dispostos na base do suporte de quartzo, na qual continha um disco de papel filtro previamente umedecido com 50 μL de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} . Em um segundo momento, foram adicionados 6 mL da solução absorvedora no interior do frasco de quartzo e o suporte contendo a amostra foi inserido no frasco, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6. (A) Frasco de quartzo contendo a solução absorvedora e suporte de quartzo e (B) suporte de quartzo contendo a amostra na forma de invólucro e o papel filtro umedecido com 50 μL de NH_4NO_3 .



Posteriormente, os frascos foram fechados, fixados ao rotor, pressurizados com 20 bar de O_2 , conforme apresentado na Figura 7. Para a pressurização dos frascos, uma ponteira de PTFE foi posicionada no orifício da tampa dos frascos de combustão utilizado para a entrada e liberação dos gases.

Figura 7. Frascos de quartzo fechados, fixados no rotor e sendo pressurizados com oxigênio.



Por fim, colocou-se a capa de proteção no rotor e o sistema foi submetido ao programa de irradiação, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Programa de irradiação utilizado no processo de combustão iniciada por micro-ondas.

Etapa	Potência (W)	Tempo de permanência
1	1400	50 s
2	1400	5 min
3*	0	20 min

Taxa de aumento de pressão: 0,8 bar s⁻¹, temperatura máxima: 280 °C e pressão máxima: 80 bar; *Etapa de resfriamento.

Após a combustão das amostras, as soluções resultantes foram avolumadas a 20 mL com água ultrapura e armazenadas para a posterior determinação. Outro parâmetro avaliado na MIC foi a solução absorvedora, para isto, foram realizados ensaios de recuperação nas soluções avaliadas (água ultrapura e NH₄OH nas concentrações de 50 e 100 mmol L⁻¹). Foram realizados ensaios de recuperação adicionando 50% da concentração de bromo e iodo determinadas previamente na amostra utilizada para as otimizações.

É importante destacar que parâmetros como massa de papel filtro utilizada como auxiliar para o iniciador de combustão, a concentração e o volume de NH₄NO₃, bem como a pressão de O₂ utilizada no desenvolvimento do método foram baseados em trabalhos anteriores (FLORES *et al.*, 2004; MESKO, 2008).

Dissolução assistida por radiação micro-ondas

No procedimento de dissolução assistida por radiação micro-ondas, foram transferidos de 0,5 a 2 mL (correspondente a 50 a 2000 mg) de amostra para frascos de PTFE-TFM, onde posteriormente foram adicionados 6 mL de solução (água ultrapura, NH₄OH nas concentrações de 25, 50 ou 100 mmol L⁻¹ ou HTMA 110 mmol L⁻¹). Após a adição da amostra e da solução dissolutora, os frascos foram fechados, fixados ao rotor e submetidos ao programa de irradiação com micro-ondas, apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de irradiação utilizado na dissolução assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo de permanência (min)
1	1000	5 ou 10	-
2	1000	-	3, 5, 10, 20 ou 50
3*	0	-	20

Taxa de aumento de pressão: 0,5 bar s⁻¹, temperatura máxima: 240 °C e pressão máxima: 60 bar; *Etapa de resfriamento.

Cabe salientar que foram avaliados diferentes tempos de rampa (5 ou 10 min) e tempos de permanência (3, 5, 10, 20 ou 50 min) no programa de irradiação. As soluções e o programa de aquecimento foram selecionados com base em estudos publicados na literatura (KNAPP *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2015). Quando utilizado a dissolução com HTMA, houve a limitação da temperatura máxima de extração para 90 °C, para evitar riscos de degradação do reagente (KNAPP *et al.*, 1998).

As soluções obtidas após o término do programa de irradiação foram transferidas para frascos de polipropileno e aferidas a 20 mL com água ultrapura. As determinações dos analitos foram realizados por ICP-MS. Foram realizados ensaio de recuperação adicionando 50% da concentração de bromo e iodo determinadas previamente na amostra utilizada para as otimizações.

Centrifugação

Para o processo de centrifugação da saliva, cerca de 5 mL da amostra foram transferidos para frascos de polietileno na qual foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 min. Após este procedimento, foi coletado 1 mL do sobrenadante para a análise por ICP-MS. Este procedimento foi baseado no trabalho de Wang *et al.* (2008).

Determinação de bromo e iodo por ICP-MS

As soluções obtidas após os diferentes métodos de preparo de amostras foram analisadas por ICP-MS para a determinação de bromo e iodo. Para a

análise por ICP-MS foram utilizadas algumas condições operacionais, apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros operacionais para a determinação de bromo e iodo por ICP-MS.

Parâmetros	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1300
Vazão principal de argônio (L min ⁻¹)	18,0
Vazão auxiliar de argônio (L min ⁻¹)	1,2
Vazão de argônio do nebulizador (L min ⁻¹)	0,95
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Cones de amostragem (<i>sampler and skimmer</i>)	Pt
Lente iônica	<i>Autolens on</i>
Tempo de permanência no detector (ms)	50
Isótopos (m/z)	⁷⁹ Br, ¹²⁷ I

Com relação à calibração do equipamento, cabe salientar que esta foi realizada por meio de soluções preparadas a partir de soluções estoque de bromo e iodo. As curvas utilizadas para a calibração foram preparadas na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 µg L⁻¹ para iodo e 1,0 a 10,0 µg L⁻¹ para bromo. Estas soluções de calibração do equipamento foram preparadas no meio de NH₄OH 10 mmol L⁻¹, conforme soluções utilizadas durante o preparo de amostras.

Determinação de carbono por ICP OES

A determinação de carbono foi realizada por ICP OES, com o intuito de avaliar a eficiência da combustão, dissolução e do procedimento de centrifugação, bem como para avaliar a compatibilidade das soluções para posterior análise por ICP-MS. Previamente a determinação de carbono, as soluções foram purgadas com argônio durante 2 minutos para expulsar o CO₂ dissolvido, a fim de que o mesmo não interferisse na análise (NOVO *et al.*, 2018). Na Tabela 4, são apresentadas as condições operacionais utilizadas no ICP OES.

Tabela 4. Parâmetros operacionais para a determinação de carbono por ICP OES.

Parâmetros	ICP OES
Potência (W)	1400
Vazão principal de argônio (L min ⁻¹)	14,0
Vazão auxiliar de argônio (L min ⁻¹)	1,0
Vazão de argônio no nebulizador (L min ⁻¹)	1,0
Câmara de nebulização	Duplo passo
Nebulizador	<i>Cross-flow</i>
Vista de observação	Axial

Para a calibração do equipamento, foram utilizadas soluções padrão preparadas a partir de soluções estoque de carbono. A curva utilizada para a calibração foi preparada na faixa de concentração de 25 a 250 mg L⁻¹. A linha de emissão monitorada foi 193,091 nm.

Limites de detecção

Os LDs dos diferentes métodos de preparo de amostra também foram parâmetros avaliados. Estes foram calculados através de uma equação indicada pelo Inmetro, que utiliza o branco da amostra para a obtenção do LD. O cálculo utilizado está apresentado na Equação 1, onde \bar{x} é a média das medidas do branco da amostra; t é um fator numérico oriundo da distribuição de *Student*, que

depende do nível de confiança exigido e do número de graus de liberdade (n-1). O s é o desvio padrão das medidas do branco da amostra (INMETRO, 2010).

$$LD = \bar{x} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \text{ (Equação 1)}$$

Após a obtenção dos LDs através da Equação 1, onde utilizou-se um t igual a 3, fez-se a conversão considerando os fatores de diluição, se necessário, as aferições realizadas, bem como os volumes de amostra utilizados em cada método.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as análises descritas no capítulo 3 (Materiais e Métodos), os quais possibilitaram o desenvolvimento e avaliação de diferentes procedimentos de preparo de amostras de saliva para a subsequente determinação de bromo e iodo por ICP-MS. A discussão dos resultados foi subdividida conforme os diferentes procedimentos avaliados. Assim, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos após o preparo das amostras por MIC, dissolução assistida por radiação micro-ondas e centrifugação.

Métodos de preparo de amostras

Preparo da amostra por combustão iniciada por micro-ondas

Em um primeiro momento, foi avaliada a forma de introdução da amostra no sistema de combustão, tendo em vista que a maior parte dos trabalhos por MIC utiliza a amostra na forma sólida, e que a saliva é um fluido biológico viscoso e o seu elevado teor de umidade poder prejudicar o processo de combustão. Assim, conforme descrito na literatura, auxiliares de combustão vêm sendo misturados na amostra com o intuito de fornecer mais energia para a combustão completa da amostra. Um exemplo de auxiliar de combustão é a celulose microcristalina, que tem sido o reagente mais utilizado como auxiliar de combustão por ser de fácil aquisição, manipulação e descontaminação, resultando em baixos valores de brancos analíticos (COSTA *et al.*, 2015). Neste sentido, as decomposições por MIC foram realizadas envolvendo esta mistura de amostra de saliva com a celulose microcristalina em filmes de polietileno, conforme descrito no item 3.5.1 (*Materiais e Métodos*).

Para o desenvolvimento do método, foi realizada a otimização de alguns parâmetros como o volume de amostra, bem como a massa de auxiliar de combustão. Isto foi realizado com o objetivo de evitar um aumento excessivo de pressão durante a combustão, que pudesse danificar o sistema, bem como de obter menores LDs. Também foi avaliada a solução absorvedora mais adequada para a absorção dos analitos, visando a posterior determinação de bromo e iodo por ICP-MS. Nos itens 4.1.1.1 e 4.1.1.2 são apresentados os resultados referentes à otimização do volume de amostra e da solução absorvedora, respectivamente.

Otimização do volume de amostra

Tendo em vista que maiores quantidades de amostra resultam em menores LDs, o volume de saliva a ser decomposto por MIC foi um parâmetro avaliado. Como discutido anteriormente, a amostra apresenta um alto teor de água em sua composição, assim, para ser realizada a decomposição por MIC, necessita-se da utilização de um auxiliar de combustão. Desta forma, também foi realizada a otimização da massa da celulose microcristalina utilizada no processo de combustão.

O menor volume de amostra avaliado foi 0,05 mL e a menor massa de celulose microcristalina avaliada foi de 100 mg. O volume de amostra foi aumentado em incrementos de 0,05 mL e a massa do auxiliar de combustão foi aumentada em 100 mg. Cabe destacar que durante este estudo, houve o acompanhamento do aspecto da solução absorvedora após a combustão, bem como da pressão atingida após o processo de combustão com as diferentes proporções de volume de amostra e massa de auxiliar de combustão avaliada. Na Tabela 5 são apresentados os resultados referentes a otimização do volume de amostra e de celulose microcristalina para a decomposição por MIC.

Tabela 5. Volume de saliva e massa de celulose microcristalina utilizadas para a decomposição por MIC.

Volume de amostra (mL)	Massa de auxiliar de combustão (mg)	Aspecto da solução
0,05	100	Límpido
0,05	200	Límpido
0,1	200	Límpido
0,2	200	Escuro
0,2	300	Límpido
0,3	300	Escuro
0,3	400	Escuro
0,3	500	Escuro

Como observado na Tabela 5, o volume máximo de amostra possível de ser decomposto misturado com o auxiliar de combustão foi de 0,2 mL de saliva com 300 mg de celulose microcristalina, obtendo uma solução límpida e sem picos de pressão durante o processo de combustão. Pode ser observado também, que volumes maiores de amostra não foram possíveis de serem decompostos, mesmo quando a massa do auxiliar de combustão foi aumentada.

Com o objetivo de aumentar o volume de amostra a ser decomposto, 0,3 mL de amostra foram misturados com 300, 400 e 500 mg de celulose microcristalina, além da adição de 50 μ L de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} (iniciador de combustão) no interior do invólucro, para auxiliar a queima durante o processo

de combustão. Entretanto, foi observado que mesmo assim, não foi possível decompor volumes maiores de amostra. Este fato pode estar associado ao teor de água presente na amostra. Assim, o volume máximo de saliva possível de ser decomposto por MIC foi de 0,2 mL de amostra misturados com 300 mg de celulose microcristalina.

Tempo de ignição e combustão

Para a verificação do tempo de ignição e combustão da amostra, foi realizado um corte frontal na capa de proteção dos frascos e através desta abertura, foi possível visualizar o processo de combustão. Este estudo foi realizado com o intuito de observar o tempo de ignição, bem como o tempo da duração da combustão. Para realizar esta visualização, não foi utilizada a capa de proteção do rotor, como pode ser observado na Figura 8, e foi realizada uma modificação no *software* do equipamento.

Figura 8. Adaptação da capa de proteção e modo de visualização da combustão.



Quando avaliado o método de combustão da amostra, o tempo de ignição foi de 6 ± 1 s. O mesmo tempo de ignição já foi observado por outros autores para diferentes amostras (MESKO *et al.*, 2010), o que indica que independente da amostra e da celulose microcristalina avaliada, o tempo de ignição da amostra se dá pela interação da radiação micro-ondas com a solução de NH_4NO_3 , responsável pela oxidação do papel filtro. Entretanto, quanto ao tempo de combustão da amostra, foi possível observar que a duração da combustão é

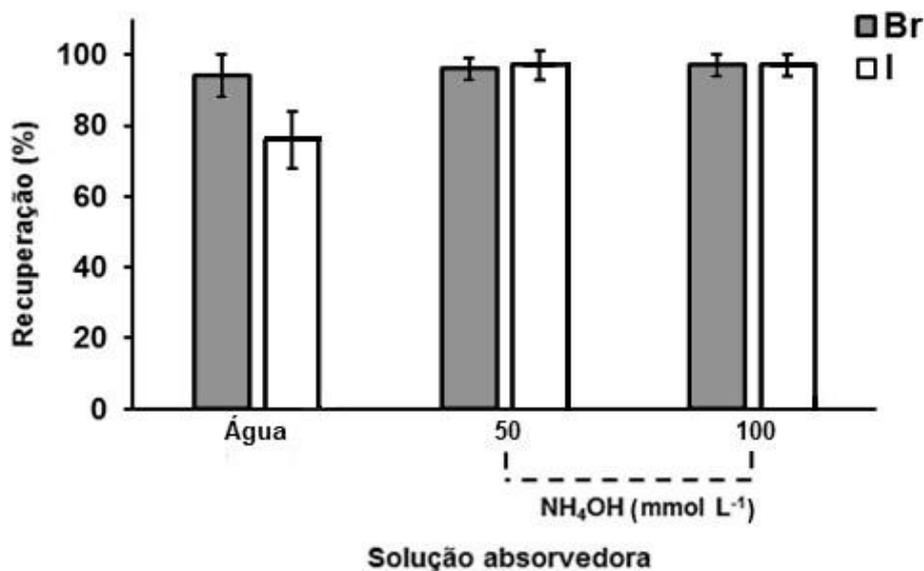
proporcional a massa de celulose microcristalina utilizada como auxiliar de combustão, podendo variar conforme a amostra avaliada. Neste sentido, o tempo de combustão da saliva utilizando as condições otimizadas (0,2 mL de amostra e 300 mg de auxiliar de combustão) foi de 21 ± 3 s.

O programa de irradiação micro-ondas utilizado na combustão das amostras de saliva, descrito na Tabela 1 (item 3.5.1, Materiais e Métodos) foi selecionado, conforme proposto em trabalhos realizados anteriormente (HARTWIG *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015). Cabe destacar que a pressão máxima atingida pelo sistema durante a otimização foi 31 bar, cerca de 40% da pressão máxima recomendada pelo fabricante (80 bar).

Otimização da solução absorvedora para a determinação de bromo e iodo após a MIC

Para que fosse selecionada a solução mais adequada para a absorção de bromo e iodo após a decomposição das amostras de saliva por MIC, foram estudadas soluções de água ultrapura e NH_4OH 50 e 100 mmol L^{-1} , sendo estas últimas, avaliadas conforme destacado em outros trabalhos na literatura (HARTWIG *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017; RONDAN *et al.*, 2018). Assim, após conhecidas as concentrações de bromo e iodo após a combustão das amostras com ambas as soluções, ensaios de recuperação foram realizados com o intuito de avaliar a solução absorvedora mais adequada, sendo adicionado na amostra previamente a decomposição, 50% das concentrações conhecidas a partir de uma solução padrão. Na Figura 9 são apresentadas as recuperações obtidas para bromo e iodo na amostra de saliva após a decomposição por MIC, utilizando água ultrapura, NH_4OH 50 e 100 mmol L^{-1} como solução absorvedora e subsequente determinação por ICP-MS.

Figura 9. Recuperações para ■ bromo e □ iodo em amostras de saliva, decompostas por MIC e determinadas por ICP-MS, após a adição de solução padrão com 50% da concentração inicial.



Como pode ser observado na Figura 9, as recuperações foram quantitativas para bromo, entre 94 e 97%, para todas as soluções avaliadas, e os desvios padrão relativos (RSDs) foram entre 3% e 6%. Entretanto, foi possível observar que para o iodo, quando utilizado água como solução absorvedora, não obtiveram-se recuperações quantitativas, sendo esta em torno de 76%. Quando utilizada as soluções de NH_4OH 50 e 100 mmol L^{-1} , foi possível obter recuperações satisfatórias para este elemento, em torno de 97%. Este fato pode estar associado ao pH da solução absorvedora após o processo de combustão da amostra, tendo em vista que este fator influencia na estabilidade dos elementos no meio, principalmente quando refere-se ao iodo. Assim, o pH das soluções foi determinado para avaliar este comportamento, observando-se que o pH quando utilizada água como solução absorvedora foi em torno de 3, e quando utilizado NH_4OH 50 ou 100 mmol L^{-1} foi em torno de 7. O carbono dissolvido após a MIC foi sempre inferior a 5 mg L^{-1} . Assim, a solução de NH_4OH 50 mmol L^{-1} foi selecionada como solução absorvedora, visto que é a solução mais diluída que possibilitou a recuperação quantitativa de ambos os elementos. Após a combustão da amostra, foi possível obter concentrações de $2,94 \pm 0,12$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ para bromo e de $0,178 \pm 0,008 \mu\text{g mL}^{-1}$ para iodo e RSDs sempre inferiores a 3%.

Branco analítico e limites de detecção

Conforme discutido anteriormente, a celulose microcristalina foi utilizada como auxiliar de combustão na MIC e isto poderia influenciar nos LDs, tendo em vista que a utilização deste auxiliar poderia elevar os brancos. Entretanto, com a realização de uma etapa de descontaminação da celulose microcristalina, foi possível obter baixos valores de branco, os quais foram cerca de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para bromo e $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para iodo. Cabe salientar, que os baixos valores de branco, também podem estar atribuídos ao uso de frascos de quartzo utilizados para a decomposição das amostras, bem como ao uso de soluções diluídas para a absorção dos analitos. Assim, após a determinação dos analitos por ICP-MS, foram obtidos baixos valores de LDs, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Limites de detecção de bromo e iodo, obtidos por ICP-MS após MIC, utilizando 0,2 mL de amostra, 300 mg de celulose microcristalina e NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora.

Elemento	Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Br	0,08
I	0,03

Assim, é possível observar que os baixos LDs podem estar associados ao uso de um sistema fechado durante a etapa de preparo de amostras, ao uso de soluções diluídas e aos baixos valores de branco. Cabe salientar que as concentrações obtidas para ambos os analitos após a decomposição por MIC foram utilizadas como valores de referência para as demais avaliações por dissolução assistida por radiação micro-ondas e centrifugação. Isso foi realizado tendo em vista que a MIC é considerada o estado da arte para o preparo de amostras orgânicas visando a determinação de bromo e iodo por diferentes técnicas de determinação (FLORES *et al.*, 2004).

Preparo da amostra por dissolução assistida por radiação micro-ondas

A dissolução assistida por radiação micro-ondas utilizando soluções alcalinas, também foi um método de preparo de amostras avaliado visando a determinação de bromo e iodo em saliva por ICP-MS. Este método foi avaliado, tendo em vista que é um dos métodos mais simples e rápido de preparo de amostras quando se trata da determinação de halogênios em amostras biológicas (MESKO *et al.*, 2016). O método de dissolução torna-se uma alternativa interessante para o preparo de amostras de saliva principalmente quando associado a radiação micro-ondas e a um sistema fechado de preparo de amostras, pois fornece uma maior frequência de análise, minimiza possíveis perdas por volatilização e contaminação, reduzindo os valores de branco e potencializa a eficiência do processo pelas elevadas temperaturas e pressões atingidas pela solução no sistema.

Para o desenvolvimento do método, foram otimizados alguns parâmetros, tais como a solução dissolutora mais adequada, o volume de amostra e o programa de aquecimento por radiação micro-ondas, visando a posterior determinação de bromo e iodo por ICP-MS. No item 4.1.2.1 são apresentados os resultados referentes à escolha da solução dissolutora, bem como do volume de amostra utilizado.

Avaliação da solução dissolutora e otimização do volume de amostra

Em um primeiro momento, as amostras de saliva foram submetidas ao procedimento de dissolução assistida por radiação micro-ondas utilizando água ultrapura, HTMA 110 mmol L⁻¹ ou NH₄OH em diferentes concentrações (25, 50 ou 100 mmol L⁻¹), de acordo com estudos anteriores (HARTWIG *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015). O método de dissolução foi realizado conforme o procedimento descrito no item 3.5.2 (Materiais e Métodos).

Para selecionar a solução mais adequada para o preparo de amostra de saliva por dissolução assistida por radiação micro-ondas, foi realizada a determinação de bromo e iodo por ICP-MS. O volume de amostra utilizado nesta primeira avaliação foi 0,5 mL, e o programa de aquecimento consistiu em: i)

rampa de 10 min até 1000 W, *ii*) 1000 W por 50 min e *iii*) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Após avaliadas as diferentes soluções dissolutoras, os resultados obtidos pelo procedimento de dissolução foram comparados com os resultados obtidos após o preparo da amostra por MIC. Isto foi realizado, tendo em vista que a MIC é um método destrutivo e que foi comprovada a exatidão do método através dos ensaios de recuperação. Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações de bromo e iodo determinadas por ICP-MS após o preparo da amostra por dissolução assistida por radiação micro-ondas, utilizando as diferentes soluções dissolutoras avaliadas.

Tabela 7. Concentração de bromo e iodo após o preparo de amostra por dissolução assistida por radiação micro-ondas, utilizando diferentes soluções dissolutoras, e posterior determinação por ICP-MS (média \pm sd, $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=3).

Solução	Br	I
Água ultrapura	2,90 \pm 0,34	0,170 \pm 0,025
HTMA 110 mmol L ⁻¹	3,24 \pm 0,14	0,188 \pm 0,010
NH ₄ OH 25 mmol L ⁻¹	3,19 \pm 0,18	0,185 \pm 0,008
NH ₄ OH 50 mmol L ⁻¹	3,19 \pm 0,12	0,187 \pm 0,008
NH ₄ OH 100 mmol L ⁻¹	3,04 \pm 0,14	0,178 \pm 0,011
MIC*	2,94 \pm 0,12	0,178 \pm 0,008

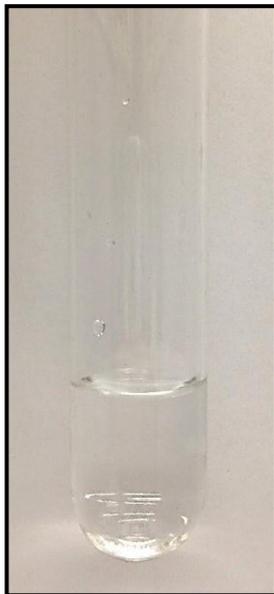
*Valores de referência

Como pode ser observado na Tabela 7, durante a avaliação das soluções utilizadas para o preparo de amostra por dissolução assistida por radiação micro-ondas, as concentrações de bromo e iodo não apresentaram diferenças significativas quando utilizadas diferentes soluções dissolutoras (ANOVA/teste Tukey, nível de confiança 95%). Entretanto, quando utilizado água como solução dissolutora, os RSDs foram superiores (12 e 15% para bromo e para iodo, respectivamente) quando comparado com os RSDs obtidos utilizando soluções alcalinas (iguais ou inferiores a 6% para ambos os analitos). Ainda, quando comparados os resultados obtidos através da dissolução assistida por radiação micro-ondas, com as diferentes soluções dissolutoras, com os resultados obtidos

por MIC, foi possível observar que as concentrações de bromo e iodo, não apresentaram diferenças significativas (ANOVA/teste Tukey, nível de confiança 95%). A partir destes resultados, pode-se concluir que o método de dissolução, apresentou exatidão adequada e que não ocorreram interferências relacionadas a matriz da amostra, durante a etapa de determinação. Cabe destacar, que todas as soluções avaliadas durante o processo de dissolução, foram adequadas para a determinação de bromo e iodo em saliva. Sendo assim, a solução de NH_4OH 25 mmol L^{-1} foi selecionada para estudos posteriores, tendo em vista que é a solução mais diluída dentre as soluções alcalinas avaliadas, contribuindo para uma menor geração de resíduos, bem como, por apresentar baixos RSDs para ambos os analitos.

Após selecionada a solução dissolutora mais adequada para o preparo das amostras de saliva visando a posterior determinação de bromo e iodo por ICP-MS, foi avaliado o volume máximo de saliva que poderia ser solubilizado com o objetivo de obter menores LDs. Neste sentido, foram avaliados 1 e 2 mL com o mesmo programa de aquecimento utilizado na avaliação da solução dissolutora. Durante estas avaliações, foi principalmente levado em consideração o aspecto da solução resultante e a concentração dos analitos. Foi possível observar que com o aumento do volume de amostra, não houveram diferenças significativas entre as concentrações de ambos os analitos avaliados (ANOVA/teste Tukey, nível de confiança de 95%). Vale destacar, que mesmo com o aumento do volume de amostra para 2 mL, o aspecto da solução resultante manteve-se límpido, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10. Aspecto das soluções obtidas após a dissolução assistida por radiação micro-ondas, de 0,5 a 2 mL de saliva, utilizando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução dissolutora.



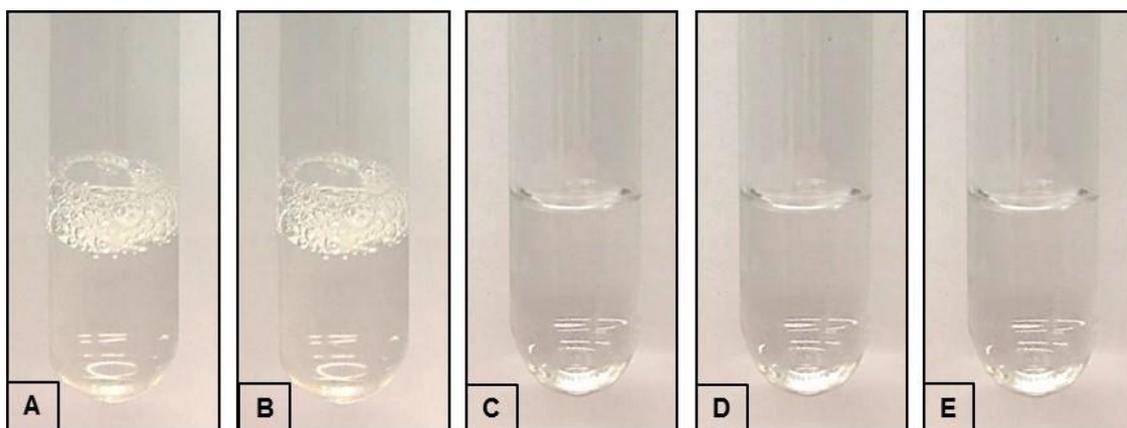
A partir deste estudo, o volume de 2 mL de amostra foi selecionado para estudos posteriores, tendo em vista a obtenção de menores LDs quando comparado com os menores volumes de saliva avaliados. Ainda, cabe ressaltar que volumes maiores de saliva não foram avaliados, pelo fato da dificuldade em coletar elevados volumes de amostra, por parte dos voluntários, para a aplicação do método.

Avaliação do programa de irradiação com micro-ondas

Tendo em vista o elevado tempo do programa de radiação com micro-ondas, este parâmetro foi avaliado com o intuito de diminuir o tempo de preparo, tornando maior a frequência de análise do método. Assim, após estabelecer a solução dissolutora e o volume de saliva mais adequado para o método de preparo de amostra por dissolução assistida por radiação micro-ondas, o programa de aquecimento foi avaliado. Inicialmente, foi utilizada uma rampa de 10 min até a potência de 1000 W para avaliar o comportamento da pressão do sistema durante a dissolução da saliva, levando em consideração que quando utilizado sistemas que suportam elevadas pressões e temperaturas, pode haver

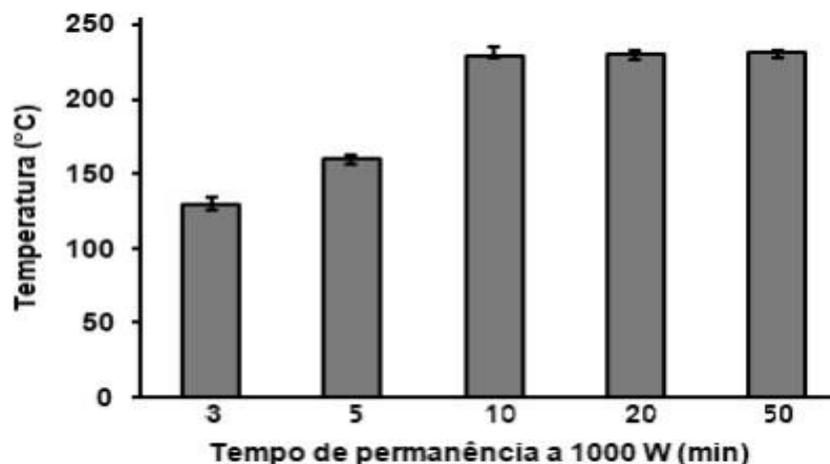
um aumento repentino da pressão durante os primeiros minutos de aquecimento. Após observar que não houveram picos de pressão durante a dissolução das amostras, esta rampa foi diminuída para 5 min até alcançar a potência de 1000 W. Posteriormente, outro parâmetro otimizado foi o tempo de permanência da radiação micro-ondas em 1000 W. No programa utilizado anteriormente, o tempo de permanência era igual a 50 min e desta forma, foram avaliados os tempos de 20, 10, 5 e 3 min. Na Figura 11, são apresentados os aspectos das soluções obtidas após os diferentes programas de aquecimento.

Figura 11. Aspecto das soluções obtidas após a dissolução de 2 mL de saliva utilizando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução dissolutora; rampa de aquecimento de 5 min até 1000 W e permanência da radiação micro-ondas de (A) 3 min, (B) 5 min, (C) 10 min, (D) 20 min e (E) 50 min.



Como pode ser observado na Figura 11 A e B, as soluções obtidas quando utilizados tempos inferiores de permanência da radiação micro-ondas (3 e 5 min), apresentaram um aspecto viscoso, bem como, a presença de espuma na solução. Entretanto, quando utilizados tempos de permanência superiores a 10 min (Figura 11 C - E), foi possível observar um aspecto límpido. O aspecto da solução pode estar diretamente relacionado com a temperatura máxima atingida durante o programa de aquecimento, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12. Temperaturas atingidas durante a dissolução de 2 mL de saliva com NH_4OH 25 mmol L^{-1} , em diferentes tempos de permanência em 1000 W.



Na Figura 12, pode ser observado que a partir de 10 min de permanência com a radiação micro-ondas, temperaturas mais elevadas foram atingidas, quando comparado com temperaturas menores ou igual a 5 min. Assim, é possível inferir que em temperaturas mais elevadas, provavelmente podem ter ocorrido transformações químicas, bem como a degradação de alguns compostos da matriz da saliva, diminuindo o aspecto viscoso e a presença de espuma.

A partir desta avaliação, as soluções resultantes utilizando os tempos de permanência da radiação micro-ondas de 10, 20 e 50 min foram analisadas para avaliar a concentração de bromo e iodo. Após a análise das dissoluções, foi possível observar que as concentrações de ambos os analitos não apresentaram diferenças significativas (ANOVA/teste Tukey, nível de confiança de 95%), e os RSDs para ambos os analitos foram inferiores a 4%. Assim, o programa de aquecimento constituído por uma rampa de aquecimento de 5 min até alcançar os 1000 W de potência, a permanência da radiação micro-ondas por 10 min em 1000 W e a etapa de resfriamento em 0 W por 20 min, foi selecionado como o mais adequado para o preparo de amostra de saliva para posterior determinação de bromo e iodo. Vale mencionar que a solução final utilizando os parâmetros otimizados apresentou o carbono dissolvido inferior a 300 mg L^{-1} e, diante disso,

essas soluções, assim como as obtidas após a MIC, apresentaram compatibilidade com a determinação de bromo e iodo por ICP-MS.

Após estabelecer as condições mais adequadas, foram realizados ensaios de recuperação, adicionando 50% e 75% das concentrações de bromo e iodo previamente determinadas por ICP MS, antes da dissolução da amostra usando as condições selecionadas. As recuperações para ambos os analitos variaram de 97 a 100%, e os RSDs foram inferiores a 5%, indicando a exatidão do método de dissolução proposto.

Análise da saliva após centrifugação

Tendo em vista que a centrifugação da amostra de saliva é a forma comumente utilizada para a posterior determinação elementar na amostra, este procedimento foi realizado, conforme descrito no item 3.5.3 (Materiais e Métodos). Vale mencionar que o sobrenadante apresentou o carbono dissolvido de 1000 mg L⁻¹ e o aspecto viscoso. Assim, para ser introduzido no espectrômetro de massas, foi necessário diluir a amostra 30 vezes, previamente a determinação, com o intuito de obter uma solução límpida, com baixo teor de carbono e que fosse compatível com a técnica de determinação. Os resultados obtidos para bromo e iodo em saliva, após o procedimento de centrifugação foram comparados com a concentração dos analitos obtidos após o preparo de amostras por MIC e por dissolução assistida por radiação micro-ondas. Na Tabela 8 são apresentados os resultados para esta avaliação.

Tabela 8. Concentração de bromo e iodo em saliva por ICP-MS, após diferentes métodos de preparo de amostras (média \pm sd, $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=3).

Método	Br	I
Centrifugação	3,03 \pm 0,13	0,097 \pm 0,005
Dissolução assistida por radiação micro-ondas	3,19 \pm 0,18	0,185 \pm 0,008
MIC	2,94 \pm 0,12	0,178 \pm 0,008

Conforme mostrado na Tabela 8, as concentrações para bromo não apresentaram diferenças significativas quando comparado a centrifugação com os diferentes métodos de preparo de amostra, por MIC e por dissolução assistida

por radiação micro-ondas (ANOVA/teste Tukey, nível de confiança de 95%). Porém, com relação ao iodo, foi possível observar que a concentração deste elemento foi inferior às obtidas após o preparo das amostras por MIC e dissolução assistida por radiação micro-ondas. Isto pode estar relacionado a disponibilização não quantitativa deste elemento para a solução analisada.

Comparação entre os diferentes métodos de preparo de amostra avaliados

Tendo em vista os resultados apresentados, pode-se observar que os métodos de MIC e por dissolução assistida por radiação micro-ondas foram adequados para o preparo de amostras de saliva para posterior determinação de bromo e iodo por ICP-MS. Quando refere-se à centrifugação da amostra, apesar de ser um procedimento mais rápido e simples para posterior análise de saliva, este não mostrou-se adequado para a subsequente determinação de iodo. Além disso, um fator limitante para a aplicação deste método de centrifugação foi a necessidade de sucessivas diluições para a posterior análise por ICP-MS, o que prejudicou na determinação dos analitos tendo em vista a baixa concentração destes na amostra.

Com relação a MIC, quando comparada a métodos de dissolução, esta apresenta como vantagem a oxidação da matéria orgânica, a qual pode ser um interferente durante a etapa de determinação. Entretanto, quando utilizada uma amostra com alto teor de umidade, como é o caso da saliva, faz-se a necessidade do uso de um auxiliar de combustão. E, ainda assim, para obter uma decomposição eficiente, o volume de amostra utilizado para ser decomposto foi limitado. Assim, a MIC e a dissolução assistida por radiação micro-ondas mostraram-se adequadas como métodos de preparo de amostra para a posterior determinação de bromo e iodo em saliva por ICP-MS. Cabe salientar, que apesar da dissolução não oxidar a matéria orgânica da amostra, como é o caso da MIC, este não foi um fator que interferiu nas determinações, tendo em vista que 99% da composição da saliva é água e o teor de carbono dissolvido foi adequado para a determinação de bromo e iodo por ICP-MS ($\leq 300 \text{ mg L}^{-1}$) (ALMEIDA *et al.*, 2008; CARPENTER, 2013). Ainda, pode-se salientar que a utilização de um sistema fechado e que suporta elevadas pressões e

temperaturas pode ter contribuído para a obtenção de resultados quantitativos para os elementos avaliados, tendo em vista a minimização de perdas por volatilização e os baixos valores de brancos analíticos.

Com base nos resultados previamente discutidos, amostras de saliva de 5 voluntários foram preparadas por ambos os métodos de preparo de amostras desenvolvidos, para a posterior determinação de bromo e iodo por ICP-MS. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação entre as concentrações de bromo e iodo após o preparo de amostras por MIC e por dissolução assistida por radiação micro-ondas em amostras de 5 indivíduos. Determinação por ICP-MS (média \pm sd, $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 3).

Voluntário	MIC		Dissolução assistida por radiação micro-ondas	
	Br	I	Br	I
1*	2,51 \pm 0,15	0,132 \pm 0,011	2,60 \pm 0,07	0,120 \pm 0,003
2*	1,09 \pm 0,09	0,069 \pm 0,006	1,20 \pm 0,04	0,074 \pm 0,002
3	3,60 \pm 0,50	0,105 \pm 0,014	4,21 \pm 0,19	0,121 \pm 0,007
4	2,27 \pm 0,08	0,202 \pm 0,020	2,17 \pm 0,02	0,180 \pm 0,004
5	4,81 \pm 0,32	0,272 \pm 0,016	5,14 \pm 0,22	0,250 \pm 0,010

*indivíduo com disfunção na glândula tireoide

Como pode ser observado na Tabela 9, as concentrações de bromo e iodo não apresentaram diferenças significativas entre os métodos de preparo de amostras desenvolvidos, quando esses foram aplicados para as cinco amostras avaliadas (ANOVA/teste Tukey, nível de confiança de 95%). Esses resultados indicam que ambos os métodos são adequados para o preparo de amostra de saliva. Contudo, é possível observar que as concentrações de bromo e iodo na saliva dos indivíduos avaliados variou em uma ampla faixa, de 1,09 a 5,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bromo e de 0,069 a 0,272 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para iodo. Isto pode estar associado a diferentes hábitos, alimentação e fatores exógenos.

Deste modo, tendo em vista as vantagens dos métodos e dos resultados obtidos, foi possível concluir que a MIC e a dissolução assistida por radiação

micro-ondas mostraram-se adequadas para a posterior determinação de bromo e iodo em saliva por ICP-MS. Assim, levando em consideração que para o procedimento de dissolução não necessita-se de um auxiliar de combustão e que este apresenta facilidade em relação a manipulação da amostra, este procedimento torna-se uma alternativa mais simples para o preparo de amostra de saliva visando a posterior determinação de bromo e iodo. Além disso, interferências relacionadas a matriz não foram observadas durante a determinação de bromo e iodo por ICP-MS.

Ainda, foram calculados os LDs para os diferentes métodos de preparo de amostra avaliados. Na Tabela 10, são apresentados os LDs para cada método avaliado para o preparo da amostra de saliva.

Tabela 1. Limites de detecção para bromo e iodo obtidos por ICP-MS após os diferentes métodos de preparo de amostras.

Métodos de preparo de amostra	Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Br	I
Centrifugação	0,007	0,0008
Dissolução assistida por radiação micro-ondas	0,005	0,001
MIC	0,08	0,03

Como pode ser observado na Tabela 10, os LDs obtidos para a dissolução assistida por radiação micro-ondas foram bastante inferiores ($0,005$ e $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$ para bromo e para iodo, respectivamente) com os obtidos por MIC ($0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ para bromo e $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ para iodo, respectivamente). Isto já era esperado, tendo em vista o volume de amostra utilizado nos diferentes procedimentos, bem como a influência do uso da celulose microcristalina como auxiliar de combustão na MIC. Na MIC foi utilizado um volume de amostra 10 vezes menor ($0,2 \text{ mL}$) ao utilizado na dissolução assistida por radiação micro-ondas (2 mL). Com relação ao procedimento de centrifugação, os LDs foram considerados baixos ($0,007 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,0008 \mu\text{g mL}^{-1}$ para bromo e para iodo, respectivamente), uma vez que foi realizada apenas a diluição do sobrenadante. Entretanto, não foi possível

obter resultados quantitativos para iodo, o que torna este procedimento inviável para a determinação sequencial dos analitos, conforme discutido anteriormente.

Neste sentido, os métodos de preparo de amostras utilizando a MIC e a dissolução assistida por radiação micro-ondas, mostraram-se adequados para o preparo de amostras de saliva, pois possibilitam a obtenção de uma solução compatível com a técnica de determinação e apresentam exatidão e precisão adequada.

5 CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados, pode-se desenvolver dois métodos de preparo envolvendo a MIC e a dissolução assistida por micro-ondas para a determinação de bromo e iodo em saliva por ICP-MS. Por meio de ambos os métodos, foi possível a obtenção de baixos valores de branco, bem como adequados LDs. Entretanto, os LDs obtidos para MIC foram superiores quando comparado aos da dissolução por radiação micro-ondas, tendo em vista os menores volumes de amostras que foram cerca de dez vezes menores comparados com o procedimento utilizando a dissolução assistida por radiação micro-ondas.

Vale mencionar, que ambos os métodos desenvolvidos para o preparo de amostra de saliva apresentaram características importantes para a aplicação em análises de rotina como, por exemplo, a segurança ao analista, elevada frequência de análise (8 amostras simultaneamente) e o tempo reduzido de preparo da amostra. Tendo em vista que se trata de um sistema fechado, possibilita a obtenção de baixos valores de branco e adequados LDs para a determinação de bromo e iodo em saliva. Ainda, a possibilidade do uso de reagentes diluídos possibilita a adequabilidade à determinação de bromo e iodo por ICP-MS, além de contribuir com uma menor geração de resíduos, conforme preconizado pela química verde.

Nesse sentido, cabe destacar que foi observado que existe uma variação entre as concentrações de bromo e iodo nas salivas avaliadas e que estes estudos podem ser aplicados para um número maior de saliva de indivíduos visando a correlação dos níveis de bromo e iodo no organismo, bem como para verificar se a concentração desses elementos sofrem alterações pela disfunção da glândula tireoide.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. D. V.; GRÉGIO, A. M.; MACHADO, M. A.; LIMA, A. A.; AZEVEDO, L. R. Saliva composition and functions: A comprehensive review. **The Journal of contemporary dental practice**, v. 9, p. 1-11, 2008.

ANVISA. Bula levotiroxina sódica. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10096822013&pIdAnexo=1886073>. Acesso: 25.06.2018.

APS J. K. M., Martens, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, v. 150. p. 119–131, 2005.

BARBOSA JUNIOR, F.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F.; PARSONS P. J. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 1669-1674, 2005.

BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Trends in sample preparation using combustion techniques. In: ARRUDA, M. A. Z. **Sample preparation**. Graz: Nova Science Publishersp, p. 53-83, 2006.

BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 4547-4566, 2016.

BENSEÑOR, I. M.; GOULART, A. C.; LOTUFO, P. A.; MENEZES, P. R.; SCAZUFCA, M. Prevalence of thyroid disorders among older people: results from the São Paulo Ageing & Health Study. **AGEING AND THYROID DISORDERS**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 27, p. 155-161, 2011.

BU, X.; WANG, T.; HALL, G. Determination of halogens in organic compounds by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, p. 1443-1451, 2003.

- CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 267-276, 2013.
- CHENG, Y. L.; REES, T.; WRIGHT, T. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. **Clinical and Translational Medicine**, v. 3, p. 1-10, 2014.
- CHOJNOWSKAA, S.; BARANB, T.; WILINSKAC, I.; SIENICKAD, P.; CABAJ-WIATERE, I.; KNAS, M. Human saliva as a diagnostic material. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, p. 185–191, 2018.
- COELHO JUNIOR, G. S.; PEREIRA, R. M.; HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G.; COSTA, V. C.; PEREIRA, C. M. P.; MESKO, M. F. Determination of Cl and S in Edible Seaweed by Ion Chromatography after Decomposition by Microwave-induced Combustion. **Revista Virtual De Química**, v. 9, p. 492-501, 2017.
- COSTA, V. C.; PICOLOTO, R. S.; HARTWIG, C. A.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 7957-7964, 2015.
- COSTANZO. L. S. **Fisiologia**. Fisiologia endócrina. 3° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 401-409, 2007.
- DEANGELO, A. B.; GEORGE, M. H.; KILBURN, S. R.; MOORE, T. M.; WOLF, D. C.; Carcinogenicity of potassium bromated administered in the drinking water to male B6C3F1 mice and F344/N rats. **Toxicologic Pathology**, v. 26, p. 587-594, 1998.
- DELANGE, F. The disorder induced by Iodine Deficiency. **Thyroid**, v. 4, p. 107-128, 1994.
- DELKER, D.; HATCH, G.; ALLEN, D.; CRISSMAN, B., GEORGE, M.; GETER, D.; KILBURN, S.; MOORE, T.; NELSON, G.; ROOP, B.; SLADE, R.; SWANK, A.; WARD, W.; DEANGELO, A. Molecular biomarkers of oxidative stress associated with bromated carcinogenicity. **Toxicology**, v. 221, p. 158-165, 2006.
- DIAZ-ARNOLD, A. M.; MAREK, C. A. The impact of saliva on patient care: A literature review. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 88, p. 337-343, 2002.

FLORES, E. M. M. Microwave-assisted sample Preparation for Trace Element Analysis, 1° ed., Amsterdam: Elsevier, 2014.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels – a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B**, v.62, p. 1051-1064, 2007.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 3525-3529, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia médica**, 11° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HARIRIAN, H.; ANDRUKHOV, O.; BOTTCHEK, M.; PABLIK, E.; WIMMER, G.; MORITZ, A.; RAUSCH-FAN, X. Salivary neuropeptides, stress and periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. 9-18, 2018.

HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G.; CRIZEL, M. G.; MULLER, A. L.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F.; Determination of bromine and iodine in shrimp and its parts by ICP-MS after decomposition using microwave-induced combustion. **Analytical Methods**, v. 6, p. 7540-7546, 2014.

HUMPHREY, S. P., WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, p. 162-169, 2001.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008). Coordenação Geral de Acreditação, 2010. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf Acessado em 04/07/2018.

JIMINEZ-REYES, M.; SANCHEZ-AGUIRRE, F. J. Sodium and chlorine concentrations in mixed saliva of healthy and cystic fibrosis children. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 47, p. 273–277, 1996.

KAPLAN, M. D.; BAUM, B. J. The functions of saliva. **Dysphagia**, v. 8, p. 225-229, 1993.

KNAPP, G.; MAICHIN, B., FECHER, P., HASSE, S., SCHRAMEL, P. Iodine determination in biological materials – options for sample preparations and final determination. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 362, p. 508-513, 1998.

KOHLMEIER, M. **Nutrient Metabolism**. Amsterdam: Academic press, 2003.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 2 Ed., São Paulo: EditSBQ, 2016.

LIMA, F. O.; RAMALHO, A. J. P.; RUMMLER, M. C. O.; RODRIGUEZ, T. T. Hipotireoidismo altera secreção e composição salivar em ratos sépticos. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, p. 53-57, 2008.

LLENA-PUY, C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v.11, p. 449-455, 2006.

MCCALL, A. S.; CUMMINGS, C. F.; BHAVE, G.; VANACORE, R.; PAGE-MCCAW, A.; HUDSON, B. G. Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture, **Cell**, v.157, p.1380-1392, 2014.

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; DUARTE, F. A.; BIZZI, C. A.; DIEHL, L. O.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7615-7642, 2013.

MESKO, M. F. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímico e alimentos após combustão iniciada por microondas**. 2008. 156 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MESKO, M. F.; MELLO, P. A.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Iodine determination in food by Inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1125-1131, 2010.

MESKO, M. F.; TEOTONIO, A. C.; OLIVEIRA, D. T. T.; NOVO, D. L. R.; COSTA, V. C. A feasible method for indirect quantification of L-T₄ in drugs by iodine determination. **Talanta**, v. 166, p. 223-227, 2017.

MESKO, M. F.; COSTA, V. C.; PICOLOTO, R. S.; BIZZI, C. A.; MELLO, P. A. Halogen Determination in Food and Biological Materials using Plasma-based

Techniques: Challenges and Trends of Sample Preparation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 1243-1261, 2016.

MONTASER, A. **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**. 2 ed., New York: Wiley-VCH, 1998.

MORI, M.; YAMAMOTO, T.; KASEDA, M.; YAMADA, S.; ITABASHI, H. Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of background electrolyte. **Journal of Chromatography B**, v. 887– 888, p. 1–7, 2012.

MURRAY, R. K.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A.; GRANNER, D. K. **Harper – bioquímica ilustrada**, 26° Ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

NAKAJIMA, K. Low serum amylase and obesity, diabetes and metabolic syndrome: A novel interpretation. **World Journal of Diabetes**, v. 7, p. 112-121, 2016.

NOBREGA, J. A.; SANTOS, M.C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Review: Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 465-495, 2006.

NOVO, D. L. R.; PEREIRA, R. M.; COSTA, V. C.; HARTWIG, C. A.; MESKO, M. F. A novel and eco-friendly analytical method for phosphorus and sulfur determination in animal feed. **Food Chemistry**, v. 246, p. 422-427, 2018.

OLMEDO P.; PLA, A.; HERNANDEZ, A. F.; LOPEZ-GUARNIDO, O.; RODRIGO, L.; GIL, F. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 60-67, 2010.

PAPACOSTA, E., NASSIS, G. P. Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 14, p. 424–43, 2011.

PARSONS, P. J.; BARBOSA JUNIOR, F.; GERAGHTY, C. M.; LEWIS JUNIOR, M. E.; PALMER, C. D. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively

- coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 980-990, 2006.
- PAVELKA, S. Metabolism of Bromide and Its Interference with the Metabolism of Iodine. **Physiological Research**, v. 53, p. 81-90, 2004.
- PAVELKA, S. Radiometric determination of thyrotoxic effects of some xenobiotics. **Radiation and Application**, v. 1, p. 155-158, 2016.
- PEDERSEN, A. M.; BARDOW, A.; JENSEN, S. B.; NAUNTOFTE, B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion, **Oral Diseases**, v. 8, p. 117–129, 2002.
- PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; DUARTE, F. A.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, p. 249-252, 2008.
- PEREIRA, Rodrigo Mendes. **Combustão Iniciada por Micro-ondas: Um método para a Volatilização de Cloro e Flúor em Cimento**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.
- POLES JR., A. A.; BALCÃO, V. M.; CHAUD, M. V.; VILA, M. M. D. C.; ARANHA, N.; YOSHIDA, V. M. H.; OLIVEIRA JR., J. M. Study of the elemental composition of saliva of smokers and nonsmokers by X-ray fluorescence. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 118, p. 221–227, 2016.
- POZEBON D.; DRESSLER V. L.; CURTIUS A. J. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Química Nova**, v. 22, p. 838-846, 1999.
- REN, H.; QIU, H.; LIANG, X.; WANG, X.; JIANG, S. Determination of inorganic anions in saliva by electro osmotic flow controlled counter flow isotachopheric stacking under field-amplified sample injection. **Journal of Chromatography B**, v. 935. p. 75–79, 2013.
- ROMARÍS-HORTAS, V.; BERMEJO-BARRERA, MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑERO, A. Speciation of the bioavailable iodine and bromine seaweed by high performance liquid chromatography hyphenated with

inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 745, p. 24- 32, 2012.

RONDAN, F. S.; HARTWIG, C. A.; NOVO, D. L. R.; MORAES, D. P.; CRUZ, S. M.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F. Ultra-trace Determination of Bromine and Iodine in Rice by ICP-MS after Microwave-Induced Combustion. **Journal Of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 199-204, 2018.

SÁDECKÁ, J.; POLONSKY, J. Determination of inorganic anions in saliva by capillary Isotachopheresis. **Talanta**, v. 59, p. 643-649, 2003.

SAVINOV, S. S.; ANISIMOV, A. A.; DROBYSHEV, A. I. Problems and optimization of sampling, storage, and sample preparation in the determination of the trace element composition of human saliva. **Zhurnal Analiticheskoi Khimii**, v. 71, p. 1063–1068, 2016.

SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Tireoide. Disponível em: www.endocrino.org.br/tireoide. Acessado em 21.06.2018.

SEIDEL, S.; KREUTZER, R.; SMITH, D.; MCNEEL, S.; GILLISS, D. Assessment of commercial laboratories performing hair mineral analysis. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 67-72, 2001.

SILVA, J. S.; DIEHL, L. O.; FROHLICH, A. C.; COSTA, V. C.; MESKO, M. F.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. M. Determination of bromine and iodine in edible flours by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 246-250, 2017.

SILVA, M. J.; REIDY, J. A.; SAMANDAR, E.; HERBERT, A. R.; NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M. Detection of phthalate metabolites in human saliva. **Archives of Toxicology**, v. 79, p. 647–652, 2005.

SMITH, J. W.; EVANS, A. T.; COSTALL, B.; SMYTHIE, J. W. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 46-60, 2002.

SUGIMOTO, M.; WONG, D. T.; HIRAYAMA, A.; SOGA, T.; TOMITA, M.; Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. **Metabolomics**, v. 6, p. 78–95, 2010.

TENOVUO, J.; MIKINEN, K. K. Concentration of Thiocyanate and Ionizable Iodine in Saliva of Smokers and Nonsmokers. **Journal of Dental Research**, v.55, p.661-663, 1976.

TOMITA, M.; SOGA, T.; HIRAYAMA, A.; WONG, D. T.; SUGIMOTO, M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. **Metabolomics**, v. 6, p. 78–95, 2010.

TORALLES, I. G.; COELHO JR, G. S.; COSTA, V. C.; CRUZ, S. M.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. A fast and feasible method for Br and I determination in whole egg powder and its fractions by ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 221, p. 877-883, 2017.

URBANOWICZ, M.; JASINSKI, A.; JASINSKA, M.; DRUCIS, K.; EKMAN, M.; SZARMACH, A.; SUCHODOLSKI, R.; POMECKO, R.; BOCHENSKA, M. Simultaneous determination of Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Cl⁻ in unstimulated and stimulated human saliva using all solid state multisensor platform. **Electroanalysis**, v. 29, p. 2232–2238, 2017.

VANDERPUMP, M. P. J. The epidemiology of thyroid disease. **British Medical Bulletin**, v. 99, p. 39-51, 2011.

VOBECKY, M.; BABICKY, A.; LENER, J. Effect of increased bromide intake on iodine excretion in rats. **Biological Trace Elements Research**, v. 55, p. 215-219, 1996.

WANG, D.; DU, X.; ZHENG, W. Alteration of saliva and serum concentration of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. **Toxicology Letters**, v. 176, p. 40-47, 2008.

WHO (World Health Organization). **Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination - A guide for programme managers**. Geneva: World Health Organization, 2007.

WHO (World Health Organization). **Trace Element in human**. Geneva: World Health Organization, 1996.

XU, Z.; DOI, T.; TIMERBAEV, A. R.; HIROKAWA, T. Sensitive determination of anions in saliva using capillary electrophoresis after transient isotachophoretic preconcentration. **Talanta**, v. 77, p. 278–281, 2008.

ZAMPERINI, C. A.; SCHIAVINATO, P. C. S.; PAVARINA, A. C.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E.; MACHADO, A. L. Effect of human whole saliva on the in vitro adhesion of *Candida albicans* to a denture base acrylic resin: a focus on collection and preparation of saliva samples. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 4, p. 225-228, 2013.

ANEXO

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de Métodos para a Determinação de Elementos Essenciais e Não-essenciais em Amostras Biológicas Obtidas por Coletas Não-invasivas em Humanos

Pesquisador: MARCIA FOSTER MESKO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 73880417.5.0000.5317

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pelotas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.292.445

Apresentação do Projeto:

Diante do crescente interesse na determinação de elementos essenciais e não-essenciais em amostras biológicas de origem humana, especial atenção tem sido dada ao desenvolvimento de métodos que possibilitem a obtenção de informações confiáveis a respeito da concentração destes elementos. Nesse sentido, a pesquisa visa contribuir com o desenvolvimento de métodos com relevância científica, tecnológica e inovadora para atender as demandas atuais da sociedade. O tema da presente proposta vem ao encontro da necessidade de informações quanto à presença de elementos essenciais e não-essenciais no organismo humano, podendo levar a informações que auxiliem no diagnóstico de diversas doenças, muitas delas com reconhecido aumento de casos como, por exemplo, o hipo e hipertireoidismo. Além disso, o projeto propõe uma interface entre a área da química e das ciências biológicas. Esse trabalho visa desenvolver métodos de análises para a determinação de elementos essenciais e não-essenciais em amostra biológicas obtidas por coletas não-invasivas. Serão utilizados cabelos, unhas e salivas de voluntários, dentre estes, alunos de graduação e pós-graduação em química da UFPel que serão convidados pessoalmente para participar da pesquisa. É previsto uma amostragem de no mínimo 20 pessoas, sendo que esse número de participantes contempla o número de amostras necessárias para o desenvolvimento dos métodos de análise. Cabe salientar que o projeto não tem como foco a

Endereço: Av Duque de Caxias 250

Bairro: Fragata

CEP: 96.030-001

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.292.445

avaliação do estado clínico dos participantes, sendo a participação destes restrita apenas ao fornecimento das amostras, as quais serão necessárias para o desenvolvimento e otimização dos métodos propostos. A etapa de amostragem será realizada respeitando-se os aspectos éticos envolvidos, os quais constam nos termos de consentimento livre e esclarecido e confidencialidade. Após a coleta, as amostras de cabelo, saliva e unha serão imediatamente identificadas e mantidas em ambientes apropriados no Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais (LCCBio), nas dependências do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Após a otimização do método, alguns indivíduos podem ser convidados a doar amostras para estudos de aplicabilidade do método. Neste caso, pode ser que grupos com mais de 20 indivíduos seja necessário. Serão avaliados métodos de preparo de amostras visando a posterior determinação elementar, tais como a combustão iniciada por micro-ondas e métodos de digestão com aquecimento convencional ou assistidos por micro-ondas, ultrassom e ultravioleta. Em todos os métodos serão avaliados diferentes parâmetros, tais como a massa de amostra, soluções digestora ou absorvedora, programa de incidência da radiação micro-ondas, dentre outros. Além disso, métodos que se baseiam na dissolução e extração com solvente utilizando aquecimento convencional, micro-ondas e ultrassom serão avaliados. Parâmetros como temperatura, quantidade de amostra e tempo de aquecimento serão otimizados. Ainda, de acordo com a necessidade, poderão ser avaliados outros métodos de preparo de amostras, os quais serão selecionados no decorrer da pesquisa. As determinações serão realizadas utilizando diferentes técnicas de determinação que apresentam elevada sensibilidade, tais como as espectrométricas, potenciométricas e cromatográficas. As condições operacionais para a determinação utilizando estas técnicas serão selecionadas de acordo com a recomendação de cada fabricante e serão adequadas visando melhores resultados (exatidão e precisão) sempre que necessário. Para a escolha da técnica de determinação, serão considerados parâmetros como sensibilidade e possíveis interferências, bem como o custo de aquisição e manutenção. A exatidão dos métodos, será avaliada utilizando materiais de referência, quando disponíveis, com ensaios de adição/recuperação dos analitos e/ou por comparação com outros métodos. A análise dos dados será feita apenas com critérios empregados na área de química analítica, sendo possível estabelecer uma validação quando cabível.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Desenvolver métodos de análise adequados e confiáveis para a determinação de elementos essenciais e não-essenciais para o organismo em amostras biológicas humanas obtidas através de coletas não-invasivas.

Endereço: Av Duque de Caxias 250
Bairro: Fragata **CEP:** 96.030-001
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.292.445

Objetivo Secundário: Avaliar métodos de preparo de amostra utilizando ondas ultrassônicas, radiação micro-ondas e ultravioleta visando a posterior determinação elementar; Investigar métodos de preparo de amostras que sejam compatíveis à determinação das concentrações de elementos essenciais e não essenciais para o organismo em amostras biológicas não-invasivas de origem humana através de diferentes técnicas de determinação com elevada sensibilidade; Fornecer informações quanto a concentração elementar em amostras biológicas não-invasivas de origem humana; Desenvolver pesquisa na interface entre a química e as ciências biológicas; Estabelecer protocolos de amostragem visando a determinação elementar de amostras biológicas obtidas por coletas não-invasivas em humanos; Desenvolver métodos de análise adequados para avaliar a concentração de elementos químicos em diferentes populações, garantido que seja possível realizar a correta interpretação dos resultados; Desenvolver e aplicar ferramentas para a determinação de halogênios, como, por exemplo, o iodo, considerando a importância em avaliar sua ingestão, assim como o funcionamento da glândula tireoide; Promover a formação de recursos humanos em nível de pós-graduação através da orientação de mestres e doutores na área de desenvolvimento de métodos analíticos para determinação elementar em amostras biológicas junto ao Programa de Pós-Graduação em Química e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da UFPEl; Promover a formação de recursos humanos em nível de graduação através da orientação de alunos de iniciação científica; Divulgar os resultados através da submissão de artigos para revistas científicas indexadas com reconhecimento internacional e através da submissão de trabalhos para congressos da área.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Com relação aos riscos: "Os voluntários serão orientados sobre possíveis riscos inerentes ao procedimento de coleta das amostras. Uma vez que se trata de uma coleta não invasiva e não necessita do uso de seringas ou agulhas, não ocasiona ao voluntário os riscos de dores, edemas e derramamentos. É válido mencionar que o único risco que poderá causar ao voluntário é o constrangimento pelo contato durante a coleta da amostra, que embora seja mínimo, pode levar ao voluntário desistir de participar da pesquisa."

- Com relação aos benefícios: "Os métodos propostos neste estudo devem permitir a amostragem de uma quantidade adequada de cabelo, saliva e unhas, por meio de procedimentos não-invasivos e sem o uso de reagentes adicionais. Os métodos propostos apresentarão elevada sensibilidade, exatidão e precisão. O estudo em questão tem como principais vantagens frente às amostras

Endereço: Av Duque de Caxias 250
Bairro: Fragata **CEP:** 96.030-001
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.292.445

obtidas por coletas invasivas, a simplicidade de coleta, estocagem, transporte e manuseio. Além disso, é importante mencionar a praticidade e a possibilidade de fazer amostragens simultâneas, além de reduzir consideravelmente a geração de resíduos e minimizar riscos de contaminação. Os métodos de análise propostos poderão ser utilizados com confiabilidade em estudos posteriores de diversas áreas do conhecimento com o intuito de avaliar a concentração dos elementos em pessoas com diferentes patologias, hábitos, expostas a ambientes contaminados, dentre outras".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão desenvolvidos novos métodos de análise levando em consideração as peculiaridades de cada amostra e dos elementos que se deseja determinar. A partir do desenvolvimento do método, visa-se a determinação dos halogênios (bromo (Br), cloro (Cl), flúor (F) e iodo (I)), bem como do enxofre.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Recomendações:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Projeto_MarciaMesko.doc	22/09/2017 16:10:50	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_912744.pdf	21/06/2017 17:32:14		Aceito
Outros	termo_de_confidencialidade.pdf	20/06/2017 11:18:29	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_completo.pdf	20/06/2017 11:17:07	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Outros	Formulario_registro_de_amostra.pdf	20/06/2017 11:16:46	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito

Endereço: Av Duque de Caxias 250
Bairro: Fragata **CEP:** 96.030-001
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.292.445

Outros	Autorizacao.pdf	20/06/2017 11:15:07	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/06/2017 11:13:43	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_institucional.pdf	20/06/2017 11:04:05	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	20/06/2017 11:03:01	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	19/06/2017 17:13:39	MARCIA FOSTER MESKO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 22 de Setembro de 2017

Assinado por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador)

Endereço: Av Duque de Caxias 250
Bairro: Fragata **CEP:** 96.030-001
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com