

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE Br E I EM SALIVA DE ORIGEM HUMANA

JULIA EISENHARDT DE MELLO<sup>1</sup>; DIOGO LA ROSA NOVO<sup>1</sup>; MARIELE SAMUEL  
DO NASCIMENTO<sup>2</sup>; FILIPE SOARES RONDAN<sup>1</sup>; CARLA DE ANDRADE  
HARTWIG<sup>1</sup>; MÁRCIA FOSTER MESKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas*

<sup>2</sup>*Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria*

*julia\_eisenhardt@hotmail.com; marciamesko@yahoo.com.br*

### 1. INTRODUÇÃO

A análise de fluidos corporais é comumente utilizada para a avaliação da concentração de elementos e/ou moléculas no corpo humano (GOULLÉ, et al. 2005). A saliva é um dos principais fluidos produzidos pelo corpo humano, e é constituída por uma variedade de eletrólitos, como sódio, potássio, cálcio e magnésio. Além de eletrólitos, também são encontrados na saliva moléculas orgânicas, como proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados, como ureia e amônia. Diante disso, a saliva torna-se um fluido corporal de grande importância no ramo da pesquisa, para a avaliação dos níveis de elementos e moléculas químicas presentes no organismo humano, tendo ainda como vantagem, a possibilidade da realização de uma coleta não invasiva (CARPENTER, 2013).

A concentração de eletrólitos no corpo humano está diretamente relacionada com o funcionamento do organismo. Dentre os eletrólitos presentes no organismo, bromo (Br) e iodo (I) apresentam importantes funções fisiológicas, entretanto, podem causar efeitos adversos ao organismo quando em concentrações inadequadas. Os níveis de I no corpo humano estão diretamente relacionados com as disfunções da glândula tireoide, como o hipotireoidismo e o hipertireoidismo. Quando se refere ao Br, existem poucas informações acerca dos níveis em que este elemento pode estar presente no organismo sem causar prejuízos à saúde. Contudo, é relatado que o excesso de Br no organismo pode causar algumas disfunções ao sistema endócrino (VOS, et al. 2006), principalmente devido a sua similaridade química com o I, o que o leva a competir pelos mesmos receptores da glândula tireoide para capturar o I, inibindo assim, a produção de hormônios na tireoide (LAG, et al. 1991). Entretanto, existe uma carência de informações relacionadas à concentração de Br e I em saliva de origem humana.

Quando se pretende a determinação de Br e I em saliva, embora essa apresente em sua composição cerca de 99% de água, existem moléculas orgânicas que podem interferir na análise. Além disso, Br e I podem ficar ligados à matriz orgânica da saliva e não serem disponibilizados para a solução que será analisada. Diante disso, devem ser utilizados métodos de análise que forneçam informações precisas e exatas em relação a concentração de Br e I em saliva humana, considerando as baixas concentrações dos eletrólitos neste fluido. A etapa de preparo de amostra é considerada a etapa mais crítica e suscetível a erros dentro da sequência analítica, e de maneira geral, o uso de soluções alcalinas tem sido proposto com êxito para o preparo de amostras, visando a determinação de halogênios, tendo em vista que quando utilizado meio ácido, estes elementos podem ser perdidos por volatilização (NÓBREGA, et al. 2006). Neste contexto, a dissolução assistida por radiação micro-ondas utilizando

solução alcalina pode ser uma alternativa para o preparo de amostras de saliva, uma vez que tem sido amplamente utilizada para a extração de Br e I em diferentes matrizes (MESKO, et al. 2016). Quanto à determinação, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem sido comumente utilizada para a determinação de Br e I em diferentes matrizes, pois apresenta capacidade de determinação multielementar, elevada sensibilidade, baixos limites de detecção e de quantificação (GOULLÉ, et al. 2005).

Assim, tendo em vista a importância do conhecimento das concentrações de Br e I em diferentes fluidos biológicos de origem humana, e a carência de métodos que visem a determinação em saliva humana, este trabalho teve como objetivo propor um método de análise para a determinação de Br e I nesse fluido. Para isso, foi avaliada a introdução direta da saliva no sistema de determinação (ICP-MS), bem como a realização de uma etapa prévia de dissolução assistida por radiação micro-ondas utilizando diferentes soluções.

## 2. METODOLOGIA

Inicialmente, cerca de 10 mL de saliva humana de quatro voluntários foram coletadas individualmente e armazenadas em frascos de polipropileno. A coleta foi realizada em jejum após três enxágues da cavidade oral com água ultrapura. Posteriormente, foi feita a homogeneização das amostras, para a obtenção de um volume maior de saliva para a avaliação dos métodos.

Para a introdução direta da saliva no ICP-MS, foi realizada apenas a centrifugação da amostra a 4000 rpm por 30 min, sendo o sobrenadante diluído no mínimo 15 vezes com água, até a obtenção de uma solução com aspecto límpido. Para a dissolução assistida por radiação micro-ondas, 0,5 mL de saliva foram transferidos para frascos de politetrafluoretileno modificado quimicamente (PTFE-TFM, Anton Paar, Áustria), sendo, posteriormente, adicionados 6 mL das soluções avaliadas (HTMA 110 mmol L<sup>-1</sup> ou NH<sub>4</sub>OH 50 ou 100 mmol L<sup>-1</sup>). Em seguida, os frascos foram fechados, fixados ao rotor e submetidos ao seguinte programa de aquecimento por irradiação com micro-ondas (Multiwave 3000®, Anton Paar): i) rampa de 10 min até 1000 W; ii) 1000 W por 50 min; iii) 0 W por 20 min. Posteriormente, as soluções foram transferidas para frascos volumétricos e o volume foi aferido a 20 mL com água ultrapura. Para a comparação dos resultados, foi utilizado o método de combustão iniciada por micro-ondas (MIC), tendo em vista que é um método consolidado para o preparo de amostras orgânicas, visando à determinação de halogênios (COSTA, et al. 2015). Para o método de referência, foram utilizados 300 mg de celulose microcristalina como auxiliar para a combustão de 200 mL de saliva, e 6 mL de NH<sub>4</sub>OH 100 mmol L<sup>-1</sup> como solução absorvedora. Para a avaliação da exatidão, foram realizados ensaios de recuperação.

A determinação de Br e I, em todos os casos, foi realizada utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (NexION 300X®, Perkin Elmer, Canadá), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard), câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion Inc.) e tocha com tubo injetor de quartzo com 2 mm de diâmetro interno.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando realizada a determinação de Br e I na saliva utilizando o método de referência, foram obtidas as concentrações de 2,944 ± 0,119 mg L<sup>-1</sup> e 0,178 ± 0,008 mg L<sup>-1</sup> para Br e I, respectivamente. Os desvios padrão relativos (RSDs)

foram sempre inferiores a 5%. Quando realizados ensaios de recuperação a partir de uma solução padrão, recuperações em torno de 98% foram obtidas. Após a obtenção destes valores de referência, foi avaliada a introdução da amostra no sistema de determinação após uma etapa de centrifugação e diluição (análise direta), ou após a realização de uma dissolução assistida por radiação micro-ondas utilizando diferentes soluções. Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações de Br e I obtidas após os diferentes métodos de preparo de amostra avaliados.

**Tabela 1.** Concentrações de Br e I determinadas por ICP-MS em saliva humana após centrifugação ou dissolução assistida por radiação micro-ondas (média  $\pm$  desvio padrão, mg L<sup>-1</sup>, n = 3).

Preparo	Solução	Br	I
Centrifugação	-	3,025 $\pm$ 0,134	0,097 $\pm$ 0,001
Dissolução assistida por radiação micro-ondas	NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup>	3,113 $\pm$ 0,190	0,175 $\pm$ 0,020
	NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup>	3,300 $\pm$ 0,465	0,178 $\pm$ 0,020
	HTMA 110 mmol L <sup>-1</sup>	3,248 $\pm$ 0,137	0,188 $\pm$ 0,018
MIC*	NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup>	2,944 $\pm$ 0,119	0,178 $\pm$ 0,008

\* Método de referência

Como pode ser observado, quando realizada a análise direta da saliva, a concentração de I obtida foi cerca de 54% inferior ao valor de referência, o que não foi observado para Br. Neste caso, provavelmente o I tenha ficado ligado aos constituintes orgânicos da matriz, separados durante a centrifugação. Entretanto, a realização de uma etapa de centrifugação para a análise direta da saliva é de extrema importância, pois minimiza as interferências de transporte, bem como, as causadas por carbono durante a determinação por ICP-MS.

Durante a avaliação das soluções utilizadas para o preparo de saliva por dissolução assistida por radiação micro-ondas, observou-se que as concentrações de Br e I na saliva não apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA/teste Tukey, nível de confiança de 95%). Além disso, as concentrações obtidas foram concordantes com os valores de referência e todas as soluções avaliadas foram adequadas para a posterior determinação de Br e I em saliva. Assim, a solução de NH<sub>4</sub>OH 50 mmol L<sup>-1</sup> foi selecionada para estudos posteriores, uma vez que essa apresentou o menor RSD para ambos os analitos, bem como, por ser a solução mais diluída dentre as avaliadas, contribuindo para a menor geração de resíduos. Cabe destacar que, para todas as soluções avaliadas, os RSDs variaram de 4 a 14% para Br, e de 10 a 12% para I.

Após estabelecer as condições consideradas mais adequadas para o método proposto, esse foi aplicado para 1 mL de saliva, com o intuito de avaliar sua eficiência frente a maiores volumes de amostra. As concentrações de Br e I obtidas neste caso foram de 3,195  $\pm$  0,122 mg L<sup>-1</sup> e 0,187  $\pm$  0,008 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os RSDs foram de 4% para Br e 4% para I, mostrando que o método proposto também é adequado para a análise de 1 mL de saliva. Volumes maiores de amostra não foram avaliados, considerando que, rotineiramente, a coleta individual de elevados volumes pode ser inviável. Os limites de detecção do método proposto para Br e I foram 0,06 mg L<sup>-1</sup> e 0,008 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base no que foi apresentado, pode-se concluir que o método proposto, utilizando a dissolução assistida por radiação micro-ondas, com solução de 50 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH, e a determinação por ICP-MS, mostrou-se adequado para a determinação de Br e I em saliva de origem humana. O método apresenta vantagens quando comparado com a MIC, como, por exemplo, maior simplicidade em relação à introdução da amostra no sistema. O método desenvolvido também apresentou precisão e exatidão satisfatórias, bem como a possibilidade da utilização de uma solução diluída adequada para os analitos e para a técnica de determinação. Por fim, é importante destacar que, após o aceite pelo comitê de ética em pesquisa humana (CEP) da Universidade Federal de Pelotas, serão realizados estudos de aplicabilidade do método na determinação de Br e I em saliva de indivíduos considerados saudáveis ou que apresentem disfunções na glândula tireoide, visando estabelecer uma relação entre estas condições e a concentração dos eletrólitos citados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.4, p.267-276, 2013.

GOULLÉ, J. P.; MAHIEU, L.; CASTERMANT, J.; NEVEU, N.; BONNEAU, L.; LAINÉ, G.; BOUIGE, D.; LACROIX, C. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. **Forensic Science International**, v.153, p.39-44, 2005.

LAG, M.; SODERLUND, E. J.; OMICHINSKI, J. G.; BRUNBORG, G.; HOLME, J. A.; DAHL, J. E.; NELSON, S. D.; DYBING, E. Effect of bromine and chlorine positioning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes. **Chemical Research Toxicology**, v.15, p.528-534, 1991.

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.

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

VOS, J. G.; BECHER, G.; VAN DEN BERG, M.; DE BOER, J.; LEONARDS, P. E. G. Brominated flame retardants and endocrine disruption. **Pure and Applied Chemistry**, v.75, p.2039-2046, 2003.