

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE FLÚOR EM FÍGADO ANIMAL POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS APÓS DECOMPOSIÇÃO POR COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS

THIAGO I. CALDEIRA¹; ANDRESSA C. LEMOS²; ALINE L. SIMSEN³; GABRIEL A. MARTINS⁴; FILIPE S. RONDAN⁵; MARCIA FOSTER MESKO⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – thiagoicaldeira@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – andressalemos@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – simsen.aline@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – gabrimartins1@hotmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – fsrondan@gmail.com.*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – marciamesko@yahoo.com.*

1. INTRODUÇÃO

O flúor é altamente reativo, corrosivo e tóxico. Ele é o elemento mais eletronegativo e se encontra no grupo 17 da tabela periódica, tem como símbolo a letra F e número atômico 9. Este elemento pode ser encontrado na natureza, principalmente, na forma de minérios, como a fluorita (CaF_2), criolita (Na_3AlF_6) e topázio ($\text{Al}_2\text{SiO}_4\text{F}_2$) e também está presente no solo, em fontes de água naturais e plantas (MEIERS, 2023). Este elemento está presente na água potável tanto de forma natural como artificial, pela adição deste elemento pelas companhias de distribuição de água, sendo esta a maior fonte de ingestão deste elemento nos seres vivos (WHO, 2006). A fluoretação da água potável se dá após estudos realizados do início do século XXI mostrarem que populações que viviam em uma região onde a água possuía uma concentração de flúor acima de 1 mg L^{-1} tinham um número de casos de cárie dentária muito menor de locais onde a água potável tinha uma concentração inferior a $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ (LEWIS et al., 2015). Apesar dos benefícios comprovados do flúor na aplicação odontológica, diversos estudos realizados mostram que a ingestão crônica de flúor causa um acúmulo metabólico deste elemento no indivíduo (MCDONAGH et al., 2000). Essa acumulação causa toxicidade, que se dá principalmente quando os níveis de ingestão de flúor estão acima do permitido pelos órgãos de fiscalização, como estabelecido pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), que estabelece como nível máximo de flúor permitido na água potável no Brasil em $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ para uma temperatura ambiente de 20°C , e o limite recomendado em $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ (FUNASA, 2012).

Os principais centros de acúmulo de flúor no organismo são os ossos e dentes, porém, também está presente em menor quantidade nos tecidos moles, como fígado e rins, bem como no sangue (WHO, 2006). O consumo excessivo de flúor está diretamente ligado a casos de fluorose dentária e esquelética (SRIVASTAVA & FLORA, 2020), doenças hepáticas e renais, bem como a neurotoxicidade, que causa perda de memória e déficit de aprendizagem (CHOI et al., 2012). Sendo assim, ressalta-se a importância de métodos adequados para a determinação deste elemento. Para isso, necessita-se de método de preparo de amostras adequado para determinação de flúor nestes tecidos, como mostrado em diversos estudos realizados nos últimos anos. Nenhum método de preparo de amostra pode ser considerado universal, pois cada tipo de amostra exige um preparo diferente. Assim surge a demanda pelo desenvolvimento de novos métodos e estratégias para este quesito.

Os métodos clássicos e oficiais se encontram ultrapassados e assim, medidas inovadoras tem tomado a frente na área de pesquisa (KRUG & ROCHA, 2016). Conforme estudos já realizados, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) pode ser um método alternativo para o preparo de amostras e posterior determinação de flúor e outros halogênios (COSTA et al., 2019). Dentre as técnicas analíticas para determinação de flúor em amostras, a cromatografia de íons (IC) se mostra com grande potencial, pois apresenta melhor sensibilidade quando comparada a outras técnicas de determinação como a potociometria por eletrodo íon-seletivo, e menor custo de operação, quando comparada às técnicas espectrométricas (MELLO et al., 2013; KRUG & ROCHA, 2016; MOURA, 2022). Assim, o objetivo deste estudo é desenvolver um método analítico adequado para a determinação de flúor em fígado animal.

2. METODOLOGIA

Inicialmente, para o desenvolvimento do método, uma amostra de fígado bovino foi adquirida no comércio local da cidade de Pelotas-RS. Em um primeiro momento, foi realizada a determinação do teor de umidade da amostra. Para isso, foram adicionados 3 g de amostra em cadrinhos de porcelana, com a massa previamente determinada, em estufa (Modelo 400/2ND, DeLeo, Brasil), os quais foram submetidos à secagem a 105 °C por um período de, aproximadamente, 24 horas. Após as amostras apresentarem massa constante, os cadrinhos foram pesados novamente e a massa de amostra seca foi relacionada com a massa inicial de amostra e o percentual de umidade foi determinado.

Para avaliar os parâmetros relacionados ao método de MIC, inicialmente, foram realizados testes de massa a fim de determinar a massa máxima possível de ser decomposta. Foram avaliadas as massas de 400 e 500 mg. Para tanto, a amostra foi pesada em uma balança analítica (Modelo AY220, Shimadzu, Philippines) sobre um filme de polietileno de baixa densidade (PEBD), fechada na forma de invólucro e selada com uma fonte de aquecimento. Para a decomposição das amostras, estas foram depositadas na base de suportes de quartzo, contendo um disco de papel filtro previamente umedecido com 50 µL da solução ignitora de NH₄NO₃. O suporte foi então inserido em frascos de quartzo contendo 6 mL da solução absorvedora e fechados com uma tampas de politetrafluoretíleno (PTFE), levados ao rotor e pressurizados com 20 bar de O₂. O rotor foi introduzido no forno micro-ondas (Modelo Multiwave 3000®, Anton Paar, Áustria) e submetido ao processo de irradiação.

Foram avaliadas diferentes soluções absorvedoras, com o intuito de identificar a solução que melhor absorve o analito durante o preparo de amostra. Assim, soluções de 100, 150 e 200 mmol L⁻¹ de NH₄OH foram avaliadas utilizando um ensaio de recuperação por adição de analito. O ensaio consiste na adição de uma concentração conhecida de flúor antes do processo de decomposição, a fim de identificar a influência do método de preparo de amostra. Para isso 400 mg de amostra de fígado bovino, previamente seca em estufa a 55 °C e moída em moinho de facas, foram pesadas sobre um filme de PEBD, e previamente ao fechamento do invólucro, se adicionou 20 µL de uma solução de 1000 mg L⁻¹ de fluoreto. Após o selamento dos invólucros, foi repetido o processo de MIC, como descrito anteriormente. O programa de radiação utilizado consistiu em 2 etapas: 1400 W por 5 min e 0 W por 20 min. As soluções obtidas após esse processo foram avolumadas a 25 mL e posteriormente armazenadas em tubos de polipropileno de 50 mL.

Adicionalmente, também foram avaliados nesse estudo, quatro processos (I, II, III e IV) de pré-tratamento da amostra, incluindo as etapas de secagem e moagem, tendo como objetivo a remoção da água e homogeneização da amostra sem a perda do analito durante esse processo. Para os procedimentos I, II e III, 5 g de amostra foram homogeneizadas, com adição de 0,5 mL de uma solução de F^- , em um moinho de facas (Modelo B55, Botini, Brasil). Os pré-tratamentos consistem em: I) secagem da amostra em estufa a 55 °C; II) secagem da amostra a 100 °C; III) lyophilização a -55 °C. Após o processo de secagem, as amostras foram moídas em moinho de facas. Para a condição de pré-tratamento IV, foram adicionados 75 μ L de uma solução de 20.000 mg L⁻¹ de fluoreto em 10 g de amostra por meio de uma seringa de 1 mL, em várias perfurações para que o fluoreto ficasse distribuído no interior da amostra evitando ao máximo as perdas e simulando melhor a distribuição de flúor na matrix, não sendo de forma superficial. Após, a amostra foi seca em estufa a 50 °C por, aproximadamente, 20 horas e moída em moinho de facas.

As soluções obtidas após o método de MIC foram filtradas, diluídas e analisadas em um cromatógrafo de íons (Modelo ICS-5000+, Dionex/Thermo Fischer Scientific, EUA) para a determinação de flúor total nas amostras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de umidade determinado na amostra foi de $70 \pm 2\%$. Esse resultado está de acordo com a literatura e foi utilizado para expressar corretamente as concentrações de flúor em massa seca de amostra (TACO, 2011).

Com relação ao teste de massa, foi observado que a decomposição de 500 mg de amostra apresentou resíduos no suporte e no tubo de quartzo ao final da combustão, o que indica uma combustão incompleta da amostra. Por outro lado, quando avaliado 400 mg, foi verificado que, após a combustão, uma solução límpida e livre de resíduos foi obtida, evidenciando que essa massa de amostra foi decomposta completamente. Assim, 400 mg de amostra foi escolhida como condição.

Para a avaliação da solução absorvedora, 100, 150 e 200 mmol L⁻¹ de NH₄OH foram utilizadas. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados do ensaio de recuperação utilizando diferentes soluções absorvedoras e 400 mg de amostra (média \pm desvio padrão, n=3).

Solução absorvedora	Recuperação (%)
NH ₄ OH 100 mmol L ⁻¹	97 \pm 4
NH ₄ OH 150 mmol L ⁻¹	102 \pm 8
NH ₄ OH 200 mmol L ⁻¹	92 \pm 8

Tendo em vista que os resultados não apresentaram diferença estatística (Teste t-Student, intervalo de confiança de 95%), foi escolhida a solução absorvedora com concentração intermediária (150 mmol L⁻¹) para os subsequentes estudos do método.

Para as condições de pré-tratamento, vale ressaltar que todos os processos de combustão foram realizados em triplicata. Com secagem na estufa a 55 °C, o melhor resultado obtido apresentou recuperação de 88%. Para a secagem na estufa a 100 °C,

observou-se uma queda na quantidade de analito recuperada (80%), o que indica que esta temperatura está muito elevada e pode estar ocorrendo perda de analito durante a etapa de secagem. Quando utilizada a liofilização, tentando evitar as perdas de analito por meio de altas temperaturas, a recuperação foi inferior quando comparada às demais formas de secagem avaliadas (65%). Após estes ensaios iniciais, o procedimento de pré-tratamento IV foi executado utilizando somente a solução absorvedora de 150 mmol L⁻¹ para decomposição via MIC, pois esta já havia sido escolhida como a solução absorvedora do método. Neste processo os resultados obtidos não foram adequados pois a recuperação do analito ainda não é satisfatória (65%).

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir por meio deste estudo que a MIC é um método eficaz para a decomposição de fígado animal e posterior determinação de flúor por IC. A massa de amostra a ser decomposta e a solução absorvedora que apresentaram melhor eficácia foram 400 mg e 150 mmol L⁻¹ de NH₄OH, respectivamente. As condições de pré-tratamento avaliadas até o momento não foram adequadas ao método, assim devem ser estudados outras condições de secagem das amostras a fim de evitar que ocorram perdas do analito.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. METROHM Pensalab. Cromatografia de íons. São paulo, 2014. Acessado em 24 de agosto de 2023. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/1060198/LOQ4001/Apresentacao%20Teoria%2020102014.pdf>
- CHOI, A. L., Sun, G., Zhang, Y., & Grandjean, P. *Developmental Fluoride Neurotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Environmental Health Perspectives*, 120(10), 1362–1368, 2012. doi:10.1289/ehp.1104912
- FUNASA. Manual de fluoretação da água para consumo humano. Ministério da saúde - Fundação Nacional de Saúde. Brasília, 2012.
- 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
- LEWIS, C. W. Fluoride. *Pediatrics in review*, Pittsburg, v44, n.9, p. 327-429, 2003.
- MCDONAGH, MS. *Revisão sistemática da fluoretação da água*. *BMJ*, 321(7265), 855–859,2000. doi:10.1136/bmj.321.7265.855
- MEIERS P. **The discovery of Fluoride and Fluorine**. Saarbruecken, Alemanha. Acessado em 03 de setembro de 2023. Disponível em: <http://www.fluoride-history.de/index.htm>
- MELLO, PA, Barin, JS, Duarte, FA et al. Métodos analíticos para determinação de halogênios em ciências bioanalíticas: uma revisão. *Anal Bioanal Chem* **405**, 7615–7642 (2013)
- MOURA, AV.; da Silva, JDS; Gubert, P. Cromatografia de Íons: Princípios e Instrumentação. Orbital: Elétron. J. Química.14, 110-115, 2022.
- SRIVASTAVA, S., FLORA, S. Flúor na Água Potável e Fluorose Esquelética: uma Revisão do Impacto Global. *Curr Envir Health Rpt* **7**, 140–146, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fluoride in Drinking-water. IWA publishing: London, England, 2006.
- TACO -Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4^a edição revisada e ampliada. UNICAMP. 2011.