

DETERMINAÇÃO DE FLÚOR TOTAL EM FÍGADO DE *Capreolus capreolus* E ANÁLISE ALVO DE PFAS UTILIZANDO LC-MS

THIAGO IOOST CALDEIRA¹; SYED HASSAN MUBJATA²; VIKTORIA MÜLLER³;
JÖRG FELDMANN⁴; JAN KOSSORECH⁵; MÁRCIA FOSTER MESKO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – thiagoicaldeira@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – hmujtaba1996@gmail.com

³University of Graz, Institute of Chemistry, Analytical Chemistry – joerg.feldmann@uni-graz.at

⁴University of Graz, Institute of Chemistry, Analytical Chemistry – viktoria.mueller@hutton.ac.uk

⁵Umweltbundesamt, German Environmental Specimen Bank, Berlin, Germany

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

1. INTRODUÇÃO

O fígado pode ser um órgão vulnerável ao acúmulo de diversos elementos, pois se trata de um órgão que está diretamente ativo na absorção e excreção de elementos no organismo de seres vivos, operando como um centro metabólico e desintoxicante (LALA et al., 2023). O uso prolongado de substâncias em concentrações acima do recomendado pode acarretar diversas doenças como câncer, hepatite e cirrose, que são responsáveis por aproximadamente 2 milhões de mortes por ano (DEVARBHAVI et al., 2023).

O flúor é considerado um elemento essencial nos dias de hoje, desde que foi implementado artificialmente no sistema de distribuição de água, desempenhando um papel importante na saúde bucal da população (PARNELL et al., 2009). Entretanto, o consumo excessivo desse elemento pode causar toxicidade e bioacumulação em seres vivos (MCDONAGH et al., 2000).

Os compostos perfluoroalquilados e polifluoroalquilados (PFAS) são uma classe de substâncias orgânicas sintéticas que ganharam bastante repercussão no meio científico nas últimas décadas, suas ligações C-F são extremamente fortes e estáveis, tornando-as muito resistentes à degradação e calor, o que acarreta na sua persistência no meio ambiente, potencial bioacumulação, toxicidade, e também aos possíveis efeitos adversos causados aos seres vivos (NG et al., 2025). Dentre esses compostos, existem duas classes muito importantes, os ácidos perfluoroalquil carboxílicos (PFCAs) e os ácidos perfluoroalquil sulfônicos (PFSA), em que estão contidos dois dos PFAS mais famosos, como o ácido perfluorooctanóico (PFOA) e o ácido perfluorooctanossulfônico (PFOS).

O objetivo deste estudo é realizar a determinação de flúor total no fígado de veados (*Capreolus capreolus*), coletados no *Bavarian Forest National Park* – Alemanha, no período de 1998 a 2022, utilizando a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) para o preparo de amostra, e a cromatografia de íons (IC) para determinação de flúor total. Também como a especiação de diferentes de PFAS utilizando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS), com o objetivo de verificar se a regulamentação imposta pela convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), que banuiu e restringiu o uso de alguns PFAS, e entrou em vigor no ano de 2004 (UNEP, 2023), contribuiu para a diminuição da concentração desses elementos na vida animal.

2. METODOLOGIA

As amostras foram cedidas pelo *Environmental Specimen Bank* – Alemanha (ESB). O ESB é um centro de armazenamento para amostras ambientais, em que

essas são amostradas, processadas e armazenadas de forma altamente padronizada para auxiliar na gestão química e ambiental, e mais detalhes sobre a amostragem podem ser obtidos no site (www.umweltprobenbank.de/en). Resumidamente, os fígados foram obtidos de veados (*capreolous capreolous*) capturados na *Bavarian Forest National Park* – Alemanha, com 1 ano de vida, sendo uma amostra por ano no período de 1998 a 2022. Os fígados foram liofilizados e armazenados em uma atmosfera inerte até análise (PFAS – realizado pelo grupo TESLA, Universidade de Graz, Áustria) ou até serem enviados para determinação de flúor total (realizado pelo grupo LCCBio, UFPEL, Pelotas, Brasil).

Para digestão das amostras para determinação de flúor total, 14 amostras foram selecionadas e, para isso, foi utilizada a MIC, destacando que todas as análises foram realizadas em triplicata. Para isso, 0,5 g de amostra seca foi pesado em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Japão) sobre um filme de polietileno e fechada na forma de invólucro. O invólucro foi colocado em um suporte de quartzo, que continha um disco de papel filtro umedecido com 50 μL da solução ignitora (NH_4NO_3 6 mol L^{-1}). O suporte foi inserido no frasco de quartzo contendo 6 mL da solução absorvedora de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 150 mmol L^{-1} , como otimizado por CALDEIRA (2024). O frasco foi fechado, preso ao rotor, pressurizado a 20 bar de O_2 e então levado ao forno de micro-ondas (Multiwave 5001, Anton Paar, Áustria). Como a concentração de flúor nas amostras era muito baixa, realizou-se uma queima sucessiva, em que mais 0,5 g da amostra foi decomposto utilizando a mesma solução absorvedora, totalizando 1 g de amostra e, conseqüentemente, melhorando assim os limites de detecção e quantificação.

Após a digestão, as amostras foram avolumadas a 15 mL e filtradas (Chromafil®Xtra PTFE-20/25, Macherey Nagel, Alemanha). Para determinação de flúor total, foi utilizado um cromatógrafo de íons (Modelo ICS-5000+, Dionex/Thermo Fischer Scientific, EUA) equipado com uma coluna de troca iônica (IonPac™ AG11-HC, 4 μm , 2 \times 50 mm, Dionex/Thermo Fisher Scientific), uma bomba supressora de ânions (Dionex ERS 500, 2 mm), um gerador de eluente (EGC 500 KOH) de forma gradiente, um amostrador automático (AS-AP) e um detector de condutividade.

Para análise alvo de PFAS, foi utilizado o processo de extração adaptado de (SCHRÖDER *et al.*, 2024). Resumidamente, 0,6 g de amostra seca foi pesada em um tubo de 50 mL, junto 15 μL de um padrão interno de PFAC-HIF-ES (16 a 125 $\mu\text{g L}^{-1}$), seguido de 10 mL de MeOH, onde foram agitadas em um vórtex, sonicadas por 15 min, e centrifugadas por 5 min, coletando-se o sobrenadante. A extração foi repetida 3 vezes, e o sobrenadante combinado foi seco por meio de um fluxo de gás N_2 . Posteriormente, as amostras foram reconstituídas em 1 mL de MeOH, sonicadas por mais 15 min, seguido de uma limpeza com 25 mg de carvão ativado. Por fim, as amostras foram agitadas em vórtex, centrifugadas por 5 min, transferidas para tubos de vidro e armazenadas a 4 °C até análise. Para determinação dos PFAS foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Agilent 1260 infinity II (Agilent Technologies, Alemanha) combinado com uma coluna C18 (BrownLee SPP 2,7 μm , 3 \times 100 mm, PerkinElmer, Inglaterra). O eluente utilizado foi A: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5 mmol L^{-1} em água ultrapura, e B: 100% ACN. Sendo um gradiente (eluente B) de 3 a 30% por 2 min, 30 a 60% por 12 min, 100% por 10 min, e retorna-se a condição inicial (97% A, 3% B) por 4 min, totalizando 28 min de corrida. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas (MS) Agilent Ultivo LC/TQ (Agilent Technologies, Alemanha). Para a avaliação do flúor orgânico extraível (EOF), foi utilizado o mesmo processo de extração supracitado, porém sem a adição do padrão PFAC-HIF-ES. Para a determinação, foi utilizado a

cromatografia de íons com combustão (Thermo-Mitsubishi Analytech CIC) (ARO *et al.*, 2021).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de flúor total foi feita em 14 amostras de fígado identificadas de F1 a F14. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração de flúor total nas amostras de fígado de *Capreolus capreolus* (media \pm desvio padrão, n=3).

Amostra	Média \pm desvio padrão ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Fígado 1	2,62 \pm 0,32
Fígado 2	3,63 \pm 0,36
Fígado 3	2,13 \pm 0,28
Fígado 4	1,20 \pm 0,08
Fígado 5	2,60 \pm 0,14
Fígado 6	2,50 \pm 0,25
Fígado 7	3,96 \pm 0,35
Fígado 8	2,97 \pm 0,22
Fígado 9	2,92 \pm 0,16
Fígado 10	5,91 \pm 0,43
Fígado 11	1,86 \pm 0,25
Fígado 12	1,86 \pm 0,10
Fígado 13	2,26 \pm 0,21
Fígado 14	2,62 \pm 0,17

É possível observar que as concentrações variam entre 1,20 e 5,91 $\mu\text{g g}^{-1}$ de flúor total (massa seca). Considerando que as amostras são de diferentes localidades e diferentes anos, consequentemente podem ter sido expostas em concentrações variadas de contaminantes fluorados, o que pode explicar essa variação. Os limites de detecção e quantificação para o método foram de 0,20 e 0,60 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, uma melhora significativa em relação aos obtidos por CALDEIRA (2024), que foram de 12 e 25 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente devido à maior disponibilidade de massa de amostra para decomposição, menor fator de diluição, e uma melhor performance da corrida cromatográfica.

Em relação às análises alvo de PFAS, destaca-se que das 30 espécies analisadas, somente 19 foram detectadas, sendo que o PFOS e outras 7 espécies foram detectadas em todas as amostras (n=28). O somatório das concentrações dos PFAS na análise alvo ($\Sigma\text{PFAS}_{\text{alvo}}$) variou de 8 a 64 ng g^{-1} , de forma que a concentração tende a diminuir ao decorrer dos anos (1998 – 2022). Foi observado também uma mudança nas espécies presentes nas amostras ao decorrer dos anos, uma vez que o ΣPFCA representou 28% do $\Sigma\text{PFAS}_{\text{alvo}}$ em 1998 e aumentou para 76% em 2022 nas amostras analisadas, enquanto o ΣPFSA diminuiu de 71% para 20% no final da série temporal. A razão para essa mudança foi a diminuição das concentrações dos PFSA, especialmente PFOS. O PFOS era responsável por 40% do $\Sigma\text{PFAS}_{\text{alvo}}$ entre os anos de 1998 e 2003, e nos anos de 2005 a 2016 ficou entre 11 e 34%, até que no ano de 2018, esses níveis caíram para <10%. Em contrapartida, com a diminuição e restrição do uso de certos PFAS, como o próprio PFOS e PFOA por suas altas toxicidades, consequentemente, observou-se um

aumento da presença de outras espécies, como por exemplo o ácido perfluorononanoico (PFNA) aumentando de 8% para 23% do $\Sigma\text{PFAS}_{\text{alvo}}$, e o ácido perfluoro-hexanossulfônico (PFHxS) aumentando de 1% para 7% do $\Sigma\text{PFAS}_{\text{alvo}}$. Com relação à concentração, o PFOS mostrou a maior diminuição entre os PFAS analisados, indo de 43 para 17 ng g^{-1} . A concentração de PFOA se manteve entre 2 e 3 ng g^{-1} , com exceção de apenas uma amostra do ano de 2002, que apresentou concentração de 8 ng g^{-1} . E dentre os PFAS analisados, o que mostrou maior aumento foi o PFNA, indo de 3 para 6 ng g^{-1} . As análises do EOF, demonstraram que o valor de flúor total nas amostras, foi de 30 a 160 vezes maior que o $\Sigma\text{PFAS}_{\text{target}}$ nos fígados correspondentes

4. CONCLUSÕES

Com base nas análises alvo, foi possível observar que a medida regulatória do PFOS contribuiu significativamente para sua redução ao longo do tempo. Porém, consequentemente, houve um aumento na concentração de outras espécies, como PFNA e PFHxA, provavelmente devido à substituição do uso desses compostos que estão banidos/regulamentados por espécies ainda sem regularização, o que clama por uma regulamentação mais adequada para os PFAS. Em relação à determinação de flúor total, o método foi capaz de quantificar adequadamente a concentração de flúor em todas as amostras, e a variação da concentração encontrada pode estar associada às diferentes localidades em que os animais se encontravam, assim como aos diferentes anos de coleta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARO, R.; ERIKSSON, U.; KÄRRMAN, A.; REBER, I.; YEUNG, L. W. Combustion ion chromatography for extractable organofluorine analysis. **Isience**, v.24, n.9, 2021.
- CALDEIRA, T.I. **Desenvolvimento de método para determinação de flúor em fígado animal**. 2024. Monografia de conclusão de curso – Universidade Federal de Pelotas.
- DEVARBHAVI, H.; ASRANI, S. K.; ARAB, J. P.; NARTEY, Y. A.; POSE, E., KAMATH, P. S. Global burden of liver disease: 2023 update. **Journal of hepatology**, v.79, n.2, p. 516-537, 2023
- LALA, V.; ZUBAIR, M.; MINTER, D. Liver function tests. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- MCDONAGH, M. S. Systematic review of water fluoridation. **BMJ**, v. 321, n. 7265, p. 855–859, 2000.
- NG, C. A.; HUNGERBÜHLER, K. Bioaccumulation of perfluorinated alkyl acids: observations and models. **Environmental science and technology**, v.48, n.9, p. 4637-4648, 2014.
- PARNELL, C.; WHELTON, H.; O'MULLANE, D. Water fluoridation. **European Archives of Pediatric Dentistry**, v.10, n.3, p. 141-148, 2009.
- Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP). **Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)**. 1-12 mai. 2023. Acessado em 14 ago. 2025. Disponível em: <https://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>.