

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO



**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLÚOR EM
FÍGADO ANIMAL**

THIAGO IOOST CALDEIRA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Capão do Leão, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLÚOR EM
FÍGADO ANIMAL**

THIAGO IOOST CALDEIRA

Monografia apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação da Prof^a. Dra. Márcia Foster Mesko e coorientação do Dr. Filipe Soares Rondan, como pré-requisito da obtenção do título de Bacharel em Química.

Capão do Leão, 2024

A COMISSÃO EXAMINADORA ABAIXO ASSINADA, APROVA A MONOGRAFIA DE
CONCLUSÃO DE CURSO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLÚOR EM
FÍGADO ANIMAL**

ELABORADA POR
THIAGO IOOST CALDEIRA

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Márcia Foster Mesko (CCQFA-UFPeI)

Prof^a. Dra. Adriane Medeiros Nunes (CCQFA-UFPeI)

Prof. Dr. Wiliam Boschetti (CCQFA-UFPeI)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pelotas, por me possibilitar cursar a graduação no curso de Bacharelado em Química.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro dado a mim e ao projeto coordenado pela Prof^a. Dr^a. **Márcia Foster Mesko**.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Márcia Foster Mesko** e meu co-orientador Dr. **Filipe Soares Rondan** por sempre se fazerem à disposição nos esclarecimentos necessários, também como, por todos os ensinamentos concedidos a mim nesse período de um ano que estive presente no Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais.

A Prof^a. Dr^a. **Adriane Medeiros Nunes** por participar como banca examinadora e pelas contribuições neste trabalho.

Ao Prof. Dr. **William Boschetti** pela participação como banca examinadora, e pela grande amizade construída durante meus últimos anos de graduação e pelas contribuições neste trabalho.

Aos demais integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, **Aline Simsen, Daniela Garcia, Fernanda Ballbinot, Gabriel Martins, Helena Domingues, Jenifer Heller, Julia Outeiro, Larissa Cristine, Lilian Fehlberg Maria Eduarda Kruger, Marianne Melo, e Thauana Herbele**, por todas as risadas e momentos compartilhados, pela amizade e pelo apoio durante todo o período de atividades no LCCBio.

Aos colegas de graduação **João “K” V. S. de Paulo, Emily G. Jorge e Priscila Pedrotti** por todos os inesquecíveis momentos que vivemos junto durante toda a graduação, pelas brincadeiras, risadas, e incontáveis momentos inconvenientes compartilhados que ficarão para sempre guardados entre nós.

A minha amiga e namorada **Chaiani Battisti**, por todo o carinho, amor, apoio e companheirismo que dividimos.

A todos os professores da UFPel que contribuíram para a minha formação acadêmica.

A minha mãe **Divane Souza loost** por toda paciência, apoio, incentivo e amor a mim concedido não somente durante a graduação, mas em toda a vida, e por sempre dar o seu melhor em toda ocasião ou circunstância.

Ao meu pai **Jorge Francisco Prietto Caldeira** por todos ensinamentos, momentos e amor compartilhado em vida, mesmo não estando presente nesse momento, sei que estaria muito orgulhoso da minha trajetória até aqui.

Agradeço também a todos os membros da minha família e amigos, que sempre me apoiaram e incentivaram durante toda a vida.

"Em meus jogos, às vezes encontrava uma combinação intuitivamente, simplesmente sentindo que deve estar lá. No entanto, eu não era capaz de traduzir meus processos de pensamento em linguagem humana normal."

Mikhail Tal.

Resumo

O flúor é um elemento químico de grande importância, cuja presença em excesso pode acarretar problemas de saúde. No presente trabalho foi desenvolvido um método para a determinação de flúor em fígado animal, pois este é um órgão vulnerável ao acúmulo desse elemento. O preparo da amostra foi uma etapa crucial e desafiadora da análise, sendo escolhido o método de combustão iniciada por micro-ondas (MIC) para decomposição da matriz. Parâmetros como a massa de amostra e a solução absorvedora foram avaliados por meio de ensaios de recuperação. As condições de pré-tratamento também foram avaliadas. A solução absorvedora de 150 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e massa de amostra de 400 mg se mostraram as condições mais adequadas dentre as avaliadas. Como condição de pré-tratamento, a liofilização demonstrou melhor eficiência como método de secagem, uma vez que, secagem em estufa ocasionou perdas do analito de até 25%. A determinação foi feita utilizando duas técnicas, a de potenciometria com eletrodo íon-seletivo (ISE) e a cromatografia de íons (IC). Os resultados obtidos por ambas as técnicas foram concordantes, não apresentando diferença estatística significativa (Teste *t-Student*, $p < 0,05$) entre si. Os limites de detecção para F utilizando as técnicas de IC e ISE foram de 2 e 3 mg kg⁻¹, respectivamente, e os limites de quantificação foram de 3 e 6 mg kg⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado para a análise de amostras de fígado de 10 ratos *Winstar*, divididos em dois grupos (n=5), sendo os animais do grupo I, tratados com administração de água ultrapura (grupo controle), e o grupo II tratado com 20 mg L⁻¹ de F por via oral. Tendo em vista as condições do método desenvolvido, foi possível determinar F em todas as amostras. Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que nos animais em que foi administrada a solução de F, uma maior concentração do elemento foi determinada, sendo a concentração de F no grupo tratado de $71,9 \pm 14,6$ mg kg⁻¹ e no grupo controle de $44,2 \pm 13,0$ mg kg⁻¹. Foi possível observar diferença estatística significativa (teste *t-Student*, $p < 0,05$) entre os grupos quando utilizada a técnica IC para determinação, visto que quando feita por ISE, obteve-se elevados valores de desvio padrão e desvio padrão relativo, indicando a maior precisão da técnica cromatográfica. Com isso é possível afirmar que o fígado é um local vulnerável ao acúmulo de flúor no organismo, quando feita a ingestão de doses de 20 mg kg⁻¹.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês, <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
$\text{Al}_2\text{SiO}_4\text{F}_2$	Topázio
CaF_2	Fluorita
EuF_2	Fluoreto de európio (II)
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IC	Cromatografia de íons (do inglês, <i>Ion Chromatography</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
Ir	Írídio
ISE	Eletrodo íon-seletivo
KCl	Cloreto de potássio
KHF_2	Bifluoreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LaF_3	Fluoreto de lantânio (III)
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantification</i>)
MAS	Espectrometria de absorção molecular (do inglês, <i>Molecular Absorption Spectroscopy</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
MIC	Combustão iniciada por micro-ondas (do inglês, <i>Microwave induced combustion</i>)
Na_3AlF_6	Criolita
NdF_3	Fluoreto de neodímio (III)
NaF	Fluoreto de sódio
PA	Pureza analítica

LDPE	Polietileno de baixa densidade (do inglês, <i>Low density polyethylen</i>)
PTFE	Politetrafluoretileno (do inglês, <i>Polytetrafluoroethylene</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
TISAB	Solução de ajuste da força iônica (do inglês, <i>Total ionic strength adjustment buffer</i>)
UV-VIS	Ultravioleta-visível

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente do eluente utilizado no cromatógrafo de íons durante a determinação de fluoreto nas amostras	38
Tabela 2. Resultados do ensaio de recuperação de fluoreto utilizando diferentes condições de pré-tratamento (média ± desvio padrão, n=3).....	41
Tabela 3. Resultados do ensaio de recuperação de fluoreto utilizando diferentes soluções absorvedoras e 400 mg de amostra (média ± desvio padrão, n=3).....	43
Tabela 4. Resultado das concentrações de flúor (mg kg^{-1}) nas amostras do grupo controle e tratado (média ± desvio padrão, n=3).....	46
Tabela 5. Resultado das concentrações de flúor (mg kg^{-1}) nos grupos controle e tratado (média ± desvio padrão, n=3).....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tubo de quartzo e suporte utilizados na MIC.....	22
Figura 2. Componentes do sistema de um cromatógrafo de íons.....	27
Figura 3. Frascos de quartzo após a queima da amostra com (a) 100 a 400 e (b) 500 mg.....	42

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Flúor: aspectos gerais e presença no organismo humano.....	17
3.2 Métodos de preparo de amostra	20
3.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas.....	21
3.3 Técnicas para a determinação de flúor	24
3.3.1 Eletrodo íon-seletivo (ISE)	25
3.3.2 Cromatografia de íons (IC)	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Instrumentação	29
4.3 Amostras.....	33
4.4 Teor de umidade.....	34
4.5 Avaliação da influência do pré-tratamento, utilizando o fígado bovino para decomposição por MIC	35
4.6 Otimização dos parâmetros da MIC.....	36
4.6.1 Ensaio de massa	36
4.6.2 Avaliação da solução absorvedora	36
4.7 Avaliação da exatidão do método	39
4.8 Determinação da concentração de fluoreto por IC.....	37
4.9 Determinação da concentração de fluoreto por ISE.....	38
4.10 Limites de detecção e quantificação.	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1 Teor de umidade	40
5.2 Avaliação da influência do pré-tratamento para posterior decomposição por MIC	40
5.3 Parâmetros da MIC	42
5.3.1 Ensaio de massa	42
5.3.2 Avaliação da solução absorvedora	43
5.4 Avaliação da exatidão do método	45
5.5 Brancos, limites de detecção e quantificação	44
5.6 Aplicação do método.....	46
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O flúor está presente na água potável, tanto de forma natural como artificial, e sua adição é feita pelas companhias de distribuição de água, tornando esta a maior fonte de ingestão deste elemento pelos seres vivos (Lewis e Milgrom, 2003). O processo de fluoretação consiste na adição controlada de um composto de flúor na água distribuída à população, com a finalidade de elevar sua concentração até um determinado valor, estabelecido como efetivo na prevenção da cárie dentária, remineralização do esmalte dentário e efeitos antibactericidas para a saúde bucal (OMS, 2006).

Apesar dos benefícios comprovados do flúor na aplicação odontológica, diversos estudos realizados mostram que sua ingestão crônica causa um acúmulo metabólico deste elemento no indivíduo (Mcdonagh *et al.*, 2000). Esse acúmulo causa toxicidade ao organismo, principalmente quando há o consumo com os níveis de flúor na água acima do recomendado pelos órgãos de fiscalização (máximo de 1,2 mg L⁻¹ para uma temperatura ambiente de 20 °C e limite recomendado é de 0,9 mg L⁻¹ (Brasil, 2012).

O processo de metabolismo do flúor tem uma dependência direta com o pH do meio em que este se encontra, fragmentado a partir de uma dissociação iônica ao entrar em contato com o ácido gástrico presente no estômago, sendo convertido em HF, onde ocorre a maior parte de sua absorção (Buzalaf e Witford, 2011). A maior concentração de flúor no organismo ocorre nos ossos e nos dentes, porém este elemento também está presente, em menor quantidade, nos tecidos moles como fígado, rins e também no sangue (OMS, 2006; Ludlow, *et al.*, 2007; Buzalaf e Witford, 2011).

Estudos recentes demonstraram que, através da administração crônica de flúor por ratos de laboratório, é possível compreender como e onde o flúor pode se acumular no organismo (Witford, 1994; Inkielewicz e Krechniak, 2003; Tsunoda *et al.*, 2005; Adachi *et al.* 2007; Pereira, 2011). O consumo excessivo de flúor está diretamente ligado a casos de fluorose dentária e fluorose esquelética (Srivastava & Flora, 2020), assim como doenças hepáticas e renais. Estudos também têm

relacionado o acúmulo desse elemento com neurotoxicidade, causando sintomas como déficit de memória e de aprendizado, em animais experimentais (Choi *et al.*, 2012). Dessa forma, é necessário que haja um método de preparo adequado para determinação de flúor nesses tecidos, pois nenhum método de preparo de amostra pode ser considerado universal, estando diretamente relacionado com a matriz da amostra, o analito que se deseja determinar e mais importante, a técnica utilizada para análise. Cada tipo de amostra exige um preparo diferente, e é assim que surge a demanda de desenvolvimento de novos métodos e estratégias para este quesito. Os métodos clássicos e oficiais se encontram ultrapassados e, com isso, medidas inovadoras têm tomado a frente na área de pesquisa (Krug & Rocha, 2016). A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) pode ser um método adequado para o preparo de amostras e posterior determinação de flúor e outros halogênios (Flores, 2008; Costa, 2019; Mesko, 2019). Dentre as técnicas analíticas para determinação de flúor em amostras, a cromatografia de íons (IC) se mostra com grande potencial, pois apresenta maior sensibilidade e reprodutibilidade quando comparada à técnica de determinação de potenciometria por eletrodo íon-seletivo (ISE), e menor custo de operação, quando comparada às técnicas espectrométricas (Mello *et al.*, 2013; Krug e Rocha, 2016). Desta forma torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de um método adequado para a determinação de flúor em fígado animal, possibilitando futuramente avanços nos estudos referentes aos efeitos desse elemento e suas espécies em organismos vivos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para avaliar a presença de flúor em fígado animal, tendo como método de preparo de amostra a combustão iniciada por micro-ondas e utilizando diferentes técnicas de determinação.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o teor de umidade da amostra;
- Avaliar a etapa de pré-tratamento nas amostras utilizando-se de diferentes processos e condições de secagem;
- Avaliar a massa de amostra a ser decomposta;
- Avaliar a solução absorvedora para F;
- Avaliar a exatidão do método de preparo de amostra via MIC por meio de um ensaio de recuperação;
- Avaliar as técnicas de eletrodo íon-seletivo e cromatografia de íons para determinação de F;
- Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras de fígado de ratos cronicamente tratados com flúor, buscando identificar se este elemento apresenta efeito dose-resposta acumulativo no organismo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Flúor: aspectos gerais e presença no organismo humano

O flúor é um elemento conhecido por em muitas de suas formas ser altamente reativo, corrosivo e tóxico. Ele é o elemento mais eletronegativo e se encontra no grupo 17 da tabela periódica, tendo 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 ($\text{Al}_2\text{SiO}_4\text{F}_2$). Também está presente no solo, em fontes de água naturais e plantas (Meiers, 2023).

Muitos pesquisadores tentaram isolar o flúor em sua forma elementar (F_2) entre os séculos XVI e XIX, mas sem sucesso, e acabaram sofrendo intoxicação e as severas consequências que este elemento pode causar, encurtando drasticamente o tempo de suas vidas e levando-os à morte prematura (Peixoto, 1998; Toon, 2011). Foi somente em 1886 que o químico francês Ferdinand Frederic Henri Moissan conseguiu isolar o elemento. O experimento foi realizado pela eletrólise de uma solução de KHF_2 em HF anidro, utilizando eletrodos de Pt e Ir em um tubo em forma de U selado nas duas extremidades com fluorespato; resultando no gás flúor. Por esse feito e pelo desenvolvimento do primeiro forno elétrico, em 1906, Moissan recebeu o Prêmio Nobel de Química (Peixoto, 1998; Okazoe, 2009).

A partir do século XX, notou-se no meio científico que a população residente em regiões que possuíam água natural com maiores concentrações de flúor em sua composição apresentava menos casos de cárie dentária. Com isso, em 1945, o estado de Michigan, nos Estados Unidos, passou a distribuir água fluoretada artificialmente para sua população (Andrade, 2015). No Brasil, a implementação da fluoretação da água potável chegou logo em seguida, em 1953, e já no ano de 1974, esse processo se tornou obrigatório por meio da lei federal nº 6050 (Brasil, 1974). A lei define que o valor da concentração de flúor na água potável deve variar entre 0,6 e 1,7 mg L^{-1} dependendo da localidade e de suas temperaturas, destacando também que o valor

máximo de flúor permitido pela OMS é de 1,5 mg L⁻¹ (OMS, 2006; FUNASA, 2012; Frazão e Narvai, 2017).

O flúor vem sendo amplamente utilizado no ramo da odontologia desde o século passado, primordialmente para a prevenção e o tratamento de cáries dentárias. Isso se deve ao fato de o íon fluoreto provir um excelente mecanismo de defesa aos dentes, uma vez que esse atua na inibição dos ácidos formados pelas bactérias causadoras da cárie dentária e no enriquecimento da mineralização dentária (Lewis e Milgrom, 2003). Apesar de ser considerado um elemento essencial, nos últimos anos muitos estudos têm tido interesse em avaliar e analisar seus efeitos tóxicos e a forma como eles podem afetar o organismo humano (Choi *et al.*, 2012; Srivastava e Flora, 2020; Aneez *et al.*, 2022). Foi avaliado em diversos estudos *in vivo* que a longa exposição a elevadas taxas de fluoreto podem causar toxicidade e também o desenvolvimento da fluorose dentária e da fluorose esquelética (Witford, 1994; Lewis e Milgrom, 2003; Barbier *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2012; Bashash *et al.*, 2017), assim como danos na estrutura e funcionamento de órgãos e da medula espinhal, podendo causar também doenças hepáticas e renais, bem como a neurotoxicidade, que causa perda de memória e déficit de aprendizagem (Xiong *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2012).

A fluorose dentária é uma doença que se desenvolve de forma muito mais severa em crianças do que em adultos, pois elas estão mais suscetíveis ao acúmulo desse elemento (OMS, 2006). Essa condição é identificada visualmente pela presença de manchas nos dentes (como uma espécie de corrosão), que podem ser sutis ou mais marcantes, dependendo diretamente do quanto elevado está o consumo de flúor pelo indivíduo (OMS, 2006; Srivastava, 2020). A gravidade das lesões aumenta proporcionalmente ao aumento de flúor ingerido. Por outro lado, a fluorose esquelética é uma condição fisiopatológica também causada pelo consumo crônico excessivo de flúor e sua acumulação nos ossos. Essa condição causa sintomas como dor articular crônica, rigidez articular, dor esporádica, calcificação de ligamentos e osteosclorose (Srivastava, 2020).

Como mostrado no estudo de Wang e Li (2002), o fígado é um sítio muito vulnerável ao acúmulo e intoxicação de flúor, assim como os rins, que juntos são

responsáveis por cerca de 50 a 80% da excreção de flúor do organismo. Com isso, diversos trabalhos, como artigos, dissertações e teses, foram realizados com base na administração crônica de fluoreto na água potável de animais (majoritariamente ratos) visando estudar esses efeitos em seus organismos (Witford, 1994; Inkielewicz e Krechniak, 2003; Adachi *et al.* 2007 Pereira, 2011). Como os tecidos biológicos são considerados matrizes complexas, dificilmente poderá ser feita uma análise direta desses materiais, sendo geralmente necessário que haja uma etapa de preparo de amostra antes da determinação.

3.2 Métodos de preparo de amostra

O preparo da amostra é considerado como uma das etapas mais importantes e mais desafiadoras da sequência analítica, tendo a função de converter matrizes de amostras de diversas origens em uma solução contendo os analitos de forma representativa, que poderá ser avaliada por diferentes técnicas de determinação, dependendo dos elementos que se deseja quantificar (Krug & Rocha, 2016). As amostras biológicas muitas vezes são consideradas matrizes complexas, pois têm a presença de proteínas, lipídios, compostos orgânicos e inorgânicos, ácidos e bases que agem como interferentes e mascaram a presença de alguns analitos, dificultando sua determinação (Niu *et al.*, 2018). Diante disso, é importante sempre ser levada em consideração para a escolha do método de preparo a origem da amostra, os analitos e sua concentração na amostra, e o equipamento instrumental de análise adequado para determinação dos analitos.

Alguns métodos de preparo de amostras biológicas foram propostos no decorrer dos anos, como: a destilação de Willard e Winter (Willard e Winter, 1933); digestão ácida (via úmida) (Rocha *et al.*, 2013); pirolise (Schnetger e Muramatsu, 1996); difusão facilitada (Taves, 1968); e métodos de combustão, como combustão em forno tipo mufla, em tubo de combustão, em bomba de combustão, em frasco de Schöniger (Krug & Rocha, 2016) e combustão iniciada por micro-ondas (MIC) (Flores, 2004). Alguns métodos de digestão, apesar de serem mais simples e baratos, não são adequados pois utilizam ácidos para decompor a matéria orgânica da amostra, e o meio ácido favorece a formação de compostos voláteis de flúor, como F_2 e HF. Um dos principais métodos de preparo reportados na literatura é o de difusão facilitada, proposto por Taves em 1968 (Whitford, 1996) porém este é um método moroso e ultrapassado, além de utilizar de ácidos fortes para extração de F. Assim novos métodos de preparo de amostra têm tomado a frente na área de pesquisa, como por exemplo o de combustão iniciada por micro-ondas.

3.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas

Segundo Mesko (2008), “a combustão iniciada por micro-ondas foi desenvolvida a fim de incorporar as vantagens da decomposição por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas e da combustão em sistemas fechados”.

Esse método baseia-se na decomposição da matéria orgânica presente na amostra por meio de um processo de combustão que ocorre no interior de frascos pressurizados com oxigênio (Flores *et al.*, 2008; Krug & Rocha, 2016). Nesse processo, todos os analitos são retidos em uma solução absorvedora, essa geralmente diluída. Dessa forma, esse método tem um menor gasto de reagentes e utiliza de uma fonte de energia limpa, o que vai ao encontro de alguns dos princípios da química analítica verde (Nowak, 2021). O sistema consiste em um forno micro-ondas, frascos de quartzo, suporte de quartzo e tampas de politetrafluoretileno (PTFE). Também pode ser utilizada uma etapa de refluxo com um suporte de quartzo adaptado, a fim de melhorar ainda mais a eficiência de extração dos analitos. O sistema de refluxo consiste na volatilização da solução absorvedora durante o aquecimento, que ao entrar em contato com as paredes frias da parte superior dos frascos, condensa, e junto de um suporte adaptado é possível que “lave” por refluxo o suporte onde foi feita a queima da amostra, otimizando a recuperação dos analitos. Na Figura 1 é possível observar os componentes utilizados para o método de MIC.

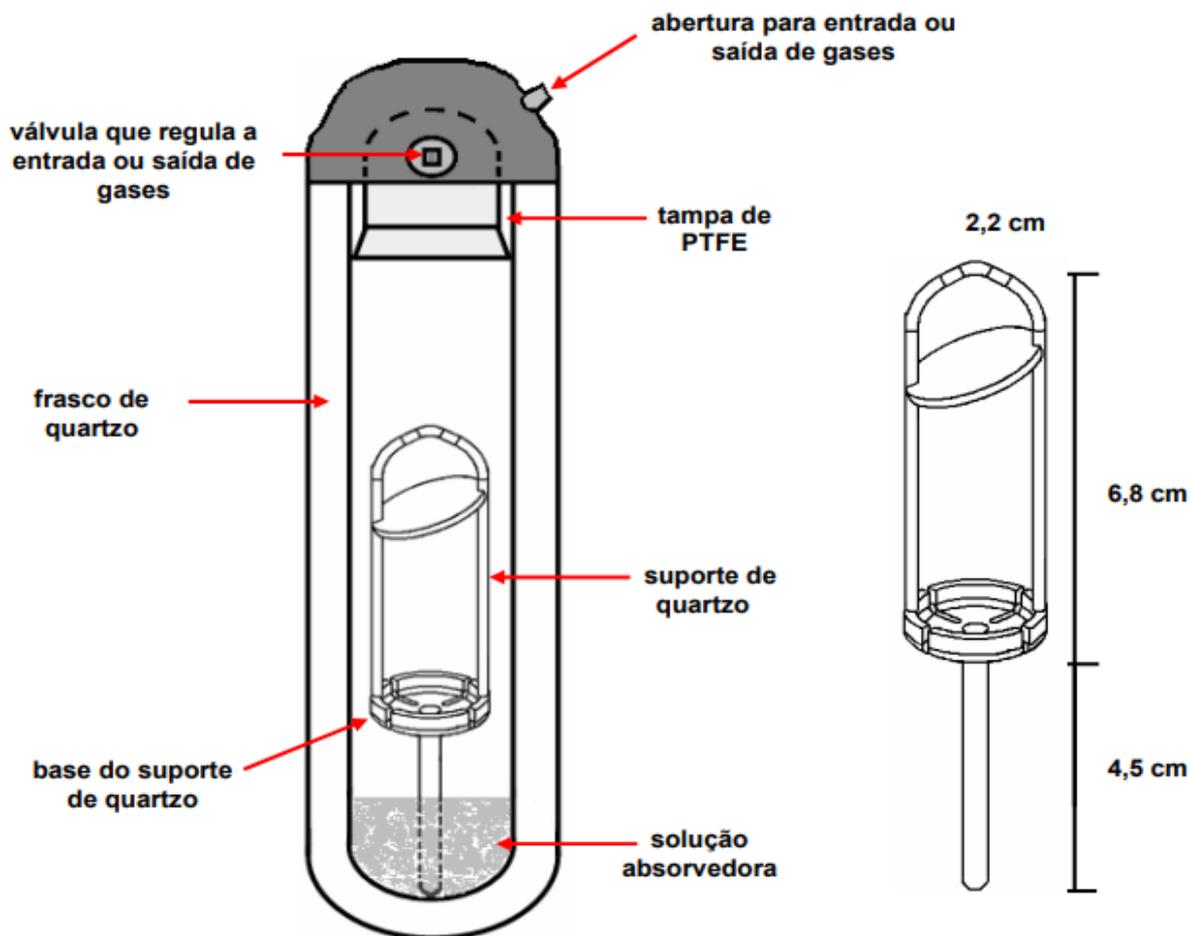


Figura 1: Tubo e suporte de quartzo utilizados na MIC (Mesko, 2008).

Para esse método, a amostra é pesada e disposta na forma de comprimido ou invólucro (filme de polietileno selado com fonte de calor) no suporte sobre um disco de papel filtro umedecido com 50 μL de uma solução ignitora de nitrato de amônio (6 mol L^{-1}). O tubo é então fechado com uma tampa de PTFE, levado ao rotor e pressurizado a 20 bar com oxigênio molecular (O_2) e, depois, inserido no forno de micro-ondas. Vale destacar que até 8 frascos podem ser dispostos simultaneamente no interior do forno, o que aumenta consideravelmente a eficiência energética no processo e diminui o tempo gasto na etapa de preparo de amostra (Barin *et al.*, 2006; Mesko, 2008).

Visando à posterior determinação de halogênios, a principal preocupação para o preparo de amostra são as perdas de analitos voláteis, com isso, a MIC se mostra

um método eficiente para o preparo de amostra e posterior determinação dos analitos em concentrações em nível traço, pois se trata de um sistema fechado em que as perdas serão mínimas ou nulas (Flores *et al.*, 2004). Dentre as diversas outras vantagens apresentadas pelo método de MIC, quando comparado a outros métodos de preparo previamente citados, pode-se observar uma alta eficiência e rendimento, menor risco de contaminação, obtenção de baixos valores de brancos e de limites de detecção e quantificação (LoDs e LoQs), menor (ou nenhuma) perda de elementos voláteis, maior segurança no processo e uma solução final compatível com diversas técnicas de determinação (Flores *et al.*, 2008; Mesko *et al.*, 2014; Krug & Rocha, 2016). Todavia, estudos para avaliar a melhor forma de introdução da amostra no sistema, a escolha da solução absorvedora mais adequada para reter o analito a técnica de determinação necessária.

No Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, situado na Universidade Federal de Pelotas, onde o presente estudo foi desenvolvido, o método de MIC vem sendo utilizado pelo grupo de pesquisa desde 2010, majoritariamente para decomposição de variadas matrizes de amostras orgânicas, incluindo matrizes biológicas e posterior determinação de halogênios, por diferentes técnicas de determinação (Pires *et al.* 2013; Mesko *et al.* 2015; Coelho Junior *et al.*, 2017; Rondan *et al.* 2018 Novo *et al.*, 2019).

3.3 Técnicas para a determinação de flúor

Com o aumento dos estudos em relação aos potenciais efeitos tóxicos do flúor em concentrações elevadas e, conseqüentemente, aumento da preocupação com os níveis deste elemento em água, alimentos e fontes de absorção inerentes a animais e seres humanos, diversas técnicas para a detecção e quantificação de fluoreto foram desenvolvidas e vêm sendo aplicadas ao decorrer dos anos (Yahyavi, Kaykhali e Mirmoghaddam, 2015; Dhillon e Kumar, 2016). A técnica mais utilizada atualmente para quantificação de flúor é a de potenciometria com eletrodo íon-seletivo (ISE). Também são reportados o uso de técnicas espectrométricas, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção atômica (AAS) e espectrometria de absorção molecular (MAS) e fluorescência de raios X (XRF), porém como o flúor é um elemento de difícil ionização, o uso dessas técnicas acaba sendo limitado pela baixa sensibilidade quando comparado as técnicas mais utilizadas (Dhillon e Kumar 2016).

As técnicas cromatográficas, onde se destaca especificamente a de cromatografia iônica (IC), ganharam espaço na determinação de fluoreto devido a melhores sensibilidades em comparação à ISE. Novos métodos de preparo de amostra cada vez mais eficientes foram desenvolvidos no decorrer da história, e estes são capazes de disponibilizar os analitos de uma amostra de matriz complexa em uma solução compatível com diversos equipamentos instrumentais mais modernos, o que potencializa ainda mais a utilização da cromatografia de íons na determinação de flúor e halogênios (Yahyavi, Kaykhali e Mirmoghaddam, 2015; Mesko *et al.*, 2019).

3.3.1 Eletrodo Íon-seletivo (ISE)

Em 1966 Frant e Ross desenvolveram e construíram o primeiro eletrodo íon seletivo de flúor. A construção do eletrodo se deu basicamente da modificação de um eletrodo de pH, em que na membrana de leitura foi adicionado um cristal fabricado de elementos de terras raras, como LaF_3 , NdF_3 ou EuF_2 , e a solução de preenchimento utilizada foi uma mistura de NaF e KCl, ambas em concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Frant & Ross, 1966). A técnica de ISE é muito utilizada para a determinação de flúor, cloro, bromo e iodo com limites de detecção e quantificação aceitáveis para diversos tipos de amostra (Arnold e Meyerhoff, 1984). As principais vantagens dessa técnica são o seu baixo custo operacional, prática e de fácil operação. Em contraproposta, suas desvantagens também são muitas, como mudanças mínimas de temperatura e correntes de ar que podem afetar a leitura, presença de íons interferentes complexantes de fluoreto (principalmente OH^-), baixa reprodutibilidade dos resultados devido a alterações superficiais do sensor em uma exposição contínua a amostras reais e difícil estabilidade de leitura, causando resultados não representativos da amostra (De Marco, Clarcke e Pejicic, 2007; Dhillon, 2016).

As medidas realizadas com o equipamento geram um sinal que é dado em milivolts (mV) e se baseiam na diferença de potencial das cargas presentes dentro do eletrodo referência seletivo e do eletrodo de leitura imerso na solução a ser medida de concentração desconhecida (Fernandes *et al.*, 2001). A diferença de potencial ocorre diretamente na membrana cristalina do eletrodo, que fica na interface entre a solução de preenchimento e solução de concentração desconhecida que, com a passagem da corrente elétrica, gera um sinal no equipamento. Essa diferença é chamada de potencial de difusão (Orlando, 2019). No caso específico para flúor, para eliminação de interferentes de íons metálicos, deve-se adicionar à solução desconhecida uma alíquota de solução tampão de ajuste de força iônica (TISAB) para realizar a leitura com maior precisão (Solsky, 1990; Skoog, 2014). Conforme Orlando *et al.* (2019), o desbalanço de cargas é o resultado da diferença de atividades dos íons F^- na solução interna e na solução externa. Assim, com a construção de uma curva de calibração, pode-se determinar a concentração de fluoreto e de diversos elementos iônicos a partir dessa técnica (Skoog, 2014; Solsky, 1990).

3.3.2 Cromatografia de Íons (IC)

Dentre as técnicas cromatográficas, a cromatografia de íons é sem dúvidas a mais utilizada para determinação de fluoreto (Sawant *et al.*, 2013; Yiping e Caiyun, 2010). Essa técnica pode detectar e quantificar espécies iônicas a nível traço com uma grande confiabilidade e reprodutibilidade (Vasconcelos *et al.*, 1994, Moura, 2022). O instrumento para cromatografia iônica, fundamenta-se na separação de elementos por interações iônicas dos analitos com a fase estacionária e a fase móvel esse mecanismo é conhecido como troca iônica (Collins, 2006). As suas principais vantagens são simplicidade e facilidade de operação; alta estabilidade, confiabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade; e baixos LODs e LOQs. Em contrapartida, suas principais desvantagens são o custo elevado de operação e a difícil interpretação de alguns cromatogramas devido à presença de interferentes para elementos em geral (como ácidos carboxílicos) (Yahyavi *et al.*, 2015).

No mecanismo de troca iônica, tem-se solutos com carga inversa à carga da fase estacionária, que é altamente carregada e retém os analitos seletivamente adsorvidos em sua superfície. Os analitos, então, serão posteriormente eluidos pela fase móvel do sistema por deslocamento de outros íons que possuam maiores forças de interação com a resina presente na fase estacionária (Collins, 2006). O sistema de cromatografia de íons requer os seguintes componentes: i) eluente, que será o responsável pelo transporte e separações dos elementos da amostra pelo sistema; ii) bomba de alta pressão, que irá garantir uma vazão do eluente constante durante todo o processo — essa bomba pode operar em modo isocrático ou gradiente; iii) válvula de injeção, responsável por injetar a alíquota de amostra ao sistema; iv) coluna, que é a parte principal do cromatógrafo, em que ocorre a separação dos íons da amostra propriamente dita — a coluna iônica geralmente é fabricada de materiais poliméricos (resinas); v) pode também conter uma coluna supressora, que tem como objetivo eliminar os sinais provenientes da fase móvel e interferentes da amostra, diminuindo a linha base de leitura e, conseqüentemente, permitindo uma detecção de concentrações mais baixas de analitos; vi) detector, componente que possui tipos diferentes de leitura, os de detecção eletroquímica (condutividade,

amperométrica e potenciométrica) e os de detecção óptica (UV-Vis, fluorescência e índice de refração) sendo o de condutividade o mais utilizado para determinação de F^- . Um esquema de um cromatógrafo de íons contendo os principais componentes pode ser observado na Figura 2 (Metrohm, 2014). O detector condutométrico provém a medida da condutividade elétrica dos íons de uma solução, em que a condutividade é dada pela medida de uma corrente alternada aplicada nos eletrodos da célula. Essa condutividade é dada na unidade de $\mu S/cm$ (Collins, 2006; Metrohm, 2014; Moura 2022).

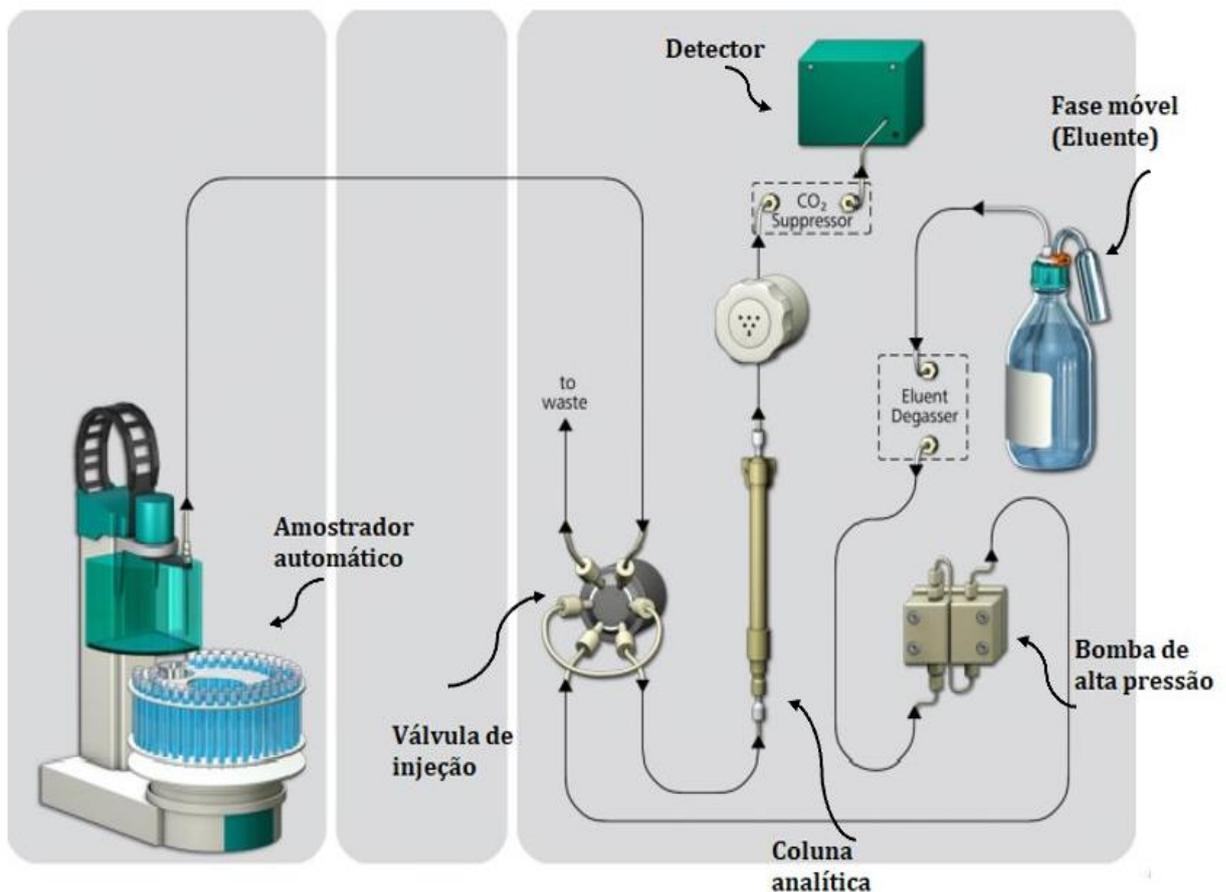


Figura 2: Componentes do sistema de cromatografia de íons (Metrohm, 2014).

A cromatografia de íons possui diversas aplicações analíticas, tanto industriais quanto na área de pesquisa científica, tais como: análise de águas (potável, de rios, de chuva, do mar, etc.), análise de efluentes (industriais e esgotos), controle ambiental (solo e ar) e indústrias de fertilizantes, farmacêutica, de alimentos e petroquímica (Collins, 2006; Moura, 2022). Essa ainda é uma técnica multielementar, sendo capaz

de quantificar vários analitos simultaneamente. Todavia, uma das grandes limitações dessa técnica é a compatibilidade com os digeridos provenientes dos métodos de preparo de amostra (Yahyavi *et al.*, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

Uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Philippines) com resolução de 0,0001 g e faixa de trabalho de 0,01-220g foi utilizada para pesagem de amostras e reagentes. Um processador de alimentos (modelo Multi Pro All in One 2, Philco, Brasil), um moinho de facas (modelo B55, Botini, Brasil), uma estufa convencional (modelo 400/2ND, De Leo, Brasil) e um liofilizador (modelo L101 Liobras, Brasil) foram usados nas moagens e secagem das amostras, respectivamente. Vidrarias, e materiais gerais de laboratório, também foram usadas nos processos de moagem, secagem e manuseio de amostras, sempre descontaminadas com álcool etílico bidestilado e água ultrapura.

No preparo de amostra via MIC foi realizado utilizando um forno micro-ondas industrial (modelo Multiwave 3000®, Anton Paar, Austria). Esse sistema é equipado com oito tubos de quartzo (volume interno de 80 mL) com uma pressão interna máxima de 80 bar e temperatura de 280 °C. A potência máxima do forno micro-ondas é de 1400W.

Para a determinação das concentrações de fluoreto nas amostras, foi utilizado um cromatógrafo de íons (modelo ICS-5000+, Dionex/Thermo Fischer Scientific, EUA), equipado com um detector de condutividade, uma coluna analítica de troca iônica IonPac AS11-HC (4 µm, 2 x 250 mm) e uma coluna de guarda IonPac AG11-HC (4 µm, 2 x 50 mm) com uma temperatura controlada de 36 °C. Uma fonte de eluente EGC 500 KOH, com uma coluna regeneradora por aprisionamento de ânions (CR-ATC), e um amostrador automático AS-AP foram utilizados para a injeção das amostras no equipamento. O eluente utilizado foi o hidróxido de potássio, com um gradiente de 1 a 90 mmol L⁻¹ e uma vazão de 0,280 mL min⁻¹; o volume coletado de amostra para análise foi de 50 µL. Após a decomposição das amostras via MIC, uma etapa de filtração utilizando microfiltros (Chromafil®Xtra PTFE-20/25, Macherey-Nagel, Alemanha) de politetrafluoroetileno (PTFE) com poros de diâmetros de 22 µm foi realizada previamente à inserção das amostras no IC.

Para a determinação por ISE, foi utilizado um potenciômetro (Hanna® HI 3221, Romênia), equipado com um eletrodo íon seletivo para fluoreto (HI 4110, USA).

4.2 Reagentes

A água ultrapura (18.2 M Ω cm), utilizada em todas as etapas experimentais e de diluições, origina-se de um sistema de purificação Milli-Q (modelo Simplicity® UV, Millipore, Merck KGaA, Alemanha). Todos os reagentes utilizados neste estudo são de grau de pureza analítica (PA) ou maiores. As soluções absorvedoras utilizadas neste estudo foram preparadas a partir de uma solução de NH₄OH (14 mol L⁻¹) e a de (NH₄)₂CO₃ através a dissolução do respectivo sal em água (Merck, Alemanha) em água ultrapura. Nitrato de amônio, que é usado como solução ignitora no processo, foi preparado pela diluição do seu respectivo sal (Merck, Alemanha) em água ultrapura. Oxigênio molecular com uma pureza de 99,5% (Oxigeo, Brasil) foi utilizado para a pressurização dos frascos durante o método de MIC.

Pequenos discos de papel filtro de baixo teor de cinzas (Qualy, J Prolab, Brazil) foram utilizados para suportar a solução ignitora no processo de combustão. Para o preparo dos invólucros, foram utilizados filmes de polietileno de baixa densidade (LDPE) cortados em dimensões de 8 x 8 cm. Para a descontaminação dos discos de papel filtro e dos filmes de LDPE, foi utilizado um banho ultrassônico (modelo USC1800 A, Unique, 40 kHz, 155 W, Brasil) onde os materiais a serem descontaminados foram depositados em um Becker preenchido com álcool etílico bidestilado e levado ao banho ultrassônico por 20 min, e posteriormente os materiais foram lavados com água ultrapura e seco em estufa em baixa temperatura.

Soluções padrão de F⁻ de 1000 e 20000 mg L⁻¹ foram preparadas a partir da dissolução de NaF (Merck, Alemanha) em água ultrapura. Os padrões de calibração utilizados na IC e ISE e os spikes utilizados nos ensaios de recuperação foram preparados a partir da diluição da solução padrão de F⁻.

A descontaminação dos frascos e suportes de quartzo utilizados no sistema MIC ocorre em duas etapas: descontaminação ácida e descontaminação com água ultrapura. Utiliza-se 6 mL de ácido nítrico concentrado (14 mol L⁻¹) (Merck, Alemanha) na primeira etapa e 6 mL de água ultrapura na segunda etapa. O programa de

radiação para as duas etapas foi o seguinte: i) irradiação de 1000 W por 10 min; ii) resfriamento (0 W) por 20 min.

4.3 Amostras

Foram utilizados ratos machos *Wistar* (70 dias), os quais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 42067-2019). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental no Biotério Central sob condições adequadas, como temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso livre à ração padrão e água ultrapura.

Foram utilizados dez ratos machos *Wistar*, os quais foram divididos em dois grupos experimentais (n= 05 animais cada grupo): Grupo I – Controle e Grupo II - Flúor (20 mg kg^{-1}). A solução de flúor foi preparada diluindo o sal de NaF em água ultrapura e administrada nos animais durante 15 dias por via oral (gavagem). Os animais do grupo controle receberam somente água ultrapura via gavagem. Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano e o fígado foi retirado para posteriores análises. Rim, cérebro, osso e dente também foram coletados e devidamente armazenados. O material biológico não utilizado foi descartado, conforme normas de biossegurança. Todos os materiais usados durante o tratamento, eutanásia e coleta de amostras biológicas foram previamente descontaminados com álcool bidestilado, para evitar possíveis contaminações.

Visando evitar o uso desnecessário das amostras tratadas metodicamente e o uso excessivo de animais no estudo, para o desenvolvimento do método foi adquirida uma amostra de fígado bovino, oriunda do comércio local de Pelotas, tendo em vista que apresenta uma composição majoritária muito similar ao fígado dos ratos.

4.4 Teor de umidade

Essa análise visa determinar o teor de umidade presente na amostra. O experimento foi realizado em triplicata. Assim, pesou-se na balança analítica aproximadamente 3 g de amostra de fígado bovino em cadinhos de porcelana previamente secos em estufa a 300 °C. Após a pesagem, os cadinhos contendo as amostras foram levados à estufa a 105 °C, para que toda a água presente fosse evaporada. Após 24 horas, os cadinhos foram pesados e levados de volta à estufa. Após 30 minutos, foram pesados novamente, e assim sucessivamente. Quando a massa dos cadinhos contendo a amostra permaneceu constante, pesou-se 3 vezes cada um dos cadinhos para realizar uma média e então calcular o teor de umidade da amostra pela Equação 1 apresentada.

Massa úmida -----100%

Massa seca ----- X

$100 - X = \text{teor de umidade}$

(Equação 1)

4.5 Avaliação da influência do pré-tratamento, utilizando o fígado bovino para decomposição por MIC

Inicialmente foi realizada uma etapa de otimização no método utilizando um fígado bovino para evitar o uso desnecessário de amostras, ressaltando que todas as análises, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação, foram realizadas em triplicata. Os parâmetros avaliados de pré-tratamentos foram realizados em triplicata e consistiram em: i) secagem em estufa a 55 °C; ii) secagem em estufa a vácuo 40°C; e iii) liofilização.

Para isso, foi realizado um ensaio de adição e recuperação de analito. Esse ensaio consiste em adicionar uma concentração conhecida do analito no início da manipulação da amostra (nesse caso antes da etapa de pré-tratamento) e ao fim do processo, determinar a recuperação obtida. Onde uma recuperação adequada é de 100% (Amarante, 2003). Desta forma, para esse ensaio de recuperação, o fígado foi fracionado em pequenos pedaços, pesado (~60 g) e levado ao moinho de facas junto da adição de uma solução padrão de fluoreto para obter uma concentração de 150 mg kg⁻¹, visando introduzir a menor quantidade possível do líquido na amostra e, posteriormente, submetido aos processos de secagem citados.

Após as amostras passarem pelas 3 etapas de pré-tratamento previamente descritas, e estarem livre de umidade, a amostra seca foi moída utilizando um moinho de bolas, até a obtenção de um pó fino. Na forma de pó, a amostra foi então pesada (400 mg) sobre um filme de LDPE em uma balança analítica, fechada na forma de invólucro e submetida ao mesmo processo de decomposição via MIC descrito anteriormente.

4.6 Otimização dos parâmetros da MIC

4.6.1 *Ensaio de massa*

O teste de massa consistiu em realizar processos de combustão na MIC utilizando diferentes massas de amostra, a fim de observar o comportamento destas durante a combustão. São levados em conta fatores como o tempo de duração da chama, a pressão do sistema durante a combustão, a reprodutibilidade nos quatro frascos, e mais importante, a total queima da amostra e o aspecto da solução absorvedora. Foram feitos invólucros contendo massas de 100 a 500 mg, que foram submetidos ao processo de combustão.

4.6.2 *Avaliação da solução absorvedora*

Para avaliação da solução absorvedora adequada ao método, foram avaliadas 3 concentrações diferentes de uma solução absorvedora amplamente utilizada quando o objetivo é a determinação de flúor. Sendo estas de 100, 150 e 200 mmol L⁻¹ de NH₄OH. Também foi avaliada a troca do contra-íon da solução, utilizando 150 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂CO₃. A fim de verificar a concentração em que há a maior recuperação do analito.

Para isso utilizou-se de um segundo ensaio de recuperação. Esta etapa ao mesmo tempo tem o objetivo de verificar e avaliar a influência do preparo da amostra por MIC na posterior determinação de flúor nas amostras. Inicialmente, utilizando uma amostra de fígado bovino, seca em estufa a 55 °C, foi feita a moagem utilizando um moinho de bolas, até atingir a granulometria de um pó. Sobre um filme de PEBD, pesou-se 400 mg da amostra e, previamente ao fechamento do invólucro, adicionou-se 20 µL de uma solução de 1000 mg L⁻¹ de fluoreto, esse então foi levado ao frasco de quartzo junto d suporte e submetido ao processo de combustão. As soluções obtidas após esse processo foram armazenadas em tubos Falcon de 50 mL e, posteriormente, diluídas, filtradas e levadas para análise por IC e ISE.

4.7 Determinação da concentração de fluoreto por IC

Primeiramente foi preparada uma curva de calibração, nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25 e 0,5 mg L⁻¹, partindo de diluições de uma solução estoque de F⁻. Com as amostras decompostas, é possível executar a etapa de determinação da concentração de flúor em todas as diferentes condições otimizadas. Para confirmação do pico com tempo de retenção referente ao flúor, ensaios de recuperação foram realizados previamente à análise das amostras. O gradiente utilizado no método pode ser acompanhado na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente do eluente utilizado no cromatógrafo de íons durante a determinação de fluoreto nas amostras.

Etapa	Tempo (min)	Concentração do eluente (mM)
1	0,000	1,00
2	0,000	1,00
3	5,000	4,00
4	7,500	20,00
5	8,000	20,00
6	11,000	20,00
7	18,000	20,00
8	22,000	20,00
9	25,000	80,00
10	27,000	80,00
11	30,000	80,00
12	32,500	1,50
13	33,000	1,50
14	34,000	Fim da corrida

4.8 Determinação da concentração de fluoreto por ISE

Para a determinação de F^- por ISE, também foi preparada uma curva de calibração nas mesmas concentrações utilizadas na IC, porém devido à menor sensibilidade do equipamento, foram utilizadas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 $mg L^{-1}$. Vale destacar que para preparar tanto a curva de calibração quanto as diluições das amostras faz-se necessário utilizar uma solução de ajuste da força iônica (TISAB II) para que a solução permaneça com uma atividade constante dos íons durante a leitura. A proporção utilizada foi a recomendada pelo fabricante, de 1 mL de TISAB para 50 mL de amostra.

4.9 Limites de detecção e quantificação.

Os limites de detecção instrumental foram calculados utilizando três vezes o valor de desvio padrão de 10 medidas do branco, multiplicado pela média dessas mesmas medidas. Os limites de quantificação instrumental foram calculados utilizando dez vezes o valor de desvio padrão obtido de 10 leituras do branco multiplicados pela média dessas leituras (Currie, 1995). Os limites do método, levam em consideração a massa de amostra utilizada e também o volume da solução obtida após o preparo.

4.10 Avaliação da exatidão do método

Para avaliação da exatidão do método, utilizou-se de um material de referência certificado (CRM) NIST 1566a (Tecido de ostra) contendo concentração conhecida de flúor. Para isto, 250 mg do CRM foi decomposto utilizando as condições otimizadas. Adicionalmente, realizou-se um ensaio de adição e recuperação pela decomposição de 150 mg do CRM misturado com 250 mg de uma das amostras tratadas (F10) e decomposto utilizando as condições otimizadas. Ambas avaliações foram feitas pela comparação do valor informado com os valores obtidos após as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de umidade

Após o tempo necessário para que os cadinhos com amostra tivessem um peso constante, a média de três pesagens dos cadinhos contendo as amostras foram feitas. As massas obtidas foram relacionadas com a massa inicial de amostra e por meio da Equação 1 foram obtidos os teores de umidade nas amostras.

Fazendo o cálculo, pode-se observar que o teor de umidade da amostra é de $70 \pm 2\%$, o que condiz com valores descritos na literatura para essa matriz (Taco, 2011). Esta é uma etapa muito importante para o desenvolvimento do método, se tratando que a amostra é decomposta por MIC, é preciso que a mesma contenha a mínima quantidade de água possível para uma combustão eficiente.

5.2 Avaliação da influência do pré-tratamento para posterior decomposição por MIC

O pré-tratamento das amostras, incluindo a etapa de secagem, pode ser uma fonte de erro em uma análise. Assim, para evitar possíveis perdas de F nesta etapa diferentes métodos foram avaliados. Para a secagem em estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, observou-se uma baixa recuperação do analito ($< 75\%$) e baixa reprodutibilidade (elevados desvios padrão relativos – RSDs). Os resultados para as demais condições de secagem são apresentados na Tabela 2. Como observado na Tabela 2, na secagem em estufa a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, a recuperação para F foi de $84 \pm 7\%$, o que indica que a temperatura elevada pode acarretar em perda de analito. Do mesmo modo, a secagem em estufa a vácuo à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou recuperações para F semelhantes à secagem em estufa convencional à $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo de $85 \pm 4\%$, indicando, então, que as secagens em estufas com aquecimento favorecem perda do analito por volatilização. Quando utilizada a liofilização, tentando evitar as perdas de analito por meio do uso de elevadas temperaturas, a recuperação foi satisfatória, sendo de $97 \pm 4\%$. Assim, a condição de pré-tratamento escolhida foi a de liofilização.

Tabela 2. Resultados do ensaio de recuperação para F, utilizando diferentes condições de pré-tratamento (média \pm desvio padrão, n=3).

Pré-tratamento	Recuperação (%)	
	IC	ISE
Estufa 55°C	84 \pm 7 ^{aB}	78 \pm 6 ^{aB}
Liofilização -55°C	97 \pm 4 ^{aA}	94 \pm 8 ^{aA}
Estufa a vácuo 40 °C	85 \pm 4 ^{aB}	81 \pm 9 ^{aAB}

^a Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. ^A Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

Ao comparar os resultados pelas duas técnicas de determinação de F não foi possível identificar diferença estatística (Teste *t-Student*, P 0,05), o que indica que ambas as técnicas são adequadas para a determinação do analito nas amostras avaliadas.

5.3 Parâmetros da MIC

5.3.1 Ensaio de massa

O ensaio de massa visa avaliar a massa máxima de amostra a ser decomposta pelo sistema, e influência diretamente na quantidade do analito a ser disponibilizado em solução. Neste caso, busca-se sempre decompor a maior massa de amostra suportada pelo sistema, visando melhorar os limites LoDs do método. Das massas avaliadas, de 100 a 400 mg demonstraram uma combustão adequada da amostra, identificada por meio de uma solução absorvedora límpida e sem resíduos de amostra no suporte após a combustão (Figura 3a), porém visualiza-se na Figura 3b que quando utilizado 500 mg de massa, esta acabou por gerar resíduos de matéria orgânica no frasco e na solução absorvedora, o que indica uma queima incompleta da amostra.



Figura 3. Frascos de quartzo após a combustão de (a) 100 a 400 mg e (b) 500 mg, de fígado animal.

Assim, a massa máxima de amostra a ser decomposta foi definida como sendo de 400 mg, visto que apresentou uma combustão completa, uma pressão interna do sistema de ~40 bar, o que está dentro dos limites de segurança recomendados pelo fabricante do equipamento

5.3.2 Avaliação da solução absorvedora

Para a avaliação da solução absorvedora, 100, 150 e 200 mmol L⁻¹ de NH₄OH e 150 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ foram utilizadas. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados para o ensaio de recuperação de flúor, utilizando diferentes soluções absorvedoras e 400 mg de amostra (média ± desvio padrão, n=3).

Solução absorvedora	Recuperação (%)	
	IC	ISE
NH ₄ OH 100 mmol L ⁻¹	97 ± 4 ^a	-
NH ₄ OH 150 mmol L ⁻¹	102 ± 8 ^a	-
NH ₄ OH 200 mmol L ⁻¹	92 ± 8 ^a	-
(NH ₄) ₂ CO ₃ 150 mmol L ⁻¹	96 ± 5 ^{aA}	94 ± 7 ^{aA}

^{aA}Letras diferentes em linhas e colunas apresentam diferença estatística.

Tendo em vista que os resultados não apresentaram diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$), foi escolhida inicialmente a solução absorvedora de NH₄OH com concentração intermediária (150 mmol L⁻¹) para os subseqüentes estudos do método, pois não se tem conhecimento acerca da concentração de analito presente nas amostras. Vale destacar que a solução de NH₄OH demonstrou grandes interferências na posterior determinação por ISE, não sendo possível quantificar o analito de forma adequada devido à baixa reprodutibilidade dos resultados. Essa informação condiz com diversos relatos na literatura, que associam a presença de íons OH⁻ como grande interferente para flúor devido ao seu tamanho similar (Xue *et al.*, 1995).

Conforme Xue *et al.* (1995) “ao contrário do que se pensa, a interferência causada pelos íons hidróxido não é pela ocupação destes nas redes vagas da membrana superficial do eletrodo, mas sim devido a uma reação química que resulta na formação de hidroxocomplexos que aumentam a atividade do íon fluoreto livre na solução, e isso faz com que o potencial de membrana mude para valores mais negativos, fazendo com que haja um desvio da resposta do equipamento”. A formação

destes complexos também é responsável por uma desaceleração considerável da resposta em soluções de flúor.

Dessa forma, utilizou-se a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ para recuperação de analito, tendo em vista que o carbonato não apresenta reportes na literatura como interferente para leitura de fluoreto, o que de fato proporcionou melhores resultados.

Assim, a partir dos resultados obtidos foi possível avaliar a influência que o preparo de amostra por MIC tem na recuperação de analito. Neste caso, as recuperações foram adequadas, sendo próximas de 100%, o que indica que o processo de perda de analito está associado à etapa de pré-tratamento da amostra. Os resultados de recuperação (Tabela 3) demonstram que a MIC é um método de preparo de amostra adequado para a decomposição de fígado animal e posterior determinação de flúor.

5.4 Brancos, limites de detecção e quantificação

O branco constitui todos os reagentes utilizados, exceto a amostra, e passam pelos mesmos processos durante todo o preparo de amostra e análise. Todos os procedimentos foram realizados em condições controladas, materiais descontaminados (conforme item 4.2 Mat e mét.), e os reagentes com grau analítico ou superior, visando obter valores o mais baixo possível para os brancos. Assim, cabe mencionar que nas condições selecionadas para o método (6 mL de solução 150 mmol L⁻¹ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, avolumado a 20 mL) os valores para os brancos foram de $0,1195 \pm 0,04$ mg L⁻¹. Estes valores foram considerados nos cálculos dos LODs e LOQs, como apresentado a seguir. Os limites de detecção e quantificação instrumental para IC foram de 0,25 mg L⁻¹ e 0,50 mg L⁻¹, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação instrumental para ISE foram de 0,28 mg L⁻¹ e 0,60 mg L⁻¹, respectivamente. Com as condições estabelecidas para o método, para IC, os limites de detecção foram de 12 mg kg⁻¹ e de quantificação de 25 mg kg⁻¹. Utilizando a técnica de ISE, os limites de detecção e quantificação foram de 13 e 30 mg kg⁻¹, respectivamente.

5.5 Avaliação da exatidão do método

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo preparo e análise de um material de referência certificado de tecido de ostra. Este material foi escolhido pela composição similar às amostras utilizadas neste estudo, dentre os CRMs disponíveis no laboratório de pesquisa que continham concentração de flúor certificada e/ou informada. Foram obtidas concordâncias de $103 \pm 4\%$ entre os resultados obtidos ($246 \pm 9 \text{ mg kg}^{-1}$) e o valor informado (240 mg kg^{-1}), quando 250 mg de CRM foi decomposta nas condições selecionadas para o método. Todavia, apesar de ser uma matriz biológica, optou-se pela mistura do CRM com a amostra para simular a liberação do analito em meio a matriz de fígado. Após o preparo do CRM misturado à amostra utilizando os parâmetros otimizados e posterior determinação por IC, foi obtida uma recuperação de $102 \pm 4\%$, comprovando a eficiência do método proposto para a determinação de flúor em fígado animal.

5.6 Aplicação do método

Com os parâmetros experimentais otimizados e definidos, foi realizada a decomposição das amostras por MIC e subsequentemente foram analisadas por IC e ISE, e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultado das concentrações de flúor (mg kg^{-1}) nas amostras de ratos tratadas (média \pm desvio padrão, $n=3$).

<u>Grupos</u>	<u>Amostra</u>	<u>IC</u>	<u>ISE</u>
<u>Controle</u>	F1	48,47 \pm 2,23 ^a	36,42 \pm 8,62 ^a
	F2	35,75 \pm 2,75 ^a	30,78 \pm 9,16 ^a
	F3	63,68 \pm 11,86 ^a	61,93 \pm 18,09 ^a
	F4	36,33 \pm 1,59 ^a	33,82 \pm 5,88 ^a
	F5	36,70 \pm 3,84 ^a	41,63 \pm 3,26 ^a
<u>Tratados</u>	F6	69,05 \pm 9,16 ^a	85,65 \pm 15,45 ^a
	F7	58,90 \pm 5,94 ^a	61,83 \pm 2,37 ^a
	F8	69,50 \pm 7,79 ^a	64,21 \pm 2,80 ^a
	F9	58,67 \pm 1,59 ^a	53,49 \pm 13,40 ^a
	F10	103,62 \pm 5,70 ^a	91,45 \pm 16,01 ^a

^aLetras diferentes na mesma linha significa diferença significativa dos resultados.

É possível observar na Tabela 4 que não há diferença estatística significativa entre as técnicas utilizadas para nenhuma amostra analisada (Teste *t-Student*, $p < 0,05$), indicando que ambas podem ser utilizadas para determinação de F. Assim, foi feita a média da concentração de flúor presente para os animais do grupo controle e tratado, que pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado das concentrações de flúor (mg kg^{-1}) nos grupos controle e tratado (média \pm desvio padrão, $n=3$).

<u>Grupo</u>	<u>IC</u>	<u>ISE</u>
Controle	44,18 \pm 13,0 ^{bA}	41,09 \pm 23,0 ^{aA}
Tratado	71,94 \pm 14,6 ^{aA}	73,23 \pm 26,2 ^{aA}

^{aA}Letras diferentes na mesma coluna ou linha indicam diferença significativa dos resultados.

Com os resultados dispostos na Tabela 5, foi possível aplicar estatística para comparação dos grupos (Teste *t-Student*, $p < 0,05$), a qual demonstrou diferença significativa quando utilizado o método com a técnica de cromatografia de íons. É possível visualizar uma tendência de aumento na concentração de flúor no grupo de animais tratados, o que condiz com informações que o fígado é um local vulnerável ao acúmulo deste elemento. Comparando os resultados obtidos com a determinação realizada por ISE, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos, devido aos altos valores de desvio padrão obtidos. Essa é uma evidência clara da maior reprodutibilidade e precisão instrumental da técnica de cromatografia de íons, que apresentou RSDs $< 17\%$, já utilizando a determinação por eletrodo íon-seletivo, os valores de RSD foram de até 29% .

Contudo, ressalta-se que mais estudos devem ser avaliados para identificar o quanto esse elemento é capaz de se acumular no organismo. Podem ser avaliadas mudanças como um maior tempo de exposição crônica ao elemento, e também a utilização de mais grupos de tratamento e diferentes concentrações e formas químicas de F. Ainda assim, vale destacar a importância do controle e da regulamentação na dosagem deste elemento. Sendo sua maior fonte de ingestão a água, é necessário que haja uma fiscalização rigorosa da concentração deste elemento antes que água chegue para população. Certas regiões, como por exemplo a Etiópia, contêm altas quantidades de flúor naturalmente na água, podendo chegar até 75 mg L^{-1} (Demelash, 2019). Dessa forma, alternativas devem ser tomadas não somente para a adição de flúor em águas onde não há a presença do elemento devem ser avaliadas, mas também, para regiões onde a concentração do elemento é muita alta, deve haver no sistema de distribuição de água, um tratamento que reduza a concentração deste elemento, como por exemplo, a filtração.

CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, pode-se concluir que foi possível desenvolver um método adequado para a determinação de flúor em fígado animal. A condição de pré-tratamento escolhida para o método foi a de liofilização, pois apresentou melhores recuperações do analito, além de que, evitando o uso de aquecimento durante a etapa de secagem, diminui-se as chances de degradar a amostra. Quando avaliados e otimizados todos os parâmetros, a MIC pode ser considerada um método de preparo de amostra eficaz para a decomposição de fígado e posterior determinação de flúor por IC e por ISE. A massa mais adequada de amostra a ser decomposta foi de 400 mg e a solução absorvedora que apresentou melhor eficácia foi a de 150 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂CO₃, principalmente para a técnica de ISE. Por fim, após o desenvolvimento do método, este foi aplicado às amostras de ratos cronicamente expostas ao flúor, e quando feita a comparação entre os grupos controle e tratado, foi possível observar diferença estatística significativa nos resultados obtidos por IC. Todavia por ISE, não se observou diferença significativa devidos aos valores de desvio padrão elevados, o que se torna bastante relevante em estudos do tipo *in vivo*. Assim, quando utilizada uma técnica de maior precisão, com uma maior reprodutibilidade de resultados, é possível verificar pequenas diferenças na determinação de elementos em baixa concentração. Vale destacar também que podem ser realizados mais estudos durante a etapa de tratamento dos animais, como avaliar diferentes concentrações de flúor nos exemplares, com mais grupos de tratamento, também como, um maior tempo exposição ao elemento. Por fim, cabe reforçar a relevância dos agentes reguladores e distribuidores de água no controle e quantificação minuciosa da concentração de flúor na água potável distribuída, visando o bem-estar da população e reduzindo a ingestão de quantidades desnecessárias deste elemento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K.; DOTE, T.; DOTE, E.; MITSUI, G.; KONO, K. Strong acute toxicity, severe hepatic damage, renal injury and abnormal serum electrolytes after intravenous administration of cadmium fluoride in rats. **J Occup Health**, may; 49(3):235-41, 2007. doi: 10.1539/joh.49.235. PMID: 17575404.

ALVES, M. METROHM, P. **Cromatografia de íons**. São paulo, 2014. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/1060198/LOQ4001/Apresentacao%20Teorica%2020102014.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2023.

ANDRADE, S. 70 anos de fluoretação da água de abastecimento público requer debate. **Ciencia e Cultura**. v. 67 n. 2, São Paulo, 2015.

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.*, v. 12, p. 116-131, 2001.

ANEEZ, J.; REMYA, R.; JINSON, P.; KRIPA, E; CHERIAN, N. K.; FELIX, J. Hesarghatta Shyamsunder Asha, Nihal Thomas, Thomas Vizhalil Paul. The continuing crippling challenge of skeletal fluorosis – Case series and review of literature. **Journal of Clinical and Translational Endocrinology: Case Reports**, v. 24, 2022.

ARNOLD, A. M.; MEYERGHOFF, M. E. Ion-selective eletrodes. **Anal. Chem.** 56, 20-48, Michigan, 1984.

BARBIER, O.; ARREOLA-MENDOZA, L.; DEL RAZO, L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 319-333, 2010. doi:10.1016/j.cbi.2010.07.011

BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F.; MELLO, P. A., & Pereira, J. S. F. Microwave-Induced Combustion. Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis. **Food Analytical Methods**, p. 143–177, 2014. doi:10.1016/b978-0-444-59420-4.00005-2

BASHASH M, THOMAS D, HU H, MARTINEZ-MIER EA, SANCHEZ BN, BASU N, PETERSON KE, ETTINGER AS, WRIGHT R, ZHANG Z, LIU Y, SCHNAAS L, MERCADO-GARCÍA A, TÉLLEZ-ROJO MM, HERNÁNDEZ-AVILA M. Prenatal Fluoride Exposure and Cognitive Outcomes in Children at 4 and 6–12 Years of Age in

Mexico. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 9, 2017. doi:10.1289/ehp655

BRASIL. FLUORETAÇÃO DA ÁGUA EM SISTEMAS DE ABASTECIMENTO QUANDO EXISTIR ESTAÇÃO DE TRATAMENTO, Lei Nº 6.050 DE 24 DE MAIO DE 1974. Brasília, 1974. Acessado em 07 de agosto de 2023. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6050.htm#art3.

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de fluoretação da água para consumo humano – Brasília: Funasa, 2012.

BUZALAF, M.; WHITFORD, G. M. Fluoride metabolism. **Monogr Oral Sci.** 2011; 22:20-36. doi: 10.1159/000325107. Epub (2011). PMID: 21701189.

CAO, J.; LIU, J.; TANG L.; SANGBU, D.; YU S.; ZHOU S.; QU, H. Dental And Early-Stage Skeletal Fluorosis In Children Induced By Fluoride In Brick-Tea. **Flúor**, v. 38, n. 1, p. 44-47, 2005.

CHOI, A. L.; SUN, G.; ZHANG, Y.; GRANDJEAN, P. Developmental Fluoride Neurotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 10, 1362–1368, 2012. doi:10.1289/ehp.1104912

COELHO, J. G. S.; PEREIRA, R. M.; HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G.; PEREIRA, C. M. P.; COSTA, V. C.; MESKO, M. F. Determinação de Cl e S em Algas Marinhas Comestíveis por Cromatografia de Íons após Decomposição por Combustão Iniciada por Micro-ondas. **Rev. Virtual Quim.**, n. 9, v. 2, 492-501, 2017.

COLLINS C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP.** 2006.

COSTA, V. C.; PEREIRA, R. M.; MELLO, J. E.; BRUM, J. R.; PICOLOTO, R. S.; MESKO, M. F. Indirect determination of chlorine and fluorine in eye shadow by ion chromatography after an eco-friendly sample preparation method based on combustion reaction, **Microchemical Journal**, v. 150, 2019.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. IUPAC. Pure & Applied Chemistry, Vol. 67, No. 10, pp. 1699-1723, 1995.

DE MARCO, R.; CLARKE, G.; PEJCIC, B. Ion-Selective Electrode Potentiometry in

Environmental Analysis. **Electroanalysis**, v. 19, n. 19-20, p. 1987–2001, 2007). doi:10.1002/elan.200703916

DEMELASH, H., BEYENE, A., ABEBE, Z. Fluoride concentration in ground water and prevalence of dental fluorosis in Ethiopian Rift Valley: systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health** **19**, 1298, 2019.

DHILLON, A.; NAIR, M.; KUMAR, D. Métodos analíticos para determinação e detecção de flúor em fontes bióticas e abióticas: uma revisão. **Analytical Methods**, v. 8, n. 27, p. 5338–5352, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C6AY01534D>. Acesso em: 23 ago. 2023;

FERNANDES, J. C. B; KUBOTA, L. T. Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 120-130, 2001.

FLORES, É. M. M.; BARIN, J. S; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Combustão de Amostra Assistida por Microondas: Uma Técnica para Preparação de Amostras na Determinação de Oligoelementos. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 3525–3529, 2004. doi:10.1021/ac0497712

FLORES, É. M. M.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; Knapp, G. Determination of Halogens in Coal after Digestion Using the Microwave-Induced Combustion Technique. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 1865–1870, 2008. doi:10.1021/ac8000836

FRANT, M. S.; ROSS, J. W. Eletrodo para detectar a atividade de íons de flúor em solução. **Ciência**, v. 154, n. 3756), p. 1553–1555, 1966. doi:10.1126/science.154.3756.1553

FRAZÃO, P.; NARVAI, P. C. A fluoretação da água nas cidades brasileiras na primeira década do século XXI. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017. doi:10.1590/s1518-8787.2017051006372

FERNANDES, M. S.; MARTINS, G. M.; SHIMORAH, L. M.; IANO F. G.; YANAI, M. M.; CESTARI, T. M.; BUZALAF, M. A. R.; DE OLIVEIRA, R. C.. Fluoride effect on the process of alveolar bone repair in rats: evaluation of activity of MMP-2 and 9 RSBO. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 9, n. 3, julio-septiembre, 2012, p. 229-237.

Universidade da Região de Joinville, Joinville, Brasil.

INKIELEWICZ, J.; KRECHNIAKA. Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. **Fluoride**, v. 36, n. 4, p. 263-266, 2003. Research Report 263. Gdańsk, Polonia.

JAMPAIAH, D; VENKATASWAMY, P.; REDDY, B. Microwave-Assisted Solution Combustion Synthesis of Nanostructured Catalysts. **World Scientific Publishing Company**, p. 46-85. Índia, 2021.

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.

LA ROSA NOVO, D.; HENN, A.; FLORES, E. M.; MESKO, M. F. Feasibility of microwave-induced combustion combined with inductively coupled plasma mass spectrometry for bromine and iodine determination in human nail. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2019.

LEWIS, C. W; Fluoride. Pediatrics in review. **Pittsburg**, v. 44, n. 9, p. 327-429, 2003.

LI, Y., LIANG, C., SLEMENDA, CW, JI, R., SUN, S., CAO, J.; JOHNSTON, CC. Efeito da exposição prolongada ao flúor na água potável sobre os riscos de fraturas ósseas. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(5), 932–939 (2001). doi:10.1359/jbmr.2001.16.5.932

LUDLOW, M.; LUXTON, G.; MATHEW, T. Effects of fluoridation of community water supplies Apeople with chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant** , v. 22, n. 10, p. 2763–2767, 2007. doi:10.1093/ndt/gfm47

MCDONAGH, M. S. Revisão sistemática da fluoretação da água. **BMJ**, v. 321, n. 7265, p. 855–859, 2000.

MEIERS, P. The discovery of Fluoride and Fluorine. Saarbruecken, Alemanha. Disponível em: <http://www.fluoride-history.de/index.htm>. Acesso em: 3 set. 2023.

MELLO, P. A.; BARIN, J.; DUARTE, F.; BIZZI, C.; DIEHL, L. MULLER, E.; FLORES, E. Métodos analíticos para determinação de halogênios em ciências bioanalíticas:

uma revisão. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, p. 7615–7642, 2013.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7077-9>

MESKO, M. F.; TORALLES, I. G.; CRIZEL, M. G.; COSTA V. C.; PIRES, N. R. X.;

MESKO, M. F.; Combustão iniciada por microondas em sistema fechado para a decomposição de amostras biológicas. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2004.

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

MESKO, M.F.; MORAES, D.P.; BARIN, J.S.; DRESSLER, V.L.; KNAPP, G.; FLORES, E.M. Digestão de materiais biológicos usando a técnica de combustão de amostra assistida por microondas. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 2, p. 183–188, 2006.

MESKO, M.F.; COSTA, V.C.; PEREIRA, R.M.; HARTWIG, C.A. Chlorine and Fluorine Determination in Eye-Pencil: Development of an Eco-Friendly Sample Preparation Method for Ion Chromatography Analysis. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, n. 10, p. 1292–1298, 2019.

MESKO, M.F., PEREIRA, R.M., SCAGLIONI, P.T. Single analysis of human hair for determining halogens and sulfur after sample preparation based on combustion reaction. **Anal Bioanal Chem** 411, 4873–4881, 2019.

MESKO, M. F.; PICOLOTO, R. S.; FERREIRA, L. R.; COSTA, V. C.; PEREIRA, C. M. P.; COLEPICOLO, P.; MULLER, E. FLORES, E. M. M. Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 1, p. 260–266, 2015.

MOURA, A. V.; DA SILVA, J. D. S.; GUBERT, P. Cromatografia de Íons: Princípios e Instrumentação. **Orbital: Elétron. J. Química**, v. 14, p. 110-115, 2022.

NARASIMHACHARYA, A. V. R. L.; VASANT, R. Amla as an antihyperglycemic and hepato-renal protective agent in fluoride induced toxicity. **Journal of Pharmacy and**

Bioallied Sciences, v. 4, n. 3, p. 250, 2012. doi:10.4103/0975-7406.99067

NARVAI, P. C.; FRAZÃO, P. Avaliação da atenção em saúde bucal. Avaliação em saúde: contribuições para incorporação no cotidiano. Tradução. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.

NIU, Z.; ZHANG, W.; YU, C., ZHANG, J.; WEN, Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 123-146, 2018. doi:10.1016/j.trac.2018.02.005

NOWAK, P. M.; POSLUSZNY, R. W.; PAWLISZYN, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 138, 2021.

OKAZOE, T. Overview on the history of organofluorine chemistry from the viewpoint of material industry. **Proc Jpn Acad.** v. 85, p. 276-89, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Fluoride in Drinking-water**. IWA publishing: London, England, 2006.

PATIL, M. M.; LAKHKAR, B. B.; PATIL, S. S. Curse of Fluorosis. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 85, n. 5, p. 375-383, 2018.

PEREIRA, T. *et al.* Effect of fluoride on major organs with the different time of exposure in rats. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 17, 2018. Doi: 10.1186/s12199-018-0707

PEREIRA, C. M. P.; PICOLOTO, R. S.; MELLO, P.A. Determinação de bromo e iodo em algas comestíveis por icp-ms após digestão por combustão induzida por microondas. **Química nova**, 2014. Doi:10.5935/0100-4042.20140156

PEIXOTO, E. M. A. Flúor, Elemento químico. Química nova na escola, **Quím. Nov.**, 1998.

PIRES, N. R. X. *et al.* Digestão Assistida por Micro-ondas e Radiação UV: Novo Método para Posterior Determinação de As e Cd por ICP-MS em Algas. **Sociedade Brasileira de Química**, 2013.

ROCHA, R. A.; ROJAS, D.; CLEMENTE, M. J.; RUIZ, A.; DEVESA, V.; VÉLEZ, D.

Quantification of Fluoride in Food by Microwave Acid Digestion and Fluoride Ion-Selective Electrode. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 45, 10708-10713, 2013. doi:10.1021/jf403728r

RONDAN, F. S. *et al.* Determinação ultra-traço de bromo e iodo em arroz por ICP-MS após combustão induzida por microondas. **Jornal de Composição e Análise de Alimentos**, v. 66, p. 199-204, 2018. doi:10.1016/j.jfca.2017.12.023

SAWANT, R. M, MAHAJAN, M. A, VERMA, P., SHAH, D., THAKUR, R. U., RAMAKUMAR, K. L. Determinação de flúor em diversas matrizes relevantes para a indústria nuclear: uma revisão. **Radioquímica Acta**, v. 95, n. 10, 2007. doi:10.1524/ract.2007.95.10.585

SCHNETGER, B.; MURAMATSU, Y. Determinação de halogéneos, com especial referência ao iodo, em amostras geológicas e biológicas utilizando pirohidrólise para preparação e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e cromatografia iônica para medição. **The Analyst**, v. 121, n. 11, p. 1627, 1996. doi:10.1039/an9962101627

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. Tradução técnica: Robson Mendes Matos. -- 9. ed atual. -- São Paulo: Cengage Learning, 2014.

SOLSK, Y R. L. Ion-selective electrodes. **Anal. Chem.**, v. 62, p. 21-33. Pennsylvania, 1990.

SRIVASTAVA, S., FLORA, S. Flúor na Água Potável e Fluorose Esquelética: uma Revisão do Impacto Global. **Curr Envir Health Rpt**, v. 7, p. 140-146, 2020.

TAVES, R. D. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Pergamon Press**, v. 15, p. 969-974. Talanta, 1968.

TOON, R. The discovery of fluor, Education in Chemistry. **Royal Society of Chemistry**, 2011. Disponível em: <https://edu.rsc.org/feature/the-discovery-of-fluorine/2020249.article>. Acesso em: 20 jul. 2023.

VASCONCELOS, M. T. S. D.; GOMES, C. A. R.; Machado, A. A. S. C. Determinação por cromatografia iônica de flúor em fumos de soldagem com eliminação de altos teores de ferro por extração em fase sólida. **Journal of Chromatography A**, v. 685,

n. 1, 53-60, 1994. doi:10.1016/0021-9673(94)00664-4

WANG, W.; LI, R.; TAN, R.; LUO, K.; YANG, L.; LI, H.; LI, Y. ADSORPTION AND LEACHING OF FLUORIDE IN SOILS OF CHINA. *Fluoride* Vol. 35 No. 2 122-129, 2002

WANG, X. D.; SHEN, W.; CATTRALL, R. W.; NYBERG, G. L.; LIESEGANG, J. A study of the hydroxide ion interference on several fluoride ion-selective electrode membranes. **Electroanalysis** v. 7, n. 11, p. 1048-1053, 1995.

WILLARD, H. H.; WINTER, O. B. Método Volumétrico para Determinação de Flúor. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition**, v. 5, n. 1, p. 7-10, 1933. doi:10.1021/ac50081a006

WHITFORD GM. Ingestão e metabolismo do flúor. **Avanços na pesquisa odontológica**. 8(1):5-14, 1994;

XIONG, X.; LIU, J.; HE, W.; XIA, T., HE P, CHEN, X.; YANG, K.; WANG, A. Relação dose-efeito entre os níveis de flúor na água potável e danos às funções hepática e renal em crianças. **Pesquisa Ambienta**, v. 103, n. 1, p. 112-116, 2007.

XUE, D.; WANG, W. S.; CATTRALL, R. W.; NYBERG, G. L.; LIESEGANG, J. A study of the hydroxide ion interference on several fluoride ion-selective electrode membranes. *Electroanalysis*, v.7, n. 11, p. 1048-1053, 1995.

YAHYAVI, H.; KAYKHAI, M.; MIRMOGHADDAM, M. Desenvolvimentos recentes em métodos de análise para determinação de flúor. **Revisões Críticas em Química Analítica**, v. 46, n. 2, p. 106-121, 2015. doi:10.1080/10408347.2014.985814

YIPING, H.; CAIYUN, W. Cromatografia de íons para determinação rápida e sensível de flúor no leite após microextração de gota única em headspace com geração in situ de fluoreto de hidrogênio volátil. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 161-166, 2010. doi:10.1016/j.aca.2009.12.018