

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ana Luiza Garcia Mendes

**INVESTIGAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DA CROMATOGRÁFIA DE
ÍONS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE HALOGÊNIO EM
SALIVA**

Santa Maria, RS
2019

Ana Luiza Garcia Mendes

**INVESTIGAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DA CROMATOGRAFIA DE ÍONS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE HALOGÊNIO EM SALIVA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Paola Azevedo Mello

Santa Maria, RS
2019

MENDES, ANA LUIZA GARCIA
INVESTIGAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DA CROMATOGRÁFIA DE
ÍONS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE HALOGÊNIO EM
SALIVA / ANA LUIZA GARCIA MENDES.- 2019.
87 p.; 30 cm

Orientadora: PAOLA DE AZEVEDO MELLO
Coorientadora: EDSON IRINEU MÜLLER
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Análise de especiação 2. Halogênios 3.
Cromatografia de íons 4. Saliva 5. Estabilidade I. MELLO,
PAOLA DE AZEVEDO II. MÜLLER, EDSON IRINEU III. Título.

Ana Luiza Garcia Mendes

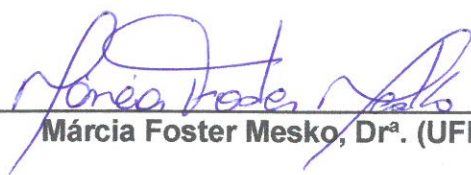
**INVESTIGAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DA CROMATOGRAFIA DE ÍONS
PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE HALOGÊNIO EM SALIVA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovado em 15 de agosto de 2019:



Paola de Azevedo Mello, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Márcia Foster Mesko, Dr^a. (UFPel)



Rodrigo Cordeiro Bolzan, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.

Ana Luiza G. Mendes

Ana Luiza Garcia Mendes

DEDICATÓRIA

À minha família, minha mãe Denise, meu pai Roberto e aos meus irmãos Juliano e Francisco. Aos 54 milhões de brasileiros que tiveram seus votos à Presidência desvalidados em 2016 por meio de um golpe, especialmente às mulheres. A memória da democracia brasileira.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo incentivo à pesquisa por meio da bolsa de mestrado.

À Prof.^a Dr.^a **Paola de Azevedo Mello**, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo profissional, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio e amizade.

Aos membros do exame de qualificação Profs. Drs. **Edson Irineu Müller** e **Rochele Sogari Picoloto**, pelas valiosas contribuições neste trabalho. Aos Profs. Drs. **Márcia Foster Mesko** e **Rodrigo Cordeiro Bolzan** pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos Profs. Drs., **Cezar Augusto Bizzi**, **Érico M. M. Flores**, **Fábio Andrei Duarte**, **Jussiane Souza da Silva** e **Valderi Luiz Dressler** pelas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como a amizade e convívio.

Aos colegas e funcionários do **LAQIA/CEPETRO**, pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial à **Caroline Senger**, **Gabrielle Iop**, **Morgana Doneda** e **Thaís Gatiboni** pela amizade, disposição e colaboração direta durante toda a execução deste trabalho.

Ao **Ademir**, funcionário da secretaria do PPGQ, pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

Em especial, agradeço a minha família que sempre me incentivou a estudar e deu suporte para que isso fosse possível, principalmente a minha mãe **Denise** e ao meu pai **Roberto**.

Não existe imparcialidade. Todos são orientados por uma base ideológica. A questão é: sua base ideológica é inclusiva ou excludente?

Paulo Freire

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DA CROMATOGRAFIA DE ÍONS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE HALOGÊNIO EM SALIVA

AUTORA: Ana Luiza Garcia Mendes
ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Paola de Azevedo Mello

Neste trabalho, a cromatografia de troca iônica foi investigada para análise de especiação de halogênios em saliva humana. Inicialmente, foi utilizado um sistema de cromatografia de íons que opera no modo isocrático ("Sistema IC 1"), sendo avaliados: a coluna cromatográfica (Metrosep A Supp 7 ou Metrosep A Supp 5), a composição da fase móvel (Na_2CO_3 e $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$), a vazão da fase móvel (entre 0,4 a 0,8 mL min^{-1} , dependendo da coluna), a temperatura do compartimento da coluna (30 a 45 °C), e, ainda, o uso de modificador na fase móvel (acetona). Na sequência foi avaliado um sistema que permite operar no modo gradiente ("Sistema IC 2"), sendo otimizados: a temperatura do compartimento da coluna (20 a 45 °C), a vazão do eluente (0,15 a 0,40 mL min^{-1}) e diferentes programas de eluição por gradiente (1 a 60 mmol L^{-1} de KOH). A dissolução alcalina assistida por micro-ondas foi utilizada para obter a concentração de halogênios total por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A melhor condição obtida com o "Sistema IC 1" foi obtida com a coluna Metrosep A Supp 7, a 45 °C, utilizando Na_2CO_3 (3,6 mmol L^{-1}) como fase móvel, a 0,8 mL min^{-1} . Contudo, esta condição não proporcionou a separação entre fluoreto e iodato e, entre brometo, clorato e perclorato. O "Sistema IC 2", possibilitou a separação de brometo do par clorato-perclorato devido ao programa de eluição por gradiente. Com o "Sistema IC 2", a melhor condição de separação foi obtida com eluição por gradiente de 1 a 60 mmol L^{-1} de KOH, vazão de fase móvel de 0,3 mL min^{-1} e temperatura do compartimento da coluna em 35 °C. Além das avaliações cromatográficas, foi avaliada também a estabilidade dos halogênios na saliva, bem como o uso de diferentes membranas de filtração para o pré-tratamento da amostra. O estudo de estabilidade demonstrou a viabilidade de armazenamento por até 90 dias, quando a amostra é armazenada sob refrigeração (4 °C), sem representar perdas na concentração de Cl, Br e I total. Quanto ao uso de uma etapa de filtração como pré-tratamento, foram investigados diferentes tipos de membrana e não foi observada influência para Cl e Br. Contudo, foi observada contaminação para Cl em alguns filtros e resultados subestimados foram observados para iodo. Adicionalmente, os sistemas de IC apresentaram ampla faixa linear (5-10000 $\mu\text{g L}^{-1}$), bem como baixos limites de detecção e de quantificação para as espécies investigadas. Com o método desenvolvido, foi possível identificar cloreto e brometo, além de sulfato e fosfato em saliva humana.

Palavras-chave: Análise de especiação. Halogênios. Cromatografia de íons. Saliva. Estabilidade.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ADEQUABILITY OF ION CHROMATOGRAPHY FOR HALOGENS SPECIATION ANALYSIS IN SALIVA

AUTHOR: Ana Luiza Garcia Mendes
ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Paola de Azevedo Mello

In this work, ion chromatography was investigated for halogens speciation analysis in human saliva. Initially, it was used an isocratic ion chromatography system ("IC 1 System"), being evaluated: the chromatographic column (Metrosep A Supp 7 or Metrosep A Supp 5), the composition of the mobile phase (Na_2CO_3 or $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$), the mobile phase flow rate (between 0.4 to 0.8 mL min^{-1} , depending on the column), the temperature of the column compartment (30 to 45 °C), and the use of mobile phase modifiers (acetone). A system that allows operating in gradient mode ("IC 2 System") was also evaluated, being optimized: the temperature of the column compartment (20 to 45 °C), the eluent flow rate (0.15 to 0.40 mL min^{-1}) and different gradient programs (1 to 60 mmol L^{-1} KOH). Microwave-assisted alkaline dissolution was used to obtain the total halogen concentration by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The best condition found for the "IC 1 System" was obtained with the Metrosep A Supp 7 column at 45 °C using Na_2CO_3 (3.6 mmol L^{-1}) as the mobile phase, at 0.8 mL min^{-1} . However, this condition did not provide the separation of fluoride and iodate and also, bromide, chlorate and perchlorate. The "IC 2 System" enabled the separation of bromide from chlorate and perchlorate according to the gradient elution program. The optimized conditions for the "IC 2 System" were 1 to 60 mmol L^{-1} KOH gradient, 0.3 mL min^{-1} mobile phase flow rate and column compartment temperature at 35 °C. In addition to chromatographic evaluations, the stability of halogens in saliva was also studied, as well as the use of different filtration membranes for sample pretreatment. The stability study demonstrated the viability of storage for up to 90 days under refrigeration (4 °C), without leading to losses in total Cl, Br and I concentration. Regarding the use of a filtration step as pretreatment, different membrane types were investigated and no influence was observed for Cl and Br. However, Cl contamination was observed in some filters and underestimated results were observed for iodine. Additionally, the IC systems presented wide linear range (5-10000 $\mu\text{g L}^{-1}$), as well as low limits of detection and quantification for the investigated species. With the developed method, it was possible to identify chloride and bromide, as well as sulfate and phosphate in human saliva.

Keywords: Speciation analysis. Halogens. Ion chromatography. Saliva. Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sistema utilizado para a avaliação do procedimento de filtração composto por a) <i>manifold</i> e b) boma de vácuo (cortesia Kéllen Anschau).....	39
Figura 2-	Fluxogramas demonstrando as avaliações feitas no a) “Sistema IC 1” e no b) “Sistema IC 2”.	40
Figura 3 -	Concentração de a) Cl; b) Br e; c) I em saliva humana em (—) meio alcalino e (—) <i>in natura</i>	49
Figura 4 -	Concentração de (—) cloro, (—) bromo e (—) iodo após filtração de saliva ou de solução de referência (500 µg L ⁻¹). Determinações feitas por ICP-MS, n = 2. * filtrados não obtidos.....	51
Figura 5 -	Cromatogramas para a) solução de referência sem filtração b) saliva sem filtração, diluída 500 vezes c) solução de referência multiespécies (500 µg L ⁻¹) filtrada e; d) saliva humana filtrada, diluída 1000 vezes, obtidos pelo “Sistema IC 2” utilizando gradiente de KOH, na vazão de 0,3 mL min ⁻¹ e temperatura de 35 °C no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4µm) e detecção por condutividade. 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - ácido fórmico 4 - bromato 5 - cloreto 6 - nitrito 7 - brometo 8 - nitrato 9 - clorato + perclorato 10 - carbonato 11 - sulfato 12 - iodeto * - fosfato.....	53
Figura 6 -	Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies (250 µg L ⁻¹) utilizando 3,6 mmol L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ como fase móvel, na vazão de 0,8 mL min ⁻¹ e temperatura de 45 °C no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - bromato 4 - cloreto 5 - nitrito 6 - brometo 7 - clorato + perclorato 8 - nitrato 9 - sulfato 10 - iodeto..	55
Figura 7 -	Cromatogramas obtidos pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies (250 µg L ⁻¹) utilizando 3,6 mmol L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ como fase móvel, na vazão de 0,8 mL min ⁻¹ e temperatura de 45 °C no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). a) cromatograma sobreposto de F ⁻ e IO ₃ ⁻ b) cromatograma sobreposto de Br ⁻ , ClO ₃ ⁻ e ClO ₄ ⁻	56
Figura 8 -	Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies (250 µg L ⁻¹) utilizando 7,2 mmol L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ como fase móvel, na vazão de 0,8 mL min ⁻¹ e temperatura de 45 °C no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - bromato 4 - cloreto 5 - nitrito 6 - brometo 7 - clorato + perclorato 8 - nitrato 9 - iodeto.	57
Figura 9 -	Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies (250 µg L ⁻¹) utilizando 3,6 mmol L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ como fase móvel e temperatura de 45 °C no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). a) 0,6 mL min ⁻¹ b) 0,7 mL min ⁻¹ c) 0,8 mL min ⁻¹ . 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - bromato 4 - cloreto 5 - nitrito 6 - brometo 7 - clorato + perclorato 8 - nitrato 9 - sulfato 10 - iodeto.....	58

- Figura 10 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 e 5 mmol L^{-1} NaHCO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - clorato + perclorato **8** - nitrato **9** - sulfato **10** - iodeto.....59
- Figura 11 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 e 1 mmol L^{-1} NaHCO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - sulfato.....60
- Figura 12 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$), utilizando modificador na fase móvel ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 com 2% acetona), na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - clorato + perclorato **8** - nitrato **9** - sulfato **10** - iodeto.....61
- Figura 13 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 e 1 mmol L^{-1} NaHCO_3 como fase móvel, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato **7** - brometo **8** - nitrato **9** - sulfato **10** - iodeto.....62
- Figura 14 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato + brometo **7** - nitrato **8** - sulfato **9** - iodeto.....63
- Figura 15 - Cromatogramas obtido pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel em diferentes vazões e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5) **a)** $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ **b)** $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ **c)** $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ **d)** $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato + brometo **7** - nitrato **8** - sulfato **9** - iodeto.....64
- Figura 16 - Cromatogramas obtidos pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ para diferentes temperaturas do compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5). **a)** $30 \text{ }^\circ\text{C}$, **b)** $35 \text{ }^\circ\text{C}$, **c)** $40 \text{ }^\circ\text{C}$, **d)** $45 \text{ }^\circ\text{C}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato + brometo **7** - nitrato **8** - sulfato **9** - iodeto.....66

- Figura 17 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para amostra de saliva diluída 400 vezes utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **1** - acetato **2** - cloreto **3** - sulfato * - fosfato.....67
- Figura 18 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH (1 a 60 mmol L^{-1}) na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e $30 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - nitrato **8** - clorato + perclorato + carbonato **9** - sulfato **10** - iodeto.....69
- Figura 19 - Cromatogramas obtidos pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando diferentes programas de eluição com gradiente de KOH com vazão de fase móvel de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4 μm). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7** - brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12** - iodeto.....71
- Figura 20 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH e vazão de fase móvel de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ para diferentes temperaturas do compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4 μm). **a)** $20 \text{ }^\circ\text{C}$ **b)** $25 \text{ }^\circ\text{C}$ **c)** $30 \text{ }^\circ\text{C}$ **d)** $35 \text{ }^\circ\text{C}$ **e)** $40 \text{ }^\circ\text{C}$ **f)** $45 \text{ }^\circ\text{C}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7** - brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12** - iodeto.....73
- Figura 21 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH em diferentes vazões e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4 μm). **a)** $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ **b)** $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ **c)** $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ **d)** $0,30 \text{ mL min}^{-1}$ **e)** $0,35 \text{ mL min}^{-1}$ **f)** $0,40 \text{ mL min}^{-1}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7** - brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12** - iodeto.....75
- Figura 22 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH, na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento de coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4 μm). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7**- brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12** - iodeto.....76
- Figura 23 - Cromatograma para saliva diluída 500 vezes obtido pelo “Sistema IC 2” utilizando gradiente de KOH, na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4 μm) e detecção por condutividade. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7** - brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12**- iodeto * - fosfato.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características principais de alguns métodos usando a cromatografia de íons para determinação de halogênios e suas espécies em amostras diversas.	27
Tabela 2 - Condições operacionais para a determinação elementar por ICP-MS e ICP-OES.	34
Tabela 3 - Programa de eluição utilizada para a determinação de halogênios e suas espécies com o "Sistema IC 2".	42
Tabela 4 - Programas de eluição por gradiente avaliados.	43
Tabela 5 - Concentração de Br, Cl e I em saliva por ICP-MS após dissolução alcalina assistida por micro-ondas (n = 3).	47
Tabela 6 - Avaliação de parâmetros cromatográficos para o "Sistema IC 1" e "Sistema IC 2".....	78
Tabela 7 - Resultados para espécies halogenadas em saliva humana por IC ("Sistema IC 2") e para o teor total de halogênios por ICP-MS (n = 3).....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
IC	Cromatografia de íons, do inglês <i>ion chromatography</i>
IC-MS	Cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massa, do inglês <i>ion chromatography mass spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ISE	Eletrodo íon seletivo, do inglês <i>ion selective electrode</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MCE	Éter de celulose misto, do inglês <i>mixed cellulose ether</i>
NAA	Análise por ativação neutrônica, do inglês <i>neutron activation analysis</i>
PAN	Nylon poliamida
PCB	Bifenila policlorada
PES	Polietersulfona
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Fluoreto de polivinilideno, do inglês <i>polyvinylidene fluoride</i>
RF	Rádio frequência
<i>t_R</i>	Tempo de retenção
XRF	Fluorescência de raios-X, do inglês <i>X-Ray Fluorescence</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	A SALIVA HUMANA.....	20
2.2	ESPECIAÇÃO QUÍMICA.....	21
2.2.1	Análise de especiação	21
2.2.2	Análise de especiação de halogênios	22
2.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE HALOGÊNIOS E SUAS ESPÉCIES.....	23
2.3.1	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	23
2.3.2.	Outras técnicas analíticas	24
2.3.3	Cromatografia de íons.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	32
3.2	REAGENTES	35
3.3	AMOSTRAS	36
3.4	PROCEDIMENTOS.....	36
3.4.1	Procedimentos de descontaminação	36
3.4.2	Determinação da concentração total de halogênios em saliva.....	37
3.4.3	Avaliação da estabilidade de halogênios e suas espécies	37
3.4.4	Avaliação do procedimento de filtração sobre a concentração de halogênios.....	38
3.5	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE HALOGÊNIOS EM SALIVA	39
3.5.1	Avaliação do “Sistema IC 1”	40
3.5.1.1	<i>Avaliação de parâmetros de separação com a coluna Metrosep A Supp 7</i>	40
3.5.1.1.1	<i>Vazão da fase móvel</i>	40
3.5.1.1.2	<i>Composição da fase móvel.....</i>	41
3.5.1.2	<i>Avaliação de parâmetros de separação com a coluna Metrosep A Supp 5.....</i>	41

3.5.1.2.1	Composição da fase móvel	41
3.5.1.2.2	Vazão da fase móvel	41
3.5.1.2.3	Temperatura do compartimento da coluna	41
3.5.2	Avaliação do “Sistema IC 2”	42
3.5.2.1	<i>Avaliação da eluição por gradiente</i>	42
3.5.2.2	<i>Avaliação da temperatura do compartimento da coluna</i>	44
3.5.2.3	<i>Avaliação da vazão da fase móvel</i>	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	DOS DESAFIOS DA AMOSTRA	46
4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE HALOGÊNIOS EM SALIVA	46
4.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE HALOGÊNIOS	48
4.4	AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE FILTRAÇÃO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE HALOGÊNIOS EM SOLUÇÃO	50
4.5	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE ESPECIAÇÃO DE HALOGÊNIOS EM SALIVA	54
4.5.1	Avaliação do “Sistema IC 1”	54
4.5.1.1	<i>Avaliação de parâmetros de separação com a coluna Metrosep A Supp 7</i>	54
4.5.1.2	<i>Avaliação da vazão da fase móvel</i>	57
4.5.1.3	<i>Avaliação da composição da fase móvel</i>	59
4.5.1.4	<i>Avaliação de coluna de separação alternativa</i>	62
4.5.1.5	<i>Avaliação da vazão da fase móvel</i>	63
4.5.1.6	<i>Avaliação da temperatura do compartimento da coluna</i>	65
4.5.2	Avaliação das condições cromatográficas no “Sistema IC 2”	68
4.5.2.1	<i>Avaliação de programas de eluição por gradiente</i>	69
4.5.2.2	<i>Avaliação da temperatura do compartimento da coluna e da vazão da fase móvel</i>	72
4.5.6	Análise de especiação de halogênios em saliva por IC	77
5	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A saliva é uma mistura aquosa complexa, na sua grande maioria produzida pelas glândulas salivares e composta majoritariamente de água (99%) e de uma fração minoritária de proteínas, lipídeos e sais dissolvidos. Este fluído biológico pode ser usado como material de diagnóstico, podendo representar a qualidade de saúde da cavidade oral, das glândulas salivares e de todo o corpo dos seres humanos. A saliva também pode ser facilmente empregada para diagnóstico de doenças, visto que não coagula, apresenta estabilidade por 24 h em temperatura ambiente e de até uma semana quando armazenado a 4 °C. Além disso, possibilita uma coleta menos invasiva quando comparada a outros fluídos biológicos (CHOJNOWSKA et al., 2018).

A presença de halogênios na saliva está principalmente vinculada à altas concentrações de cloreto, relacionada à ativação das enzimas amilase e lipase. Contudo, já são relatados outros íons halogenados, tais como brometo e iodeto. Estes estão relacionados à glândula tireoide, à produção de colágeno IV, à ativação da enzima α -amilase, e ainda, à doenças como insônia, entre outras funções/disfunções. Dessa forma, a quantificação desses íons halogenados, bem como de suas espécies, é importante para contribuir com a compreensão de processos biológicos (KIGNEL, 2013; MCCALL et al., 2014; NOVO et al., 2019).

Dentre as técnicas comumente empregadas para a quantificação de halogênios, destacam-se a análise por ativação neutrônica (NAA), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a potenciometria com eletrodo íon-seletivo (ISE) e a cromatografia de íons (IC). Diversos autores têm proposto o uso da ICP-OES e da ICP-MS para a determinação de halogênios em fluídos biológicos, por combinarem capacidade multielementar, sensibilidade e robustez (KIRK et al., 2012; LU et al., 2015; MESKO et al., 2016). Contudo, estas técnicas apresentam como desvantagem a impossibilidade de determinação de todos os halogênios simultaneamente, incluindo flúor, além de serem incapazes de diferenciar entre as possíveis formas de halogênios presentes, já que respondem à concentração total de cada elemento. Diante disso, a IC se apresenta como uma boa alternativa, tendo em vista seu potencial para a separação de ânions, por

exemplo, F^- , Cl^- , Br^- , I^- , IO_3^- , BrO_3^- , ClO_3^- , ClO_4^- em matrizes diversas, tais como, água, sangue, laticínios, cimento e poli-imida de alta pureza (BARRON, NESTERENKO e PAULL, 2005; CAUDURO et al., 2019; HE et al., 2019; KIRK et al., 2012; KRZYZANIAK et al., 2016; PEREIRA et al., 2016). Além da possibilidade de separação que a cromatografia proporciona, esta técnica viabiliza o acoplamento a vários detectores. Dessa forma, tem-se a informação dada pela separação, vinculada à identificação/quantificação dos íons separados. Os detectores comumente empregados na IC são: de condutividade, o espectrômetro de massa (MS) e o ultravioleta-visível (UV-Vis) (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Nesta perspectiva, diante dos trabalhos que mostraram a presença de halogênios em saliva, é proposta a investigação das espécies de halogênios, utilizando a cromatografia de íons. Cabe destacar que a determinação de halogênios em saliva é, por si só, algo demonstrado por apenas alguns poucos métodos na literatura e a análise de especiação de halogênios neste tipo de matriz é pouco explorada. Com isso, foram avaliados diferentes sistemas cromatográficos, ambos com detector por condutividade e colunas cromatográficas, além dos parâmetros inerentes a um método cromatográfico, tais como o tipo e a vazão da fase móvel, o uso de modificadores, a viabilidade de utilizar sistema isocrático ou gradiente e a temperatura do compartimento da coluna.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica está dividida em três partes principais. Na primeira parte, serão abordados aspectos gerais relacionados à saliva, bem como a presença de halogênios e suas espécies. Na segunda parte, serão abordados brevemente os conceitos de especiação, como também a análise de especiação de halogênios. Na última parte, serão apresentadas as técnicas analíticas mais comumente utilizadas para a determinação de halogênios e suas espécies, com destaque para as utilizadas neste trabalho.

2.1 A SALIVA HUMANA

A saliva é um fluido aquoso encontrado na cavidade oral e sua composição, apresenta uma mistura complexa de produtos de secreção (orgânicos e inorgânicos) principalmente das glândulas salivares, glândulas sublinguais, glândulas submandibulares e parótidas. É um dos fluidos biológicos mais complexos, versáteis e importantes do corpo humano, fornecendo uma ampla gama de informações fisiológicas. No trato digestivo, a saliva desempenha um papel importante no processo digestivo e na proteção das células gástricas. Na cavidade bucal, participa da mastigação, fala, deglutição, sensibilidade gustativa e entre outras atividades (LIMA et al., 2010).

A saliva desempenha diversas funções dentre elas: *i)* a excretora, como por exemplo, como demonstrado para a penicilina e metais como chumbo e mercúrio; *ii)* a protetora e antimicrobiana, devido à ação da imunoglobulina A (IgA); *iii)* a de preparo do bolo alimentar e a umectante, pela presença de mucina e água; e, *iv)* a cicatrizante e de remineralização, através da ação da enzima salivar lisozima e pela presença de cálcio e fosfato (KIGNEL, 2013).

O componente majoritário da saliva é a água, a qual, representa 99% de sua composição (DIAZ-ARNOLD e MAREK, 2002). Os componentes sólidos, moléculas orgânicas e inorgânicas, encontram-se dissolvidos na água e variam de um indivíduo para outro, podendo variar diversas vezes durante o dia, no mesmo indivíduo. Um dos importantes componentes inorgânicos presentes na saliva são os íons cloreto. Estes auxiliam na ativação das enzimas salivares, amilase e lipase, que são responsáveis por quebrar as moléculas de carboidratos e lipídeos (KIGNEL, 2013). Além do cloro, outros componentes inorgânicos, como F, Br e I, podem desempenhar funções específicas. O flúor, pode atuar na precipitação de cristais, formando um revestimento mais resistente à cárie (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001). Bromo e iodo podem influenciar na produção da saliva, bem como na ativação da enzima α -amilase. Contudo, quando a saliva contém altas concentrações de Br e I, são relatados efeitos adversos, como doenças relacionadas à tireoide e insônia (MORI et al., 2012; NOVO et al., 2019).

Ao se tratar do volume de saliva produzido, em condições normais, é secretado em torno de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, totalizando cerca de 400 mL de saliva por dia.

Porém o volume secretado, bem como a composição, dependem dos sistemas endócrino e nervoso. Estresse e diabetes são alguns exemplos de disfunções em que a secreção salivar poderá ser alterada (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; KIGNEL, 2013).

2.2 ESPECIAÇÃO QUÍMICA

Alguns elementos são potencialmente tóxicos, outros são considerados essenciais, dependendo da forma química e/ou concentração em que se encontram. Assim, a caracterização completa de um elemento em um sistema bioquímico requer a elucidação de propriedades, como seu estado de oxidação e tipo de estrutura química, por exemplo, se está presente como um organocomposto ou como uma substância inorgânica (TEMPLETON DOUGLAS et al., 2000). Tendo em vista esses aspectos, há um crescente interesse em elucidar as diferentes formas químicas dos elementos presentes em sistemas biológicos, ambientais, dentre outros (MOREIRA, 2013).

Diante disso e da generalização dos termos utilizados, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) estabeleceu uma série de termos para direcionar a comunidade científica (MELLO et al., 2016; NORDBERG, DUFFUS e TEMPLETON, 2004). A seguir, serão tratados alguns deles.

2.2.1 Análise de especiação

A IUPAC define a análise de especiação como a atividade analítica para identificar e/ou determinar as quantidades de uma ou mais espécies em uma amostra (NORDBERG, DUFFUS e TEMPLETON, 2004).

As aplicações atuais da análise de especiação produzem informações relevantes em diversas áreas, como química dos alimentos, química ambiental, saúde e geologia. Para além disso, a especiação é uma importante ferramenta na investigação da toxicidade, da disponibilidade dos elementos e dos efeitos de algumas espécies sobre outras, onde a informação da concentração total de elementos pode ser insuficiente (LUND, 1990).

Cabe salientar que em análise de especiação, o equilíbrio químico estabelecido entre as formas existentes na amostra deve ser mantido desde a coleta até a análise. Dessa forma, para se obter resultados confiáveis, a metodologia empregada precisa garantir a preservação da integridade das espécies na amostra durante toda a sequência analítica (amostragem, armazenagem, pré-tratamento e/ou preparo e determinação) (EMONS et al., 2003; MELLO et al., 2016).

2.2.2 Análise de especiação de halogênios

Nos últimos anos, aliado aos avanços na instrumentação para a quantificação de espécies em concentrações cada vez mais baixas e o desenvolvimento de alternativas para acoplamento de técnicas de separação e detecção, foi desenvolvido um número significativo de métodos para a análise de especiação. Contudo, métodos que buscam a análise de especiação de halogênios são ainda poucos explorados, o que torna este trabalho um desafio (HARRINGTON et al., 2015).

Na grande maioria dos trabalhos que envolvem a análise de especiação de halogênios, são relatados estudos envolvendo compostos orgânicos contendo halogênios de uso específico em certas áreas. Compostos como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), as bifenilas policloradas (PCBs) e as dioxinas cloradas são responsáveis pela poluição ambiental devido ao crescente uso como agentes sanitários e como diluentes para pulverização de herbicidas e pesticidas (WUILLOUD e ALTAMIRANO, 2005).

A análise de especiação de halogênios é de suma importância, principalmente em estudos nutricionais e farmacêuticos. Além da conhecida função de cada um, foram relatados os efeitos das concentrações de Br sobre a absorção de I pela glândula da tireoide. Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos com técnicas hífenadas, que envolvem o acoplamento de técnicas de separação seletivas com detectores sensíveis. Para trabalhos envolvendo a identificação de halogênios e suas espécies, comumente são empregadas as técnicas de cromatografia de íons ou eletroforese, acopladas à detectores de condutividade, ultravioleta e/ou espectrometria de massa. Em um trabalho desenvolvido por Mori *et al.*, os autores relataram a necessidade de conhecimento das espécies presentes nas amostras,

demonstrando que há uma inibição da absorção de iodo pela glândula tireoide pelo consumo de alimentos com alta concentração de nitrato (MOREIRA, 2013; MORI et al., 2012). Este é um dos indícios que demonstra e comprova a necessidade da análise de especificação de halogênios.

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE HALOGÊNIOS E SUAS ESPÉCIES

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a determinação da concentração total de halogênios, como a NAA, a fluorescência de raios-X (XRF), a espectrometria de absorção molecular, a ISE, a ICP-OES, a ICP-MS e a IC (MELLO et al., 2013).

Um aspecto relevante ao uso de técnicas espectrométricas com nebulização convencional, é a necessidade de uma etapa prévia de preparo de amostras, o que para halogênios normalmente representa um desafio analítico, principalmente pelo risco de perdas e contaminação. Para viabilizar a determinação multielementar empregando técnicas espectrométricas é desejável que a amostra seja solubilizada e que sua matriz seja totalmente decomposta. Dessa forma, é necessário um preparo de amostra adequado que seja capaz de fornecer digeridos isentos de material não dissolvido, com baixo teor de carbono e, preferencialmente, com baixa acidez. É importante ressaltar que o digerido obtido nessas conduções é inadequado à análise de especificação, já que foram utilizadas condições extremas no preparo de amostras (MELLO *et al.*, 2016).

Embora a concentração total de elementos seja útil em muitas áreas, a determinação das espécies é de suma importância, pois a toxicidade, a mobilidade, a biodisponibilidade e a bioacumulação dependem das espécies químicas. A seguir serão discutidas, brevemente, as principais técnicas multielementares empregadas para a determinação da concentração total de halogênios e, logo após, será discutida a técnica de IC, empregada neste trabalho.

2.3.1 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A técnica de ICP-MS baseia-se na separação de acordo com a relação massa-carga (m/z). Os íons produzidos são submetidos a um campo de rádio frequência (RF) e corrente contínua (CC), de modo que apenas os íons de m/z

correspondentes às condições ajustadas são capazes de serem conduzidos pelo quadrupolo (MONTASER, 1998; SNOOK, 1992), atingindo o detector. Esta técnica é amplamente utilizada para determinação da concentração total de halogênios, visto que possui baixos limites de detecção (LD), elevada sensibilidade e capacidade multielementar (MESKO et al., 2016). Entretanto, existem algumas limitações associadas ao uso da ICP-MS para quantificação de halogênios, principalmente quanto à razão sinal/ruído e presença de interferências, dadas as baixas razões massa/carga de flúor, cloro e bromo, além de compostos poliatômicos resultantes da combinação com argônio, no caso de bromo. Além disso, o alto potencial de ionização desses elementos, o que é uma limitação do uso da fonte de plasma de Ar, principalmente para flúor, prejudica a sensibilidade (MELLO et al., 2013). Ainda, há relatos de que a presença de carbono pode causar um acréscimo de sinal, assim, promovendo resultados com exatidão comprometida. Ademais, algumas interferências relacionadas a nebulização já são relatadas na literatura, como por exemplo o efeito de memória, particularmente para a determinação de iodo. Isto pode ser evitado com o uso de solução adequada, como por exemplo soluções alcalinas (VANHOE et al., 1993).

2.3.2. Outras técnicas analíticas

A técnica de ICP-OES é baseada na emissão da radiação dos átomos e íons em comprimentos de onda na região do ultravioleta e visível (180 a 800 nm). Essa emissão ocorre como consequência da absorção de energia fornecida aos átomos/íons por um plasma, geralmente de argônio (HOU, JONES e DONATI, 2016). Esta técnica, porém, não é tão frequentemente utilizada para determinação de halogênios, por ser suscetível à interferências devido à absorção da radiação pelos componentes do ar, nos comprimentos de onda próximos às linhas de emissão dos halogênios (abaixo de 190 nm). Porém, quando há uma alteração na configuração do equipamento (sistema óptico evacuado e/ou purgado), a determinação adequada é possível.

Outra alternativa, a potenciometria com ISE, é utilizada principalmente para determinação de F^- , embora também possa ser empregada para a quantificação de Cl^- , Br^- ou I^- , com eletrodos de membrana específicos para cada um. É uma técnica

de relativo baixo custo e simplicidade de uso. Como desvantagens, esta técnica apresenta LDs piores quando comparada às demais e é propensa à interferências de outros íons, tais como OH^- (PICOLOTO et al., 2019).

Já a NAA, é uma técnica de análise elementar baseada na formação de radioisótopos, através de reações nucleares entre nêutrons e os átomos dos isótopos dos elementos que constituem a amostra. Dessa forma, a quantificação é feita em função da taxa de emissão da radiação gama (γ) de cada radioisótopo (GREENBERG, BODE e DE NADAI FERNANDES, 2011). A NAA se destaca em relação às outras técnicas devido à alta sensibilidade, minimização de interferências causadas pela matriz e exigência de mínimo pré-tratamento, bem como o fato de ser uma técnica não destrutiva e que não necessita calibração. Contudo, o uso da NAA não é comum entre os laboratórios, devido à necessidade de um reator nuclear, ao elevado tempo de análise e a susceptibilidade à interferências (ANIM, SAMUEL e YAW, 2010; MARGOSIS, TANNER e LAMBERT, 1971).

Para o caso da espectrometria de absorção atômica a determinação não pode ser feita diretamente para halogênios, pois os comprimentos de onda de absorção para esses elementos são inferiores a 190 nm e esta é uma região do espectro eletromagnético com muitas interferências espectrais (MELLO et al., 2013). Entretanto, uma alternativa que vem sendo utilizada é a determinação indireta destes elementos por espectrometria de absorção molecular, em atomizadores com chama ou forno de grafite. Neste caso, uma série de moléculas pode ser utilizada, tais como AlBr e CaBr para Br, AlCl , GaCl , InCl e MgCl para Cl e BaI para I. Porém, esta técnica é passível de interferências; por exemplo a determinação de I pode ser dificultada devido à alta concentração de Cl, uma vez que pode ocorrer uma competição entre os analitos durante a formação das moléculas (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2009).

2.3.3 Cromatografia de íons

De forma geral, a terminologia usada para a classificação das técnicas cromatográficas é baseada nos mecanismos de separação/retenção utilizados. A cromatografia de íons (IC) é uma exceção, pois o nome foi derivado da classe de analitos separados e não do tipo de interação cromatográfica (NESTERENKO e

PAULL, 2017). Basicamente, a IC consiste na interação dos componentes da amostra com a fase móvel e com a fase estacionária contendo grupos funcionais capazes de promover seletivamente a interação cátion-ânion, levando a uma condição de equilíbrio. Os grupos funcionais comumente presentes nas fases estacionárias, mais utilizados nas separações, são grupos de ácido sulfônico e grupos de amônio quaternário, para a separação de cátions e de ânions, respectivamente. Assim, a separação de espécies catiônicas ou aniônicas, tais como os halogênios e suas espécies, pode ser feita em uma única corrida cromatográfica.

O detector comumente utilizado em IC é o detector por condutividade. O princípio de detecção se baseia na diferença de condutividade do eluente e do eluente contendo o íon, sendo a condutividade uma propriedade particular de cada íon. Pelo uso das técnicas de supressão, a condutividade de alguns eluentes pode ser reduzida, melhorando a sensibilidade da IC. Além do detector de condutividade, outros detectores podem ser empregados para detecção/quantificação de espécies iônicas, como o detector UV-Vis e de espectrometria de massa (MS). Tais detectores podem ser utilizados individualmente em um sistema cromatográfico, bem como em sequência, proporcionando maior quantidade de informação para o operador (GILCHRIST *et al.*, 2016; LÓPEZ-RUIZ, 2000). Na Tabela 1, estão resumidas as características principais de algumas aplicações da IC para a determinação de halogênios e suas espécies.

Tabela 1 - Características principais de alguns métodos usando a cromatografia de íons para determinação de halogênios e suas espécies em amostras diversas.

(continua)

Analitos	Amostra	Condições cromatográficas	Técnica	Referência
F ⁻ , ClO ₂ ⁻ , BrO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , ClO ₃ ⁻ , dicloroacetato, NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻	Solução de referência	Coluna: Metrosep A Supp 5 Fase móvel: 3,5 mmol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ Vazão: 0,7 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(METROHM, 2016)
F ⁻ , ClO ₂ ⁻ , BrO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , ClO ₃ ⁻ , glicolato, acetato, formiato, dicloroacetato, NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻	Solução de referência	Coluna: Metrosep A Supp 7 Fase móvel: 1,4 mmol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ + 5,0 mmol L ⁻¹ NaHCO ₃ Vazão: 1,0 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(METROHM, 2016)
F ⁻ , PO ₂ H ₂ , ClO ₂ ⁻ , BrO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , Br ⁻ , ClO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₃ ³⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , I ⁻	Solução de referência	Coluna: Metrosep A Supp 7 Fase móvel: 3,6 mmol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ Vazão: 0,8 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(METROHM, 2016)
DBPs	Água	Coluna: Dionex IonPac AG9/AS9 Fase móvel: 30 mmol L ⁻¹ NaOH + 120 mmol L ⁻¹ Vazão: 1,0 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(HAUTMAN e BOLYARD, 1992)
F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , I ⁻	Água	Coluna: Metrosep A Supp 5 Fase móvel: 3,2 mmol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ + 1 mmol L ⁻¹ NaHCO ₃ Vazão: 0,7 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(METROHM, 2016)

Tabela 1 - Características principais de algumas aplicações da cromatografia de íons para determinação de halogênios e suas espécies em amostras diversas.

(continua)

Analitos	Amostra	Condições cromatográficas	Técnica	Referência
F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , IO ₃ ⁻ , BrO ₃ ⁻ , ClO ₃ ⁻ , ClO ₄ ⁻ e haloacetatos	Água	Coluna: Dionex IonPac AS16 Fase móvel: Gradiente de NaOH (1-20 mmol L ⁻¹) Vazão: 0,3 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(BARRON, NESTERENKO e PAULL, 2005)
ClO ₂ ⁻ , BrO ₃ ⁻ , ClO ₃ ⁻ , IO ₃ ⁻	Água	Coluna: Dionex IonPac AG9-SC Fase móvel: NH ₄ NO ₃ em MeOH (9:1) Vazão: 0,5 mL min ⁻¹	IC-MS-MS	(CHARLES e PÉPIN, 1998)
BrO ₃ ⁻ , ClO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻	Água	Coluna: Metrosep Anion Dual 1 Fase móvel: 1 mmol L ⁻¹ ácido orto-ftálico Vazão: 1,0 mL min ⁻¹	IC-UV-Vis	(EL HADDAD et al., 2015)
F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , ortofosfato	Água	Coluna: Dionex IonPac AS17 Fase móvel: Gradiente de KOH (1-40 mmol L ⁻¹) Vazão: 1,5 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(JACKSON et al., 2000)
F ⁻ , acetato, formiato, Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻	Água de usina hidrelétrica	Coluna: Dionex IonPac AS15 Fase móvel: Gradiente de KOH (7-40 mmol L ⁻¹) Vazão: 0,5 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(LU et al., 2002)
Acetato, lactato, propianato, formiato, butirato, piruvato, valerato, F ⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , PO ₄ ³⁻	Saliva	Coluna: Dionex IonPac AG11-HC Fase móvel: H ₂ O deionizada (eluente A) + 100 mmol L ⁻¹ NaOH (eluente B) Vazão: 1,0 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(PARK et al., 2014)

Tabela 1 - Características principais de algumas aplicações da cromatografia de íons para determinação de halogênios e suas espécies em amostras diversas.

(conclusão)				
Analitos	Amostra	Condições cromatográficas	Técnica	Referência
Cl ⁻ , PO ₄ ³⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , tiocianato, acetato	Saliva	Colunas: Dionex IonPac AS-4A e ICE-AS5 Fase móvel: Inorgânico: 1,7 mmol L ⁻¹ NaHCO ₃ + 1,8 mmol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ + 100 mg L ⁻¹ p-cianofenol; Orgânico: 1,6 mmol L ⁻¹ ácido perfluorobutírico + 0,3 mmol L ⁻¹ NaOH Vazão: Inorgânico: 2 mL min ⁻¹ ; Orgânico: 0,3 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(CHEN, DARVELL e LEUNG, 2004)
Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , tiocianato, acetato, lactato, propionato, formiato	Saliva	Coluna: Dionex IonPac AS11-HC Fase móvel: 40 mmol L ⁻¹ NaOH (eluente A) e 1,0 mmol L ⁻¹ NaOH (eluente B) Vazão: 1,5 mL min ⁻¹	IC-condutividade	(CHEN et al., 2015)
Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , SCN ⁻ , F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻	Saliva	Colunas: Ânion: Dionex IonPac AS9-HC; Cátion: Dionex IonPac CS14 Fase móvel: Ânion: 9,0 mmol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ ; Cátion: 4 mmol L ⁻¹ ácido metanossulfônico + 5,45 mmol L ⁻¹ ácido pirofosfórico Vazão: 0,25 mL min ⁻¹	IC- condutividade	(DEMKOWSKA, POLKOWSKA e NAMIEŚNIK, 2008)
F ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , Br ⁻ , ClO ₂ ⁻ , ClO ₃ ⁻	Sangue	Coluna: Metrosep A Supp 7 Fase móvel: 3,6 mmol L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ Vazão: 0,8 mL min ⁻¹	IC- condutividade	(HE et al., 2019)

Pode-se observar o quão versátil é a IC para a determinação de halogênios em diversas matrizes, incluindo a saliva. Entretanto, é possível notar que a maioria dos trabalhos é aplicado à água, o que, em muitos dos casos, simplifica os métodos. Ao se tratar da saliva, por possuir uma constituição mais complexa, como as proteínas e as enzimas, é necessário um cuidado prévio para não interferir na separação das espécies desejadas.

Dessa forma, tendo em vista que a análise de especiação de halogênios é pouco explorada, fica ressaltada a importância do desenvolvimento do presente trabalho. Apesar de alguns trabalhos já terem explorados a IC, para amostras de saliva. Somente cloreto (CHEN et al., 2015; CHEN, DARVELL e LEUNG, 2004; DEMKOWSKA, POLKOWSKA e NAMIEŚNIK, 2008; PARK et al., 2014), fluoreto (DEMKOWSKA, POLKOWSKA e NAMIEŚNIK, 2008; PARK et al., 2014) e brometo (DEMKOWSKA, POLKOWSKA e NAMIEŚNIK, 2008) estiveram entre as espécies halogenadas relatadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta sessão serão descritos os equipamentos, os reagentes e as amostras, utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, serão descritos os procedimentos e o modo de avaliação dos parâmetros cromatográficos.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Foram avaliados dois sistemas de cromatografia de íons para a separação das seguintes espécies: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , ClO_3^- , ClO_4^- , BrO_3^- , IO_3^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e $C_2H_3O_2^-$. Para um melhor entendimento, os sistemas cromatográficos foram denominados “Sistema IC 1” e “Sistema IC 2” e assim serão tratados ao longo da discussão.

O “Sistema IC 1” foi constituído de um cromatógrafo de íons (MagIC Professional 850, Metrohm) equipado com um detector de condutividade (819 IC Detector, Metrohm), amostrador automático com capacidade para 112 amostras (858 *Professional Sampler Processor*, Metrohm) e módulo de supressão química (833 *Suppressor Unit*, Metrohm). As colunas de troca aniônica utilizadas foram Metrosep A Supp 7 e Metrosep A Supp 5 (Metrohm). Ambas as colunas são preenchidas com grupos de amônio quaternário suportados em poli (álcool vinílico) com 250 x 4 mm de diâmetro interno, 5 μ m de diâmetro de partícula e uma coluna de guarda com o mesmo preenchimento (modelo Metrosep A Supp Guard 4/5, Metrohm). Uma alça de amostragem de 100 μ L foi utilizada para injeção da amostra.

O “Sistema IC 2” foi um cromatógrafo de íons (Dionex ICS 5000⁺) equipado com um módulo de duas bombas, uma isocrática e outra por gradiente (DP 5000⁺ *dual gradiente/isocratic pump*), um compartimento para duas colunas e dois detectores de condutividade (DC *detector and chromatography*), um amostrador automático (AS-AP *autosampler*), dois detectores de condutividade (ICS-5000 *Analytical CD Conductivity Detector*), um compartimento com detector na região do visível e um detector na região do ultravioleta (ICS-Series *Variable Wavelength Detector* VWD), além de sistema de geração de fase móvel (EG *eluent generator*) com cartucho de KOH (EGC 500 KOH RFIC™ & HPIC™). Foi utilizada uma coluna analítica de troca aniônica Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4 μ m (2 x 250 mm), pré-coluna Dionex IonPac AGH11-HC-4 μ m (2 x 50 mm), com modo de supressão aniônica eletrolítica (Dionex AERS™ 500 2 mm *Anion Electrolytically Regenerated Suppressor*). O sistema possui, também, um detector por espectrometria de massa (MSQPlus *single quadrupole mass spectrometer*) equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI), com bomba auxiliar para limpeza da interface (AXP-MS *auxiliary pump*). Apesar de não estarem inseridos resultados experimentais com uso

deste detector nessa dissertação, é importante informar que seu uso estava dentro dos objetivos e que algumas otimizações iniciais puderam ser feitas, porém, em função de o equipamento ter apresentado problemas que exigiram sua manutenção, o desenvolvimento do método não pode ser finalizado.

Um forno de micro-ondas (Multiwave 3000[®], Anton Paar, Áustria) equipado com 8 frascos de quartzo com volume interno de 80 mL foi utilizado para a dissolução alcalina assistida por micro-ondas, para determinação da concentração total de F, Cl, Br e I. As condições máximas de temperatura, pressão e potência foram utilizadas conforme determinação do fabricante, sendo 280 °C, 80 bar e 1400 W, respectivamente.

A determinação de Cl, Br e I total foi feita em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo ELAN[®] DRC II, PerkinElmer-SCIEX, EUA), equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard, EUA), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro. Para a determinação de C foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, modelo Optima 4300 DV, PerkinElmer, EUA). O espectrômetro foi equipado com tocha de quartzo (modelo Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Austrália) e com tubo injetor de 2,5 mm de diâmetro interno e nebulizador GemCone[®], com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália).

As condições operacionais dos equipamentos de ICP-MS e ICP-OES estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais para a determinação elementar por ICP-MS e ICP-OES.

Parâmetro	ICP-MS	ICP-OES
Potência de radiofrequência, W	1300	1400
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	15,0	15,0
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	1,20	0,20
Vazão do gás nebulizador, L min ⁻¹	1,15	0,7
Câmara de nebulização, tipo	Ciclônica	Ciclônica
Nebulizador, tipo	Concêntrico	GemCone®
Analito	Isótopo, m/z	Linha de emissão, nm
C ^a	-	193,030 (I)
Cl	35	-
Br	79	-
I	127	-
Y ^b	-	371,029 (II)

^a C determinado nos digeridos e na saliva *in natura*

^b Y foi utilizado como padrão interno para a determinação de C

(I) Linha de emissão atômica

(II) Linha de emissão iônica

Para descontaminação foi utilizado um banho de ultrassom (Transsonic TI-H-5, Elma, Alemanha). Para pesagem das amostras e padrões foi utilizada uma balança analítica (modelo AY 220, Shimadzu, Japão) com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. A secagem dos frascos para coleta de amostra foi feita em capela de fluxo laminar classe 100 (modelo CFLH-12, Veco do Brasil, Brasil).

Para avaliação do comportamento das espécies perante processos de filtração foram utilizados sete tipos de membrana, sendo elas: polietersulfona (PES, Millex™, Merck, Alemanha), politetrafluoretileno (PTFE, Chromafil®Xtra, Macherey-Nagel, Alemanha), nylon poliamida (PAN, Chromafil®Xtra, Macherey-Nagel, Alemanha), acetato de celulose (CA, Chromafil®Xtra, Macherey-Nagel, Alemanha), fluoreto de polivinilideno (PVDF, Filtrilo, Brasil), éter de celulose misto (MCE, Filtrilo, Brasil) e polipropileno (PP, Sorblin Adsorbents, Brasil).

Para avaliar os resultados e selecionar os parâmetros avaliados, foram realizados testes estatísticos, utilizando o software GraphPad InStat, versão 3.0, 1997 (GraphPad InStat Software, EUA). A comparação de médias foi feita utilizando teste *t-student*, com nível de confiança de 95%. Dessa forma, em todas as situações em que se faz menção ao tratamento estatístico no decorrer do texto, este foi feito com nível de confiança de 95%.

3.2 REAGENTES

A água utilizada no preparo das soluções de referência, da fase móvel, bem como para a diluição das amostras, passou por um processo de destilação, deionização em uma coluna de troca iônica e, finalmente, purificação em um sistema Milli-Q® (18,2 MΩ cm, Millipore Corp., EUA).

A avaliação da fase móvel no “Sistema IC 1” foi feita através da dissolução de carbonato de sódio (Na₂CO₃, Merck, Alemanha) e/ou de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Merck, Alemanha) em água (1,4; 3,2; 3,6 ou 7,2 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃ e 1 ou 5 mmol L⁻¹ de NaHCO₃). A solução utilizada para regeneração da coluna de supressão química do “Sistema IC 1” foi preparada a partir da diluição do ácido sulfúrico (H₂SO₄, Merck) em água, na concentração de 100 mmol L⁻¹. Já a fase móvel para o “Sistema IC 2” é gerada através de um cartucho comercializado pelo fabricante (CAS No 1310-58-3, EGC 500 KOH RFIC™ & HPIC™, EUA). Os cartuchos de geração de eluente (EG) produzem eletroliticamente KOH de alta pureza com a adição da água.

Foram investigadas oito espécies de halogênios e outros ânions comuns, utilizando padrões, grau P.A., conforme segue: fluoreto de sódio (NaF, Merck, Alemanha), cloreto de sódio (NaCl, Merck, Alemanha), brometo de potássio (KBr, Merck, Alemanha), iodeto de potássio (KI, Merck, Alemanha), clorato de potássio (KClO₃, Merck, Alemanha), perclorato de potássio (KClO₄, Carlo Erba, França), bromato de potássio (KBrO₃, Merck, Alemanha), iodato de potássio (KIO₃, Inlab, Brasil), nitrito de sódio (NaNO₂, Merck, Alemanha), nitrato de potássio (KNO₃, Merck, Alemanha), sulfato de potássio (K₂SO₄, Merck, Alemanha) e ácido acético (C₂H₃O₂, Fluka, Sigma-Aldrich, Alemanha). Ainda, foi utilizada acetona (C₃H₆O, Vetec, Brasil) como modificador de fase móvel, em uma avaliação pontual. Para limpeza da interface do detector MS foi utilizada acetonitrila (C₂H₃N, Merck, Alemanha) e água, na proporção 1:1.

Uma solução 25 mmol L⁻¹ de amônia (NH₃ 28%, Merck, Alemanha) foi utilizada para dissolução alcalina assistida por micro-ondas. A determinação de Cl, Br e I por ICP-MS foi feita mediante calibração externa utilizando solução de referência preparada em amônia diluída (10 mmol L⁻¹). Para isso, foram utilizadas soluções estoque de padrões monoelementares de 1000 mg L⁻¹ de NaCl, KBr e KI

(Merck, Alemanha). As curvas de calibração para Cl, Br e I foram de 1 a 10 mg L⁻¹, de 1 a 10 µg L⁻¹ e de 0,1 a 1 µg L⁻¹, respectivamente. Para a determinação de carbono, a curva de calibração foi feita pela dissolução de ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₇.H₂O, Vetec, Brasil) em água (1000 mg L⁻¹). Nesse caso, ítrio foi utilizado como padrão interno (1000 mg L⁻¹, Fluka, EUA) na concentração final de 1 mg L⁻¹. Nas técnicas de ICP-OES e ICP-MS o plasma foi gerado com o uso de argônio de alta pureza (99,998%, White Martins, Brasil), também utilizado como gás de nebulização e gás auxiliar.

Ácido nítrico P.A. (HNO₃, 65%, Vetec) foi utilizado para todos os procedimentos gerais de descontaminação (solução 5% v/v) e concentrado para descontaminação dos frascos de quartzo do forno de micro-ondas. Para descontaminação dos frascos para coleta da amostra foram também utilizados etanol (C₂H₅OH, Vetec, Brasil) e água ultrapura.

3.3 AMOSTRAS

As amostras de saliva utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram coletadas de pessoas maiores de 18 anos e vinculadas ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA), as quais foram convidadas a participar da pesquisa de forma voluntária.

Seis voluntários coletaram as amostras de saliva em intervalos de 1 hora, durante 12 horas, em um frasco de polipropileno, resultando um volume final de aproximadamente 10 mL. As amostras foram identificadas de 1 a 5N para pessoas sem disfunções na glândula tireoide e 1S para pessoa com disfunção na tireoide. Ainda, as amostras foram armazenadas em geladeira, a 4 °C.

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Procedimentos de descontaminação

Os frascos de quartzo utilizados na dissolução foram descontaminados com 6 mL de HNO₃ concentrado sob aquecimento em forno de micro-ondas por 10 min, a 1400 W e 20 min a 0 W (etapa de resfriamento). Ao final do programa de

descontaminação, os frascos foram lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido.

Os frascos utilizados para recolhimento das amostras de saliva foram descontaminados em banho de ultrassom com etanol e, em seguida, com água ultrapura durante 30 min cada. Após, foram secos em capela de fluxo laminar.

3.4.2 Determinação da concentração total de halogênios em saliva

A determinação da concentração total de halogênios foi feita seguindo método proposto por Novo *et al* utilizando a dissolução alcalina assistida por micro-ondas (NOVO *et al.*, 2019). Para este procedimento foram adicionados 500 μL de amostra no frasco de quartzo contendo 6 mL de solução de NH_3 (25 mmol L^{-1}) com auxílio de uma pipeta graduada, previamente descontaminada. Após o fechamento dos frascos e posicionamento dos mesmos no interior da cavidade do forno de micro-ondas, foi utilizado o seguinte programa de irradiação: *i*) 1000 W por 5 min (rampa), *ii*) 1000 W por 10 min, e *iii*) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Após o término do programa de irradiação e o resfriamento dos frascos, a solução resultante da dissolução foi transferida para frascos volumétricos e avolumada com H_2O ultrapura a 20 mL para posterior determinação por ICP-MS.

A concentração de C nessas soluções e nas amostras *in natura* foi determinada por ICP-OES. As amostras foram diluídas em HNO_3 5% e à diluição foi adicionado Y, como padrão interno (1 mg L^{-1}). Previamente à determinação, padrões de calibração e amostras foram purgados durante 2 min com argônio, para eliminação do CO_2 dissolvido evitando a formação de ácido carbônico, que poderia levar a resultados superestimados.

3.4.3 Avaliação da estabilidade de halogênios e suas espécies

Para esta avaliação foram investigadas diferentes maneiras de armazenar a amostra. Os modos de armazenamento empregados foram *i*) saliva em meio alcalino (10 mmol L^{-1} de NH_3) e *ii*) saliva *in natura*.

Para se obter um volume considerável de amostra para realização deste estudo, foi realizada uma nova amostragem dos voluntários e ao final da coleta foi feita a junção das amostras, para obter um volume suficiente. Em seguida, estas

foram divididas em duas porções, sendo uma conservada em meio alcalino e a outra mantida *in natura*. Após serem preparadas, as amostras foram armazenadas em geladeira, a 4 °C.

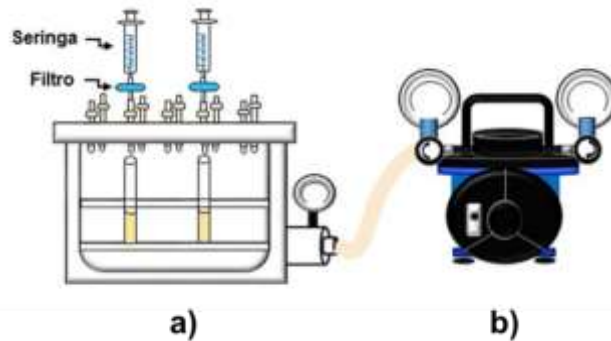
Para Cl, Br e I, as quantificações foram feitas por ICP-MS de 1 a 90 dias. Já para F, a quantificação foi feita por ISE por um período de até 8 dias, em função do consumo elevado de amostra para este estudo.

3.4.4 Avaliação do procedimento de filtração sobre a concentração de halogênios

O efeito de um processo de filtração das amostras sobre a concentração de halogênios e, até mesmo, o risco de contaminação nesta etapa, foram avaliados. Para tal, uma amostra e soluções de referência multiespécies (500 µg L⁻¹) foram filtradas e a concentração total de halogênios foi determinada.

Para esta avaliação foram utilizados sete tipos de filtros, sendo eles: polietersulfona (PES, φ 0,45 µm e ø 25 mm), politetrafluoretileno (PTFE, φ 0,20 µm ø 25 mm, φ 0,22 µm ø 25 mm e φ 0,45 µm ø 13 mm), nylon poliamida (PAN, φ 0,45 µm ø 25 mm), acetato de celulose (CA, φ 0,45 µm ø 25 mm), fluoreto de polivinilideno (PVDF, φ 0,22 µm ø 25 mm e φ 0,45 µm ø 13 mm), éter de celulose misto (MCE, φ 0,22 µm ø 25 mm e φ 0,45 µm ø 13 mm) e polipropileno (PP, φ 0,22 µm ø 25 mm). Para auxiliar na filtração, foi utilizado um sistema de manifold juntamente com a seringa e o filtro, mostrados na Figura 1. Com detalhe, na Figura 1a é possível observar o sistema *manifold* abaixo de um conjunto com a seringa e o filtro e na Figura 1b, é possível notar a bomba de vácuo utilizada para facilitar a percolação da amostra pelo filtro (produzindo vácuo no interior do *manifold*). A quantificação das amostras e padrões filtrados foi feita por ICP-MS. Para fins de identificação, a saliva e a solução multiespécies foram injetadas no “Sistema IC 2”.

Figura 1 - Sistema utilizado para a avaliação do procedimento de filtração composto por **a)** manifold e **b)** bomba de vácuo (cortesia Kéllen Anschau).

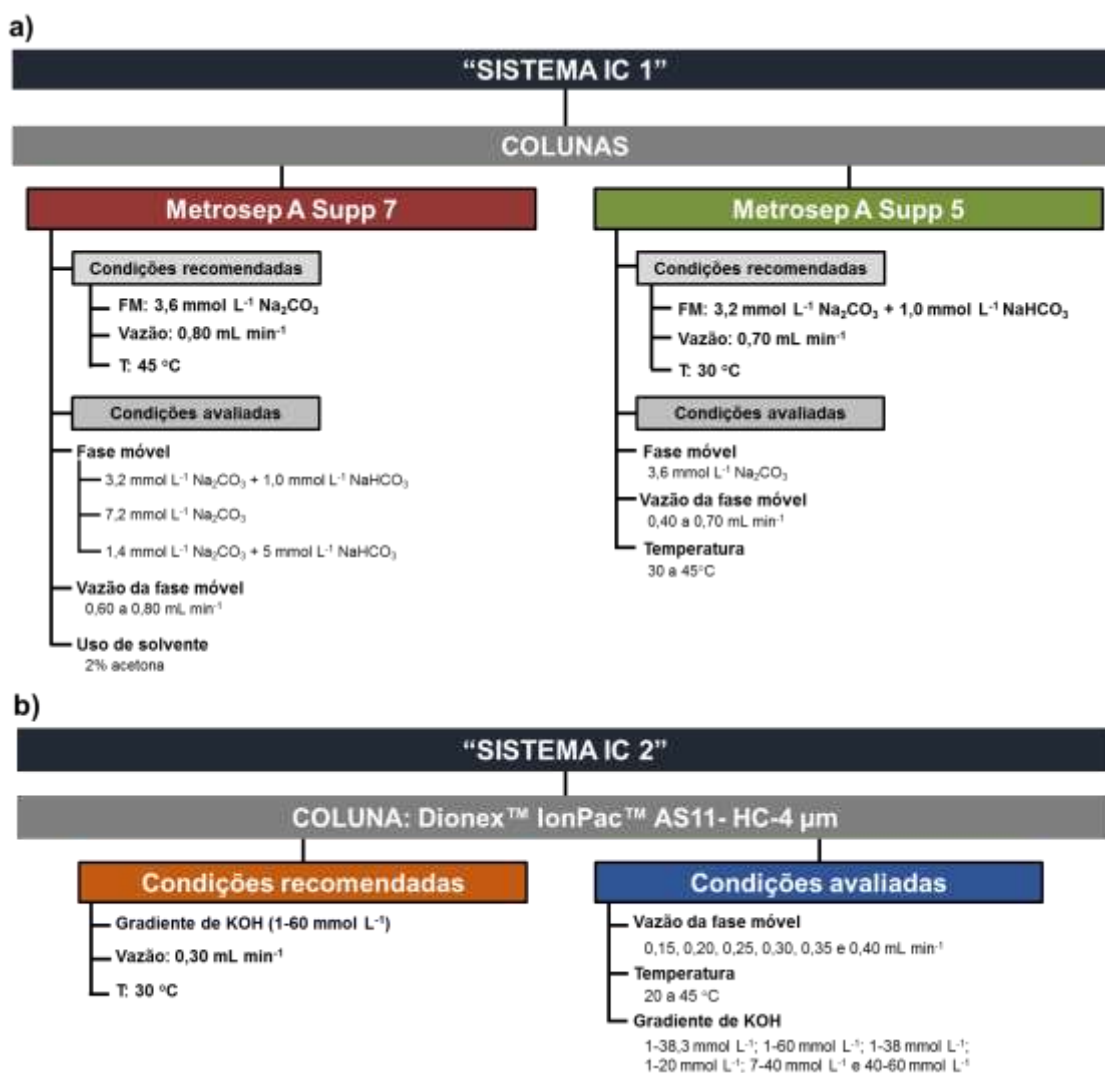


3.5 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE HALOGÊNIO EM SALIVA

Para determinações uso da IC foram avaliados os parâmetros relacionados ao método cromatográfico, tais como colunas cromatográficas, composição e vazão de fase móvel, uso de modificador e temperatura no compartimento da coluna. As avaliações foram feitas com injeções sucessivas de solução multiespécies, contendo espécies halogenadas e espécies de presença comum em fluídos biológicos, totalizando 12 espécies (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , ClO_3^- , BrO_3^- , IO_3^- , ClO_4^- , NO_2^- , NO_3^- , $C_2H_3O_2^-$ e SO_4^{2-}), nas concentrações de 250 ou 500 $\mu g L^{-1}$. A seguir estão descritas as avaliações realizadas, em um primeiro momento, no “Sistema IC 1” e, após, no “Sistema IC 2”.

Os fluxogramas na Figura 2 resumem as avaliações propostas nos dois sistemas.

Figura 2 - Fluxogramas demonstrando as avaliações feitas no a) “Sistema IC 1” e no b) “Sistema IC 2”.



3.5.1 Avaliação do “Sistema IC 1”

3.5.1.1 Avaliação de parâmetros de separação com a coluna Metrosep A Supp 7

Inicialmente, foram avaliadas as condições recomendadas pelo fabricante: 3,6 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃, na vazão de 0,8 mL min⁻¹ e temperatura do compartimento da coluna em 45 °C.

3.5.1.1.1 Vazão da fase móvel

Para melhorar a separação, foi investigada a vazão de fase móvel (3,6 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃) de 0,6 a 0,8 mL min⁻¹, a 45 °C. Os limites superiores de vazão de fase

móvel foram definidos de acordo com a pressão máxima atingida na coluna (15 MPa).

3.5.1.1.2 Composição da fase móvel

Foram avaliadas diferentes proporções de Na_2CO_3 e NaHCO_3 ($1,4 \text{ mmol L}^{-1} + 5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $3,2 \text{ mmol L}^{-1} + 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e, também, foi avaliado o uso de Na_2CO_3 ($3,6$ e $7,2 \text{ mmol L}^{-1}$), sem NaHCO_3 , a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Também, foi investigado o uso de acetona (2%) como modificador da fase móvel de Na_2CO_3 ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$), a $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.1.2 Avaliação de parâmetros de separação com a coluna Metrosep A Supp 5

Buscando melhorar a separação, foi investigada outra coluna analítica para ânions no “Sistema IC 1”, a coluna Metrosep A Supp 5. No primeiro momento foram utilizadas as condições recomendadas pelo fabricante (METROHM, 2016), sendo de Na_2CO_3 $3,2 \text{ mmol L}^{-1} + \text{NaHCO}_3$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, na vazão $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

3.5.1.2.1 Composição da fase móvel

Além da composição de fase móvel recomendada, foi investigado também o uso de Na_2CO_3 $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$, recomendado para a coluna Metrosep A Supp 7, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e a $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.1.2.2 Vazão da fase móvel

A vazão de fase móvel Na_2CO_3 ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$) foi investigada de $0,4$ a $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, a $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.1.2.3 Temperatura do compartimento da coluna

A temperatura do compartimento da coluna foi avaliada de 30 a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, usando Na_2CO_3 ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$) a $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

3.5.2 Avaliação do “Sistema IC 2”

No “Sistema IC 2” as avaliações iniciais também foram feitas com as condições recomendadas pelo fabricante (THERMO, 2013). Desse modo, foi utilizado o seguinte programa de eluição por gradiente, descrito na Tabela 3, na temperatura do compartimento da coluna em 30 °C e vazão de fase móvel de 0,3 mL min⁻¹. Todas as avaliações no “Sistema IC 2” foram utilizando a coluna Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4μm.

Tabela 3 - Programa de eluição utilizada para a determinação de halogênios e suas espécies com o “Sistema IC 2”.

Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹
1	0	0
2	7	1,0
3	12	8,0
4	14	8,0
5	16	15,0
6	20	17,0
7	25	30,0
8	29	40,0
9	33	60,0
10	35	60,0
11	36	1,0

Após aplicadas as condições recomendadas, foram avaliadas outras condições cromatográficas deste sistema.

3.5.2.1 Avaliação da eluição por gradiente

Foram avaliados distintos programas de eluição por gradiente com concentrações que variam de 1 a 60 mmol L⁻¹ de KOH, com base em trabalhos previamente publicados para ânions em matrizes diversas (JACKSON *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2002; THERMO, 2013; THERMO, 2015; THERMO, 2015). A temperatura no compartimento da coluna foi de 35 °C e a vazão da fase móvel de 0,3 mL min⁻¹ em todos os programas. Os programas variaram de 1 a 60 mmol L⁻¹ de KOH e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Programas de eluição por gradiente avaliados.

(continua)

Programas					
Programa a)			Programa c)		
Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L⁻¹	Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L⁻¹
1	7	1,0	1	7	1,0
2	12	8,0	2	10,8	10,0
3	16	15,0	3	11,9	1,0
4	20	17,0	4	12	8,0
5	29	20,0	5	16	15,0
6	38	60,0	6	20	17,0
7	45	60,0	7	22,8	30,0
8	46	1,0	8	25	17,0
Programa b)			9	29	20,0
Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L⁻¹	10	38	60,0
1	7	1,0	11	45	60,0
2	10,8	20,0	12	46	1,0
3	11,9	1,0	Programa d)		
4	12	8,0	Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L⁻¹
5	29	20,0	1	1	1,0
6	16	15,0	2	1,99	38,0
7	20	17,0	3	2	1,0
8	22,8	45,0	4	15	5,0
9	25	17,0	5	29	26,0
10	29	20,0	6	29,1	38,0
11	38	60,0	7	46	1,0
12	45	60,0			
13	46	1,0			

Tabela 4 - Programas de eluição por gradiente avaliados.

(conclusão)

Programas					
Programa e)			Programa g)		
Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹	Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹
1	7	1,0	1	7	1,0
2	10,8	20,0	2	10,8	20,0
3	11,9	1,0	3	11,9	1,0
4	12	8,0	4	16	15,0
5	16	15,0	5	20	17,0
6	20	17,0	6	22,8	45,0
7	22,8	45,0	7	25	17,0
8	25	17,0	8	29	20,0
9	29	20,0	9	38	60,0
10	38	60,0	10	45	60,0
11	45	60,0	11	46	1,0
12	46	1,0			

Programa f)			Programa h)		
Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹	Etapa	Tempo, min	KOH, mmol L ⁻¹
1	0	40,0	1	0	40,0
2	0,01	7,0	2	0,01	7,0
3	8	7,0	3	3	7,0
4	15	40,0	4	15	40,0
5	30	40,0	5	28	60,0
			6	30	40,0

3.5.2.2 Avaliação da temperatura do compartimento da coluna

A temperatura ótima do compartimento da coluna na separação por gradiente de KOH (1 a 60 mmol L⁻¹) foi investigada na vazão de fase móvel de 0,3 mL min⁻¹. Para estudo, foi utilizado o programa a) da Tabela 4.

3.5.2.3 Avaliação da vazão da fase móvel

Foi avaliada a vazão da fase móvel nas condições anteriormente otimizadas, sendo programa de eluição por gradiente de 1 a 60 mmol L⁻¹ de KOH e temperatura do compartimento da coluna em 35 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para a determinação da concentração total de halogênios na saliva, a avaliação da estabilidade de halogênios e suas espécies, a avaliação da filtração sobre a concentração de halogênios e o estudo das condições cromatográficas para a análise de especiação de halogênios em diferentes sistemas cromatográficos. A avaliação dos resultados, discussão e seleção de parâmetros foi baseada em testes estatísticos, para a comparação de médias (teste t-student, com nível de confiança de 95%). Ainda, para avaliação das condições cromatográficas, utilizou-se a comparação entre os picos prezando por uma resolução adequada e buscando reprodutibilidade (t_R não variando mais de 5% entre as corridas).

4.1 DOS DESAFIOS DA AMOSTRA

A coleta de amostra de saliva é considerada por muitos como simples, por ser indolor, de baixo custo e relativamente fácil, tendo em vista que o próprio indivíduo pode realizar a mesma. Entretanto, cabe salientar, que apesar de já existirem alguns métodos para coleta e armazenamento deste tipo de amostra, ainda há uma série de incertezas quanto a representatividade destes resultados, visto que as características dessa amostra podem ser alteradas por fatores exógenos (LIMA et al., 2010; NOVO et al., 2019).

Outro aspecto importante a ser mencionado é a quantidade amostrada, já que o indivíduo produz apenas cerca de 400 mL por dia e esta quantidade varia de um indivíduo para outro. Normalmente, para diagnósticos, são coletados aproximadamente 2 mL. Porém, ao se tratar de um desenvolvimento de método são necessários, para compor o máximo de avaliações possíveis, um volume de amostra de cerca de 300 mL (CHOJNOWSKA et al., 2018). Para isso, foram necessárias coletas durante um período maior (12 h) e em alguns casos, mais de uma vez. Este fato prejudica a homogeneidade da amostra e contribui para a presença de material particulado, com variabilidade da amostra até mesmo para um mesmo indivíduo. Consequentemente, variações nos resultados obtidos podem ocorrer para amostras de um mesmo indivíduo, em coletas distintas.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE HALOGÊNIOS EM SALIVA

Considerando os recentes trabalhos desenvolvidos em preparo de amostra para saliva humana, foi selecionado um método para preparo das amostras e posterior determinação de Cl, Br e I total, sendo ele a dissolução alcalina assistida por micro-ondas. Esse método foi baseado no trabalho de Novo *et al.* conforme descrito no item 3.4.2 Determinação da concentração total de halogênios em saliva. As concentrações são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de Br, Cl e I em saliva por ICP-MS após dissolução alcalina assistida por micro-ondas (n = 3).

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)		
	Br	Cl	I
1N	2,80 ± 0,20	533 ± 16	0,113 ± 0,001
2N	8,91 ± 0,22	610 ± 24	0,616 ± 0,024
3N	3,17 ± 0,03	495 ± 6	0,362 ± 0,007
4N	2,82 ± 0,04	712 ± 7	0,184 ± 0,003
5N	1,29 ± 0,04	504 ± 13	0,140 ± 0,005
1S	2,61 ± 0,05	564 ± 16	0,206 ± 0,001

Pode-se perceber que os resultados obtidos por esse método são concordantes com os valores encontrados na literatura e tiveram pouca variabilidade entre os indivíduos, com exceção da amostra 2N, onde o procedimento de dissolução foi repetido e os resultados foram concordantes com os obtidos anteriormente. Diante disso, esses resultados foram considerados como valores de referência para a concentração total de Br, Cl e I.

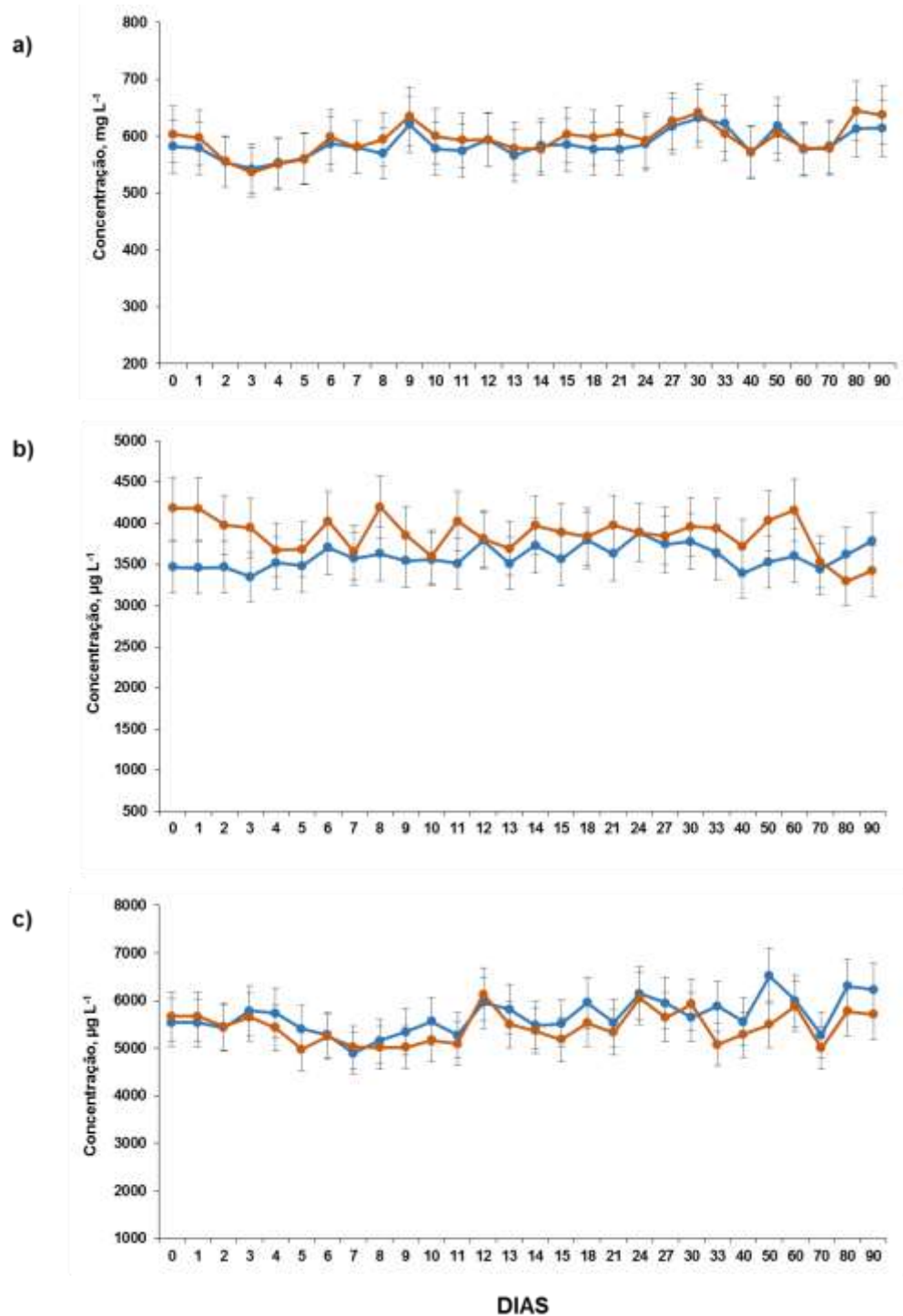
Uma vez que a concentração de carbono dissolvido é de suma importância tanto para a determinação de halogênios por ICP-MS como também para a análise de especiação por IC, já que o carbono pode provocar interferências no plasma e na separação cromatográfica, esta determinação foi feita. Assim, as amostras submetidas à dissolução alcalina, bem como as amostras *in natura*, tiveram seu teor de carbono determinado por ICP-OES conforme descrito no item 3.4.2 Determinação da concentração total de halogênios em saliva. Para as soluções resultantes da dissolução alcalina, os valores obtidos foram de, aproximadamente, 80 mg L⁻¹. Com base nos dados da literatura, considera-se que esses valores não contribuem para possíveis interferências no momento da quantificação dos halogênios por ICP-MS. No entanto, a concentração encontrada para as amostras *in natura* foi de, em média, 2000 mg L⁻¹. Nesse caso, a concentração de C pode provocar uma série de interferências durante a etapa de determinação, levando a obtenção de resultados não confiáveis. Dessa forma, a influência desse teor de carbono precisa ser considerada para fins da determinação por ICP-MS, sendo recomendada uma diluição de pelo menos 5 vezes, para que o teor de carbono seja inferior a 400 mg L⁻¹, como sugerido na literatura (NOVO et al., 2019).

4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE HALOGÊNIOS

Para este estudo, amostras de saliva foram armazenadas a 4 °C em frascos de polipropileno com tampa, previamente descontaminados. A amostra utilizada para esta avaliação foi obtida através da junção de amostras dos voluntários, coletada especificamente para esta finalidade. A concentração de Cl, Br e I foi determinada por ICP-MS em um intervalo de 0 a 15 dias em dias consecutivos e de 15 a 90 dias, a cada 10 dias. Os resultados obtidos no primeiro dia foram considerados como sendo dia 0 para todos os elementos.

Os valores da concentração de Cl, Br e I obtidos no intervalo de tempo avaliado estão mostrados na Figura 3 para a amostra *in natura* e para a amostra em meio alcalino. A concentração de F foi determinada por ISE, durante 8 dias. Como as concentrações de flúor na saliva apresentaram-se abaixo do LQ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) por ISE, o estudo de estabilidade para este elemento foi descontinuado após 8 dias, não podendo afirmar se as amostras se mantiveram estáveis durante o período avaliado.

Figura 3 - Concentração de **a) Cl**; **b) Br** e; **c) I** em saliva humana em (—) meio alcalino e (—) *in natura*.



Como podem ser observadas na Figura 3, as concentrações de Cl, Br e I nas amostras em meio alcalino e aquoso com 90 dias de armazenamento não apresentaram diferença significativa em relação aos valores de referência (quantificação no dia de coleta, dia "zero"). Pode-se considerar, com base nesse estudo, que a concentração de Cl, Br e I na saliva é estável até, pelo menos 90 dias,

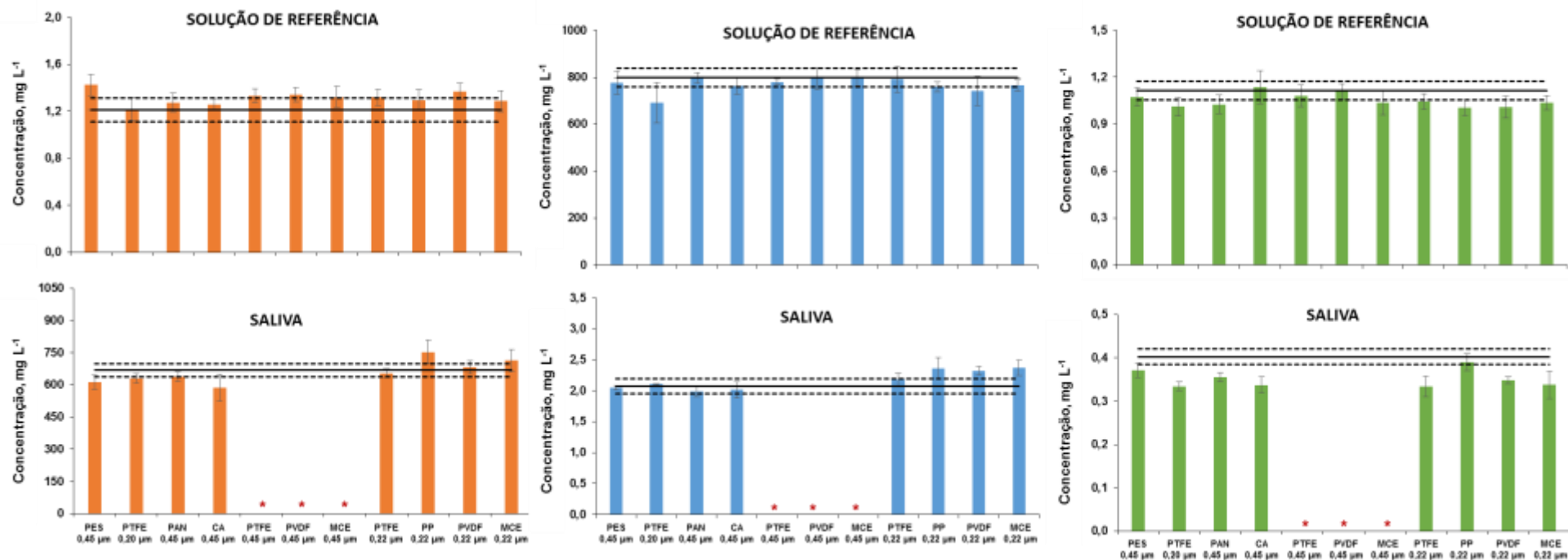
não sendo necessário armazenamento em meio alcalino. Alguns estudos já são relatados na literatura para halogênios em digeridos. Por exemplo, Picoloto e colaboradores, observaram perdas de I em digeridos de leite em pó após MIC para 15 dias de armazenamento, em água e em NH_3 diluído (10 mmol L^{-1}) (PICOLOTO et al., 2015). Porém, cabe salientar, quando comparado à saliva, este é um caso bastante diferente, uma vez que a MIC elimina a matriz, e conseqüentemente, os efeitos que poderiam ser causados pelos constituintes da amostra são diminuídos.

Assim, para determinação de Cl, Br e I, as soluções podem permanecer armazenadas sob refrigeração por até 90 dias. Em alguns casos e levando em consideração a saliva como material de diagnóstico, é recomendada a estocagem (sob refrigeração) de no máximo 7 dias. Porém, considerando-se a concentração total de halogênios, não é necessária essa restrição (CHOJNOWSKA et al., 2018).

4.4 AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE FILTRAÇÃO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE HALOGÊNIOS EM SOLUÇÃO

Visto que a etapa de filtração se trata de um procedimento comumente adotado para a cromatografia, principalmente quando se trata de amostras líquidas, foram avaliados diferentes membranas de filtração, com porosidades variadas. Este estudo foi feito pois não há relatos similares, para o comportamento dos halogênios ou de suas espécies. Foram utilizados sete tipos de membranas de filtração e os resultados obtidos para saliva humana e para a solução de referência multiespécies, estão mostrados na Figura 4, vale ressaltar que a determinação foi feita por ICP-MS, dessa forma, os valores de referência representam o somatório das espécies presentes na solução. Cabe destacar que para esta avaliação foi necessária diluição prévia da amostra de saliva para diminuir a viscosidade e permitir a passagem pelo filtro. Além disso, não foi possível realizar tal avaliação em filtros que possuíam diâmetros de 13 mm (PTFE \varnothing 0,45 μm , PVDF \varnothing 0,45 μm e MCE \varnothing 0,45 μm).

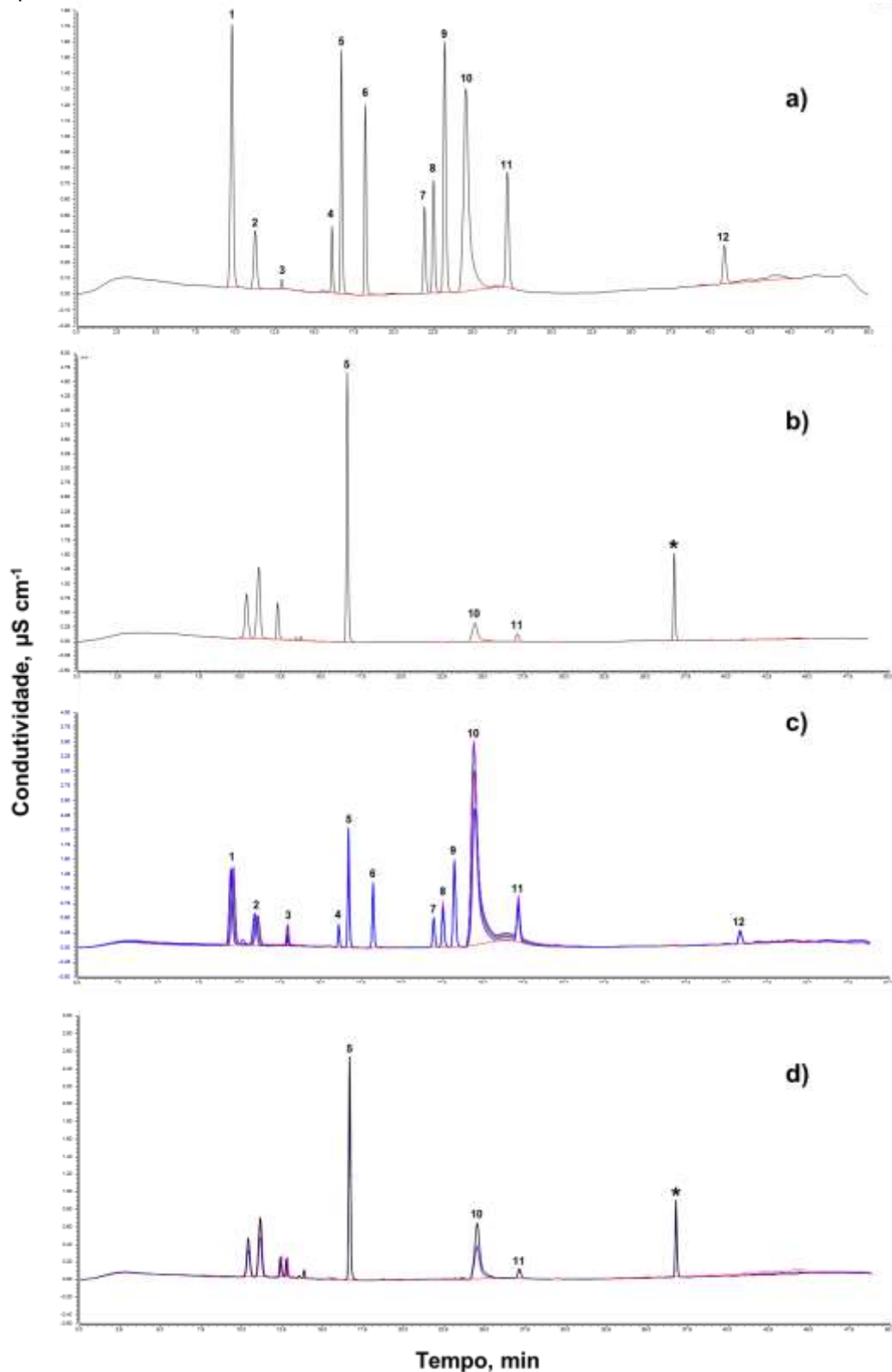
Figura 4 - Concentração de (—) cloro, (—) bromo e (—) iodo após filtração de saliva ou de solução de referência (500 µg L⁻¹). Determinações feitas por ICP-MS, n = 2. * filtrados não obtidos.



Como pode ser observado na Figura 4, o uso de uma etapa de filtração, normalmente utilizada no pré-tratamento em métodos envolvendo a cromatografia, não apresentou efeito sobre a concentração total de Cl e Br . Os resultados obtidos para a amostra de saliva que passou por etapa de filtração foram concordantes com os valores de referência para todas as membranas (em algumas situações foi observada contaminação para Cl). No caso de I, resultados subestimados foram obtidos quando a filtração foi usada. A solução multiespécies não apresentou diferença em relação aos valores de referência para todas as membranas.

Após a avaliação utilizando a ICP-MS, os mesmos filtrados foram injetados no “Sistema IC 2”, com o objetivo de investigar o comportamento dessas espécies após a filtração, uma vez que também não foram encontrados estudos semelhantes na literatura. A Figura 5 mostra os cromatogramas para a solução de referência multiespécies e para a amostra de saliva não filtrada, como também para a solução multiespécies e para a saliva filtradas.

Figura 5 - Cromatogramas para **a)** solução de referência sem filtração **b)** saliva sem filtração, diluída 500 vezes **c)** solução de referência multiespécies ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) filtrada e; **d)** saliva humana filtrada, diluída 1000 vezes, obtidos pelo "Sistema IC 2" utilizando gradiente de KOH, na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC- $4\mu\text{m}$) e detecção por condutividade. 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - ácido fórmico 4 - bromato 5 - cloreto 6 - nitrito 7 - brometo 8 - nitrato 9 - clorato + perclorato 10 - carbonato 11 - sulfato 12- iodeto * - fosfato.



Como se pode observar na Figura 5, há um pico pronunciado (*) que é possível tratar-se de fosfato, uma vez que há relatos de uma variedade de eletrólitos, incluindo essa espécie (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; KIGNEL, 2013). Isto foi confirmado através da injeção de uma solução de referência contendo ânions (incluindo fosfato) como pode ser observado na Figura 5b e Figura 5d.

Tal como os resultados obtidos para concentração total dos halogênios, os perfis cromatográficos dos filtrados de saliva humana, bem como da solução permaneceram os mesmos, demonstrando assim, a compatibilidade e adequação dos filtros para posterior análise de especiação de halogênios utilizando IC. Cabe ressaltar, que após o procedimento, os filtrados foram mantidos sob refrigeração.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE ESPECIAÇÃO DE HALOGÊNIOS EM SALIVA

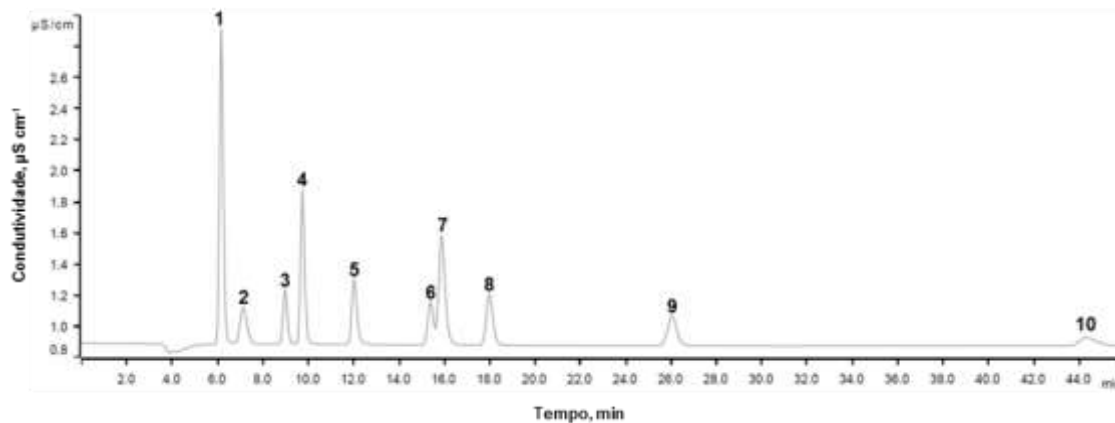
Os parâmetros cromatográficos para a análise de especiação de halogênios por IC foram avaliados com uma solução de referência contendo 250 ou 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada íon halogenado ou outro comumente observado em saliva, sendo estes: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , ClO_3^- , BrO_3^- , IO_3^- , ClO_4^- , NO_2^- , NO_3^- , $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ e SO_4^{2-} . Estas soluções foram preparadas semanalmente, a partir da solução estoque contendo 1 g L^{-1} de cada composto e armazenadas em geladeira. Como condições iniciais foram utilizados os parâmetros recomendados pelos fabricantes.

4.5.1 Avaliação do “Sistema IC 1”

4.5.1.1 Avaliação de parâmetros de separação com a coluna Metrosep A Supp 7

Para a coluna Metrosep A Supp 7, utilizando as condições recomendadas pelo fabricante, foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 6. A concentração da fase móvel foi de 3,6 mmol L^{-1} de Na_2CO_3 , a vazão da fase móvel foi de 0,8 mL min^{-1} e a temperatura do compartimento da coluna foi mantida em 45 $^\circ\text{C}$ (METROHM, 2016).

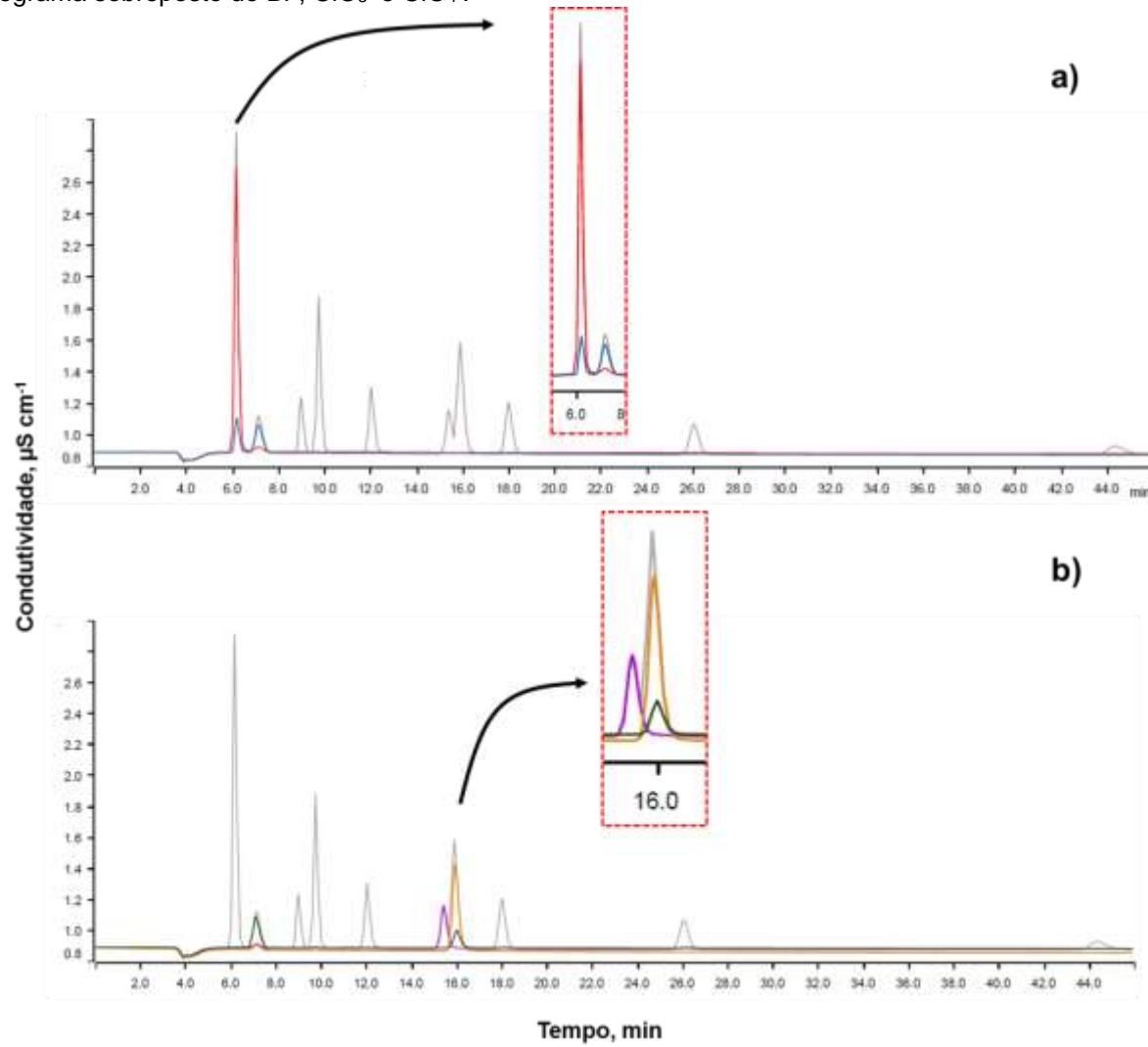
Figura 6 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - clorato + perclorato **8** - nitrato **9** - sulfato **10** - iodeto.



Como pode-se observar, as condições recomendadas pelo fabricante não foram adequadas para a separação das espécies de interesse, uma vez que foram adicionados 12 compostos e somente 10 picos foram identificados. Pode-se observar que há uma coeluição no tempo de retenção (t_R) de aproximadamente 15 min.

Foi possível constatar (Figura 7) que os ânions F^- e IO_3^- estão coeluídos no $t_R = 6,1 \text{ min}$ (destaque na Figura 7a) e que Br^- , ClO_3^- e ClO_4^- estão coeluído no $t_R = 16 \text{ min}$ (destaque na Figura 7b).

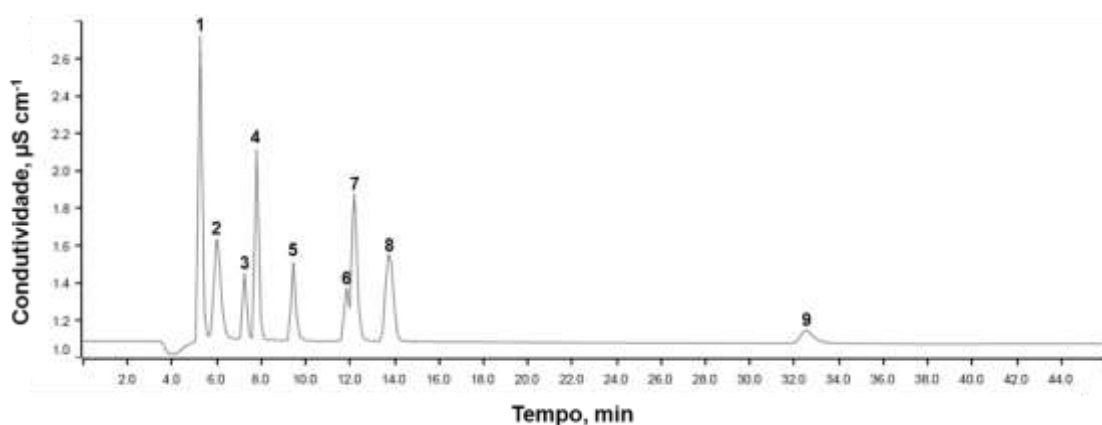
Figura 7 - Cromatogramas obtidos pelo "Sistema IC 1", para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **a)** cromatograma sobreposto de F^- e IO_3^- **b)** cromatograma sobreposto de Br^- , ClO_3^- e ClO_4^- .



Ao utilizar as condições recomendadas pelo fabricante, foi observada uma separação que não foi eficiente para todos os analitos. Como pode se observar nos destaques da Figura 7, não foi possível obter resolução adequada para fluoreto e iodato (Figura 7a) e para brometo, clorato e perclorato (Figura 7b).

Na tentativa de melhorar a separação, foi avaliada a fase móvel com concentração maior de Na_2CO_3 ($7,2 \text{ mmol L}^{-1}$). Este cromatograma é mostrado na Figura 8, em que é possível ver que o aumento da concentração não foi capaz de promover a separação com resolução adequada, reduzindo somente os t_R das espécies. Ainda, como é observado na Figura 8, não foi possível identificar o pico de sulfato nessas condições.

Figura 8 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $7,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - bromato 4 - cloreto 5 - nitrito 6 - brometo 7 - clorato + perclorato 8 - nitrato 9 - iodeto.



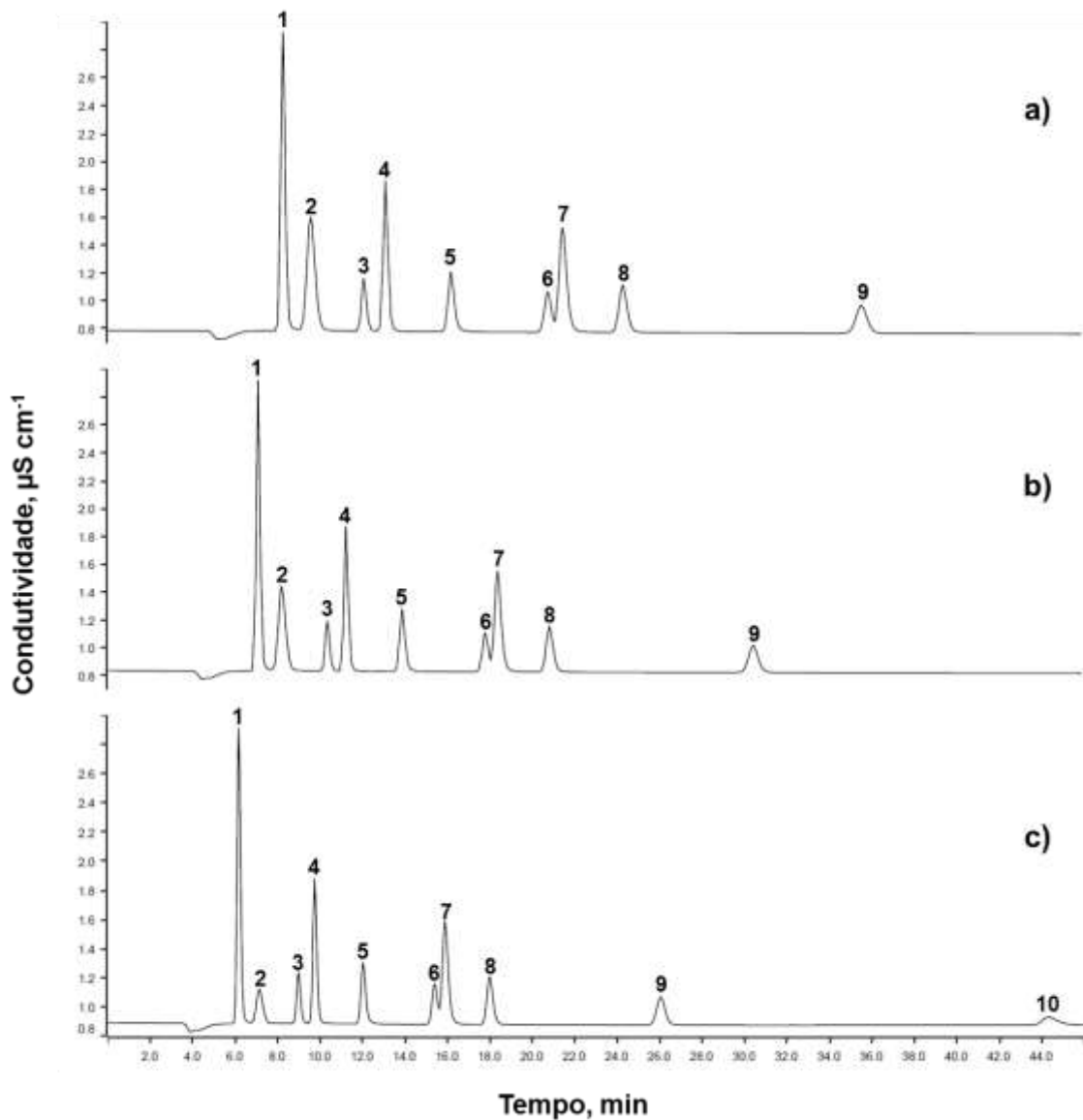
Para melhorar a separação, foram avaliados os parâmetros cromatográficos, tais como a vazão da fase móvel, o uso de modificadores na fase móvel, bem como sua composição.

4.5.1.2 Avaliação da vazão da fase móvel

Uma vez que não foi possível a separação de algumas espécies nas condições recomendadas, o primeiro parâmetro investigado foi a vazão da fase móvel ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3). Dessa forma, foram avaliadas vazões distintas de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ buscando melhorar esta separação, principalmente, para resolver os picos em t_R de aproximadamente 16 min. As vazões investigadas foram de 0,6, 0,7 e

0,8 mL min⁻¹, as quais foram selecionadas levando em conta os parâmetros limite do equipamento. A Figura 9 apresenta os cromatogramas para cada vazão.

Figura 9 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies (250 µg L⁻¹) utilizando 3,6 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃ como fase móvel e temperatura de 45 °C no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **a)** 0,6 mL min⁻¹ **b)** 0,7 mL min⁻¹ **c)** 0,8 mL min⁻¹. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - clorato + perclorato **8** - nitrato **9** - sulfato **10** - iodeto.



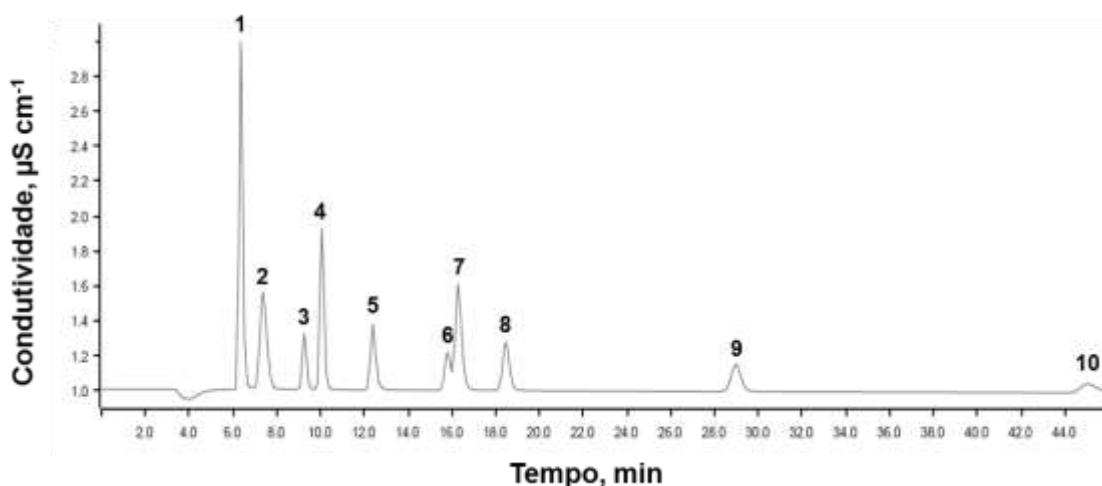
De acordo com os cromatogramas obtidos, as vazões utilizadas não promoveram a separação com a resolução necessária, principalmente no caso de fluoreto e iodato e de brometo, clorato e perclorato. Além disso, vazões menores aumentaram o t_R do iodeto, o que impossibilitou a identificação do mesmo neste

tempo de corrida selecionado (46 min). Dessa forma, foi investigado o uso de um modificador.

4.5.1.3 Avaliação da composição da fase móvel

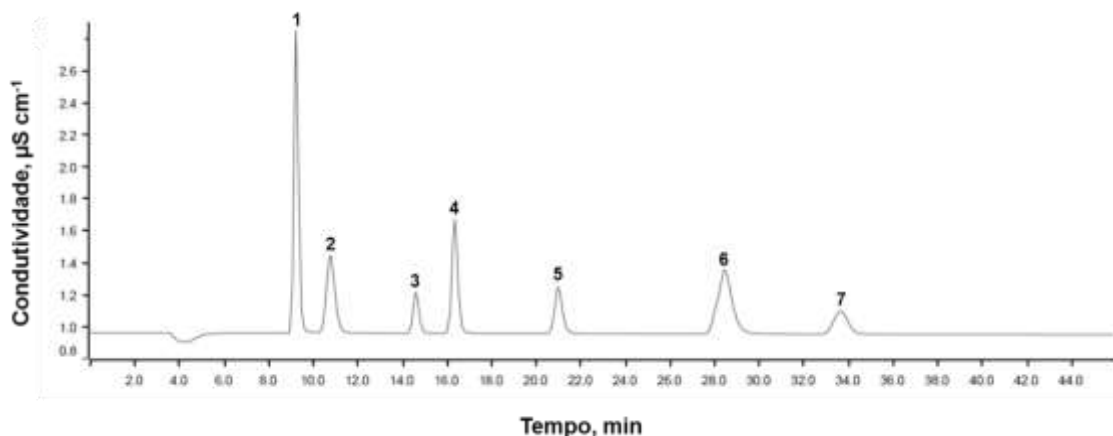
Buscando melhorar a separação, foram avaliadas proporções diferentes do tampão carbonato/bicarbonato, como também concentrações variadas de Na_2CO_3 . Então foi investigado o uso de $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ Na_2CO_3 e 5 mmol L^{-1} NaHCO_3 , proposta pelo fabricante para oxianions, ácidos orgânicos e outros ânions (METROHM, 2016). A Figura 10 traz o cromatograma obtido para esta condição.

Figura 10 - Cromatograma obtido pelo "Sistema IC 1", para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 e 5 mmol L^{-1} NaHCO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - bromato 4 - cloreto 5 - nitrito 6 - brometo 7 - clorato + perclorato 8 - nitrato 9 - sulfato 10 - iodeto.



Como é possível observar na Figura 10, não foi melhorada a separação das espécies e, ainda, houve o aumento no t_R dos últimos picos (SO_4^{2-} e I^-) quando comparado com a fase móvel anterior ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3). Na sequência foi investigada outra fase móvel, o tampão $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ Na_2CO_3 e 1 mmol L^{-1} NaHCO_3 , fase móvel comumente utilizada para determinação de ânions em água (METROHM, 2016). A Figura 11 mostra o cromatograma obtido.

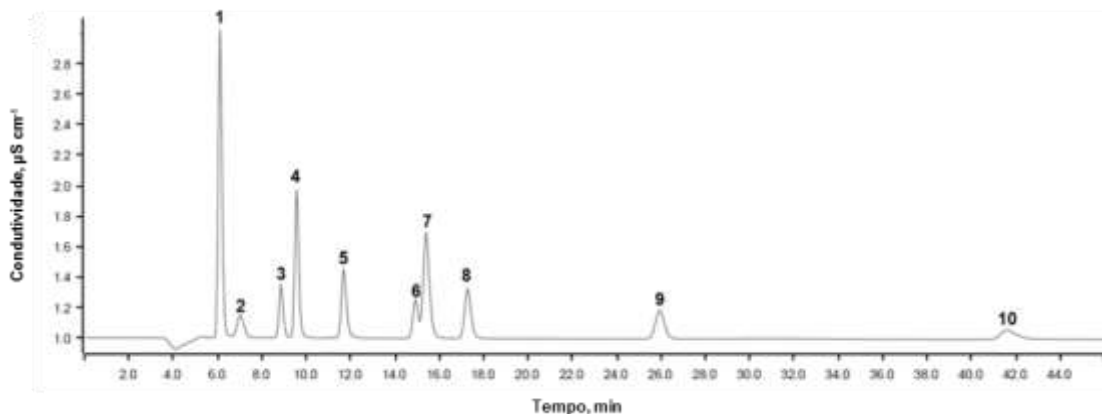
Figura 11 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 e 1 mmol L^{-1} NaHCO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - sulfato.



Como pode ser observado no cromatograma acima, a separação nessas condições foi ineficiente, promovendo inclusive a coeluição de espécies antes não coeluídas, como por exemplo, o nitrato. Nesta condição houve um atraso em todos os t_R das espécies, consequentemente a coeluição de vários íons, onde só se pode identificar sete picos, dentre 12 espécies investigadas. Cabe destacar que esta condição aumentou o t_R para iodeto, sendo impossível observar seu pico neste tempo de corrida (46 min).

Uma vez que não foi possível a separação dos ânions F^- e IO_3^- , bem como de Br^- , ClO_3^- e ClO_4^- , foi investigado o uso de um modificador orgânico juntamente com a fase móvel, uma vez que a composição da coluna possibilita o uso de solventes. Com base nas aplicações do fabricante, foi utilizada acetona, na concentração de 2% na fase móvel ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ Na_2CO_3). Na Figura 12, está apresentado o cromatograma para esta separação.

Figura 12 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$), utilizando modificador na fase móvel ($3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 com 2% acetona), na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - brometo **7** - clorato + perclorato **8** - nitrato **9** - sulfato **10** - iodeto.



Alguns trabalhos trazem que o efeito do uso de solventes sobre a separação cromatográfica é similar ao efeito de temperaturas mais elevadas, ou seja, aumenta a transferência de massa entre a fase estacionária e o eluente (LANCAS, 2012). Foi possível observar reduções no t_R , principalmente de brometo, clorato e perclorato, como também de iodeto, ao se comparar com a Figura 7, que faz uso da mesma fase móvel, porém sem o uso de modificador orgânico. Contudo, o uso de modificador orgânico (acetona), não melhorou a separação dos compostos e seu uso foi descontinuado.

Como pode-se observar, não foi possível encontrar uma condição para identificação e quantificação das espécies de halogênios, considerando ao menos as 8 espécies inseridas nesse estudo (fluoreto, cloreto, clorato, perclorato, brometo, bromato, iodeto e iodato), além de outros ânions concomitantes da matriz, propositalmente inseridas nas avaliações. Mesmo buscando variar as condições cromatográficas, em alguns casos houve a sobreposição de picos, que nas condições recomendadas, não ocorria. Além disso, houve alteração nos tempos de retenção de cada composto. Isso se deve a alteração do equilíbrio gerado entre a fase móvel e os sítios ativos do preenchimento da coluna (METROHM, 2016; NESTERENKO e PAULL, 2017).

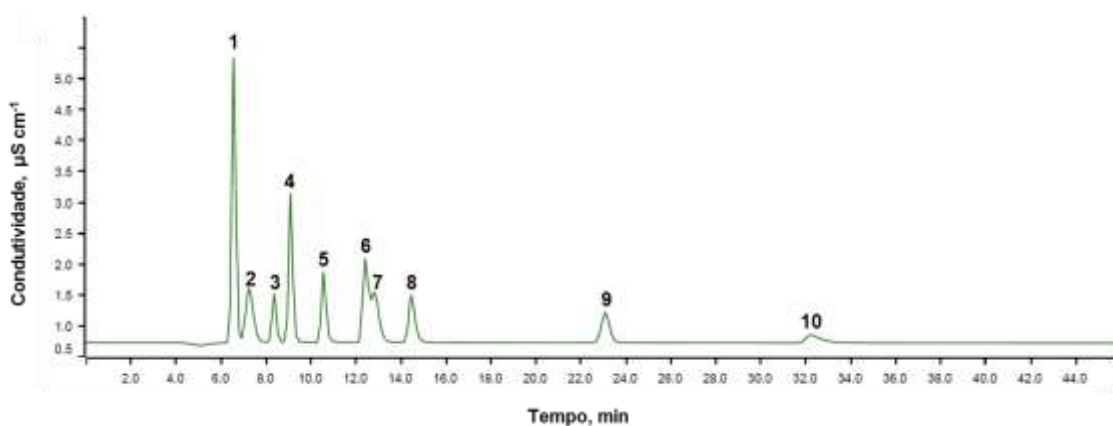
Tendo em vista que as avaliações feitas nesta coluna (Metrosep A Supp 7) não foram suficientes para promover a separação dos compostos desejados, partiu-se, então, para avaliações em outra coluna.

4.5.1.4 Avaliação de coluna de separação alternativa

A coluna Metrosep A Supp 5 normalmente é utilizada para identificação de ânions inorgânicos e pequenos ânions orgânicos. Esta coluna é sugerida na EPA 218.7 (determinação de cromo hexavalente), na EPA 317.0 (determinação de subprodutos de desinfecção de oxihalogenetos inorgânicos em água potável) e com maior ênfase na DIN EM ISO 10304-1 para avaliação da qualidade da água (determinação de ânions dissolvidos - F^- , Cl^- , NO_2^- , o-fosfato, Br^- , NO_3^- e SO_4^{2-}). Diante destas aplicações, a coluna Metrosep A Supp 5 foi escolhida para ser avaliada na separação das espécies investigadas neste trabalho.

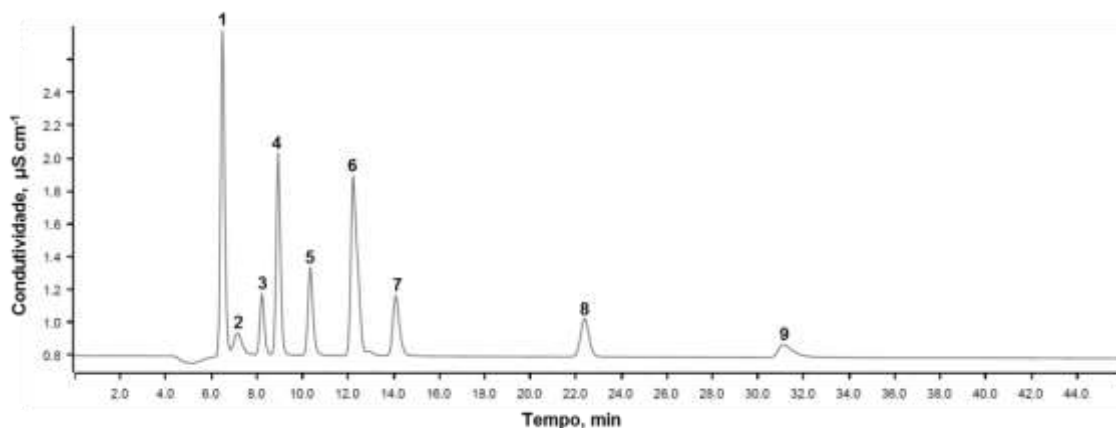
Inicialmente foram utilizadas condições recomendadas pelo fabricante, como concentração da fase móvel sendo $3,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ e $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, vazão de fase móvel de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura do compartimento da coluna de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (METROHM, 2016). Na Figura 13 está o cromatograma obtido nessas condições sugeridas.

Figura 13 - Cromatograma obtido pelo "Sistema IC 1" para uma solução de referência multiespécies ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 e 1 mmol L^{-1} NaHCO_3 como fase móvel, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato **7** - brometo **8** - nitrato **9** - sulfato **10** - iodeto.



Como pode-se ver na Figura 13, houve uma sobreposição parcial dos compostos clorato, perclorato e brometo (picos 6 e 7), assim como acontecia com a outra coluna (Metrosep A Supp 7). Diante disso, foi avaliado o uso da fase móvel recomendada pelo fabricante para a coluna Metrosep A Supp 7, bem como da temperatura do compartimento da coluna recomendada na outra situação. O cromatograma obtido nesta avaliação é apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 45°C no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato + brometo **7** - nitrato **8** - sulfato **9** - iodeto.

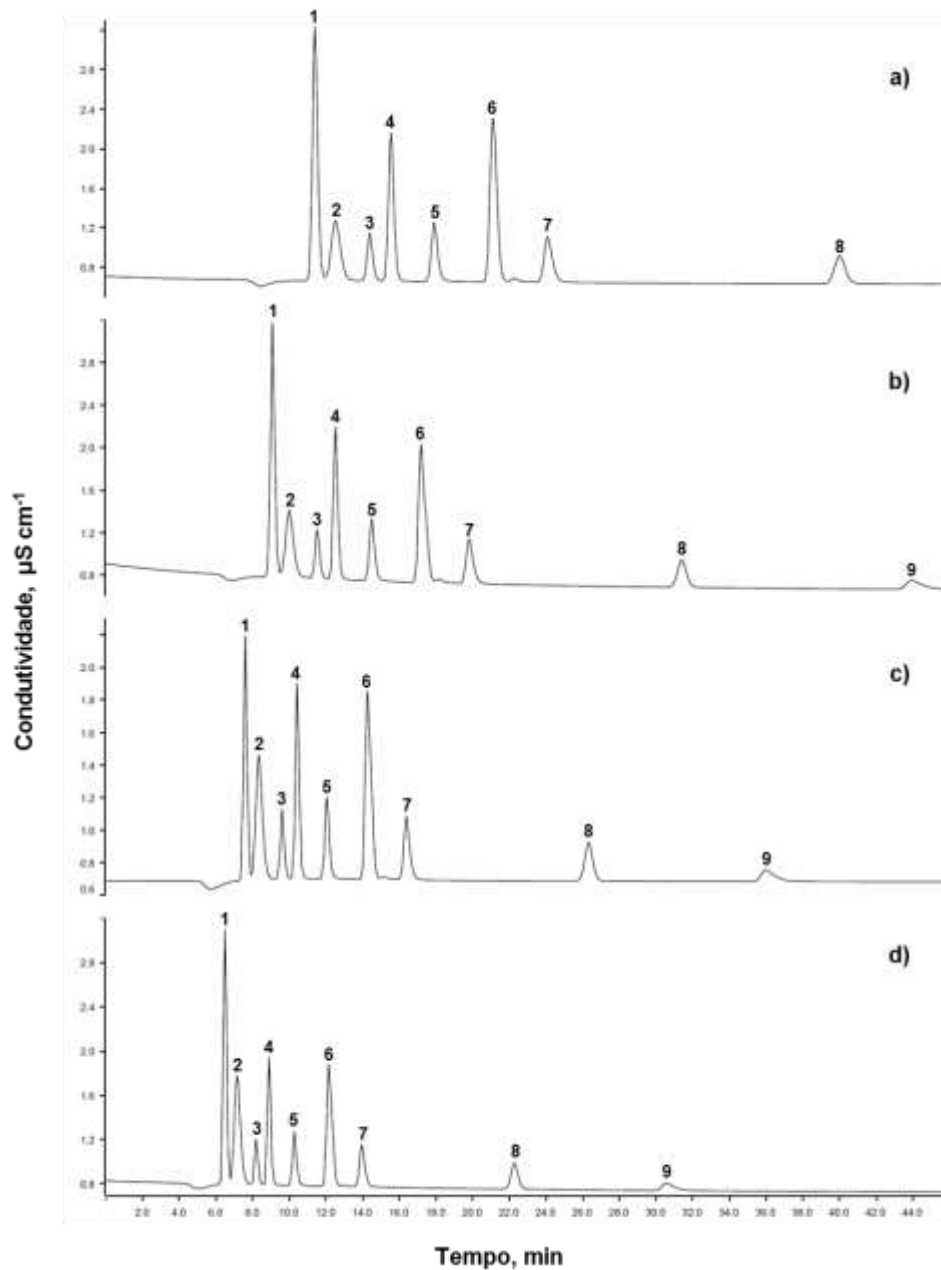


A avaliação do perfil cromatográfico da solução multiespécies permite observar que a condição empregada ($3,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ e 45°C) não proporcionou a separação dos compostos desejados. Como é possível observar, houve a sobreposição de picos, como brometo, clorato e perclorato, ou seja, dificultou-se ainda mais a separação em comparação com a fase móvel anteriormente investigada. Além disso, os t_R foram reduzidos, o que seria uma vantagem se não houvesse coeluição.

4.5.1.5 Avaliação da vazão da fase móvel

Buscando melhorias, foram avaliadas diferentes vazões da fase móvel, recomendada como pode-se observar nos cromatogramas da Figura 15.

Figura 15 - Cromatogramas obtido pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel em diferentes vazões e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5) **a)** $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ **b)** $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ **c)** $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ **d)** $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato + brometo **7** - nitrato **8** - sulfato **9** - iodeto.



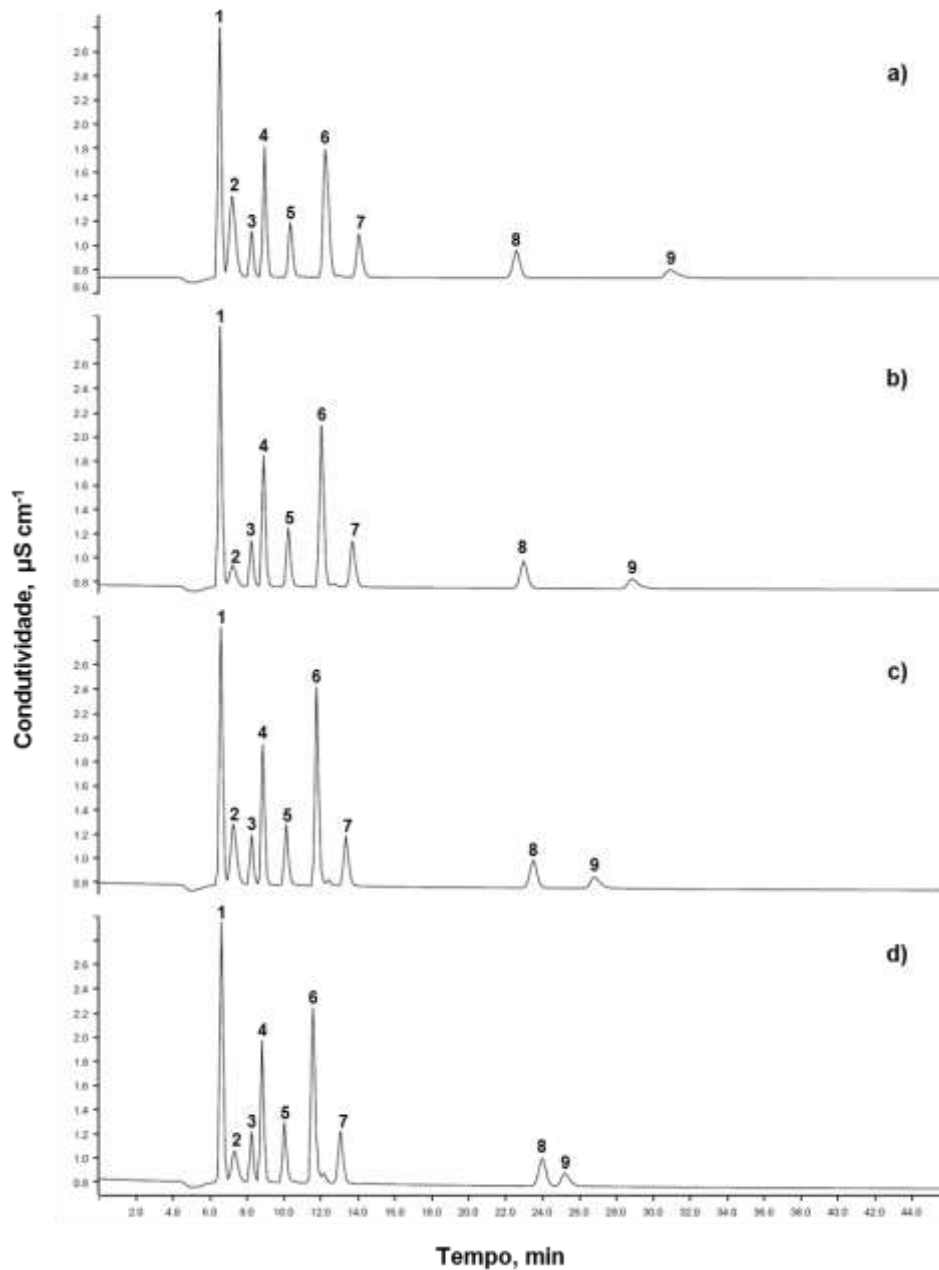
Avaliações com vazões inferiores não foram possíveis de serem realizadas, pois o sistema atingiu a pressão mínima estabelecida pelo fabricante. Assim, como mostrado na Figura 15, a separação de brometo do par clorato-perclorato não foi atingida, bem como a separação de fluoreto de iodato. Ainda, na vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 15a) não foi possível identificar o pico de iodeto já que houve um

aumento no t_R desta espécie. Dessa forma, foi admitida a vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ para as avaliações seguintes.

4.5.1.6 Avaliação da temperatura do compartimento da coluna

A fim de melhorar a separação dos compostos, foi avaliada a influência da temperatura do compartimento da coluna. A Figura 16 traz os cromatogramas obtidos nessa avaliação.

Figura 16 - Cromatogramas obtidos pelo “Sistema IC 1” para uma solução de referência multiespécies ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ para diferentes temperaturas do compartimento da coluna (Metrosep A Supp 5). **a)** $30 \text{ }^\circ\text{C}$, **b)** $35 \text{ }^\circ\text{C}$, **c)** $40 \text{ }^\circ\text{C}$, **d)** $45 \text{ }^\circ\text{C}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - bromato **4** - cloreto **5** - nitrito **6** - clorato + perclorato + brometo **7** - nitrato **8** - sulfato **9** - iodeto.



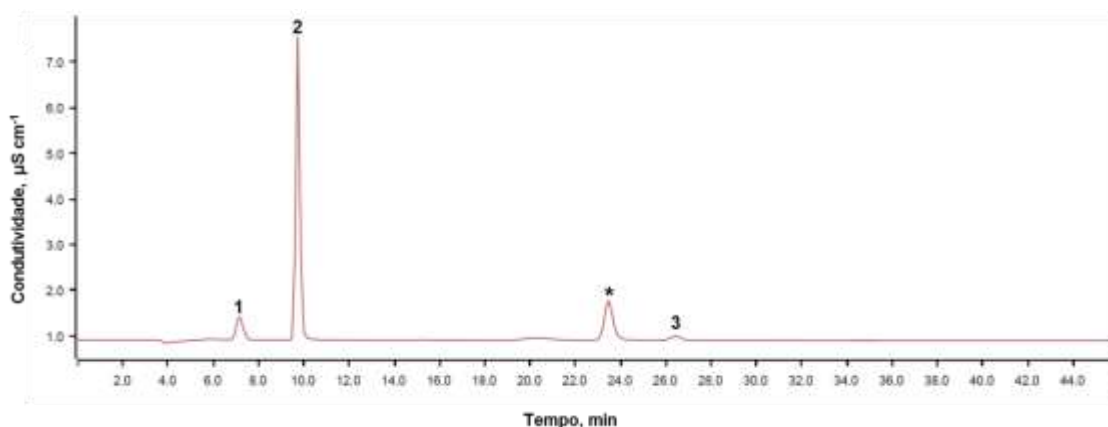
Cabe salientar que não foi possível a avaliação em temperaturas mais baixas, pois a coluna atingiu a pressão máxima estabelecida pelo fabricante (15 MPa). Como pode ser visto, a variação da temperatura não possibilitou a separação de todas as espécies.

Após todas essas avaliações, pode-se afirmar que o “Sistema IC 1” não promoveu a separação das espécies desejadas, inviabilizando a análise de especiação com detecção e quantificação.

A melhor separação alcançada com esse sistema foi com a seguinte condição: fase móvel composta por $3,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$, vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de compartimento de coluna em $45 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando a coluna Metrosep A Supp 7. Foi possível separar apenas 10 espécies, sendo que continuaram coeluído fluoreto e iodato (t_R de aproximadamente 6 min) e brometo, clorato e perclorato (t_R de aproximadamente 13 min) (Figura 13). Acredita-se que tal fato se deve a semelhança de comportamento entre as espécies e ao programa de eluição no modo isocrático, que é a única forma possível para este sistema. Apesar de existirem trabalhos na literatura com identificação de espécies em saliva utilizando esse sistema, cabe ressaltar que somente as espécies F^- , Cl^- e Br^- foram relatadas (CHEN *et al.*, 2015; CHEN, DARVELL e LEUNG, 2004; DEMKOWSKA, POLKOWSKA e NAMIEŚNIK, 2008; PARK *et al.*, 2014).

Após as avaliações feitas, a amostra de saliva foi injetada a fim de se conhecer as espécies presentes. Cabe salientar que para isso, foi utilizada a saliva *in natura* e foi feita uma diluição considerável (400 vezes) com o intuito de diminuir os efeitos da matriz e não provocar a saturação no sistema. A Figura 17 mostra o cromatograma obtido.

Figura 17 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 1”, para amostra de saliva diluída 400 vezes utilizando $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 como fase móvel, na vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Metrosep A Supp 7). 1 - acetato 2 - cloreto 3 - sulfato * - fosfato.



Assim como realizado para a avaliação de membranas, os picos foram confirmados através da injeção de uma solução de referência contendo os ânions.

Ainda, no caso de cloreto, foi feita uma fortificação somente desta espécie e essa foi confirmada. Como pode-se observar na Figura 17, há uma alta concentração de Cl^- , como já é relatado na literatura, bem como de fosfato, mencionado anteriormente (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; KIGNEL, 2013).

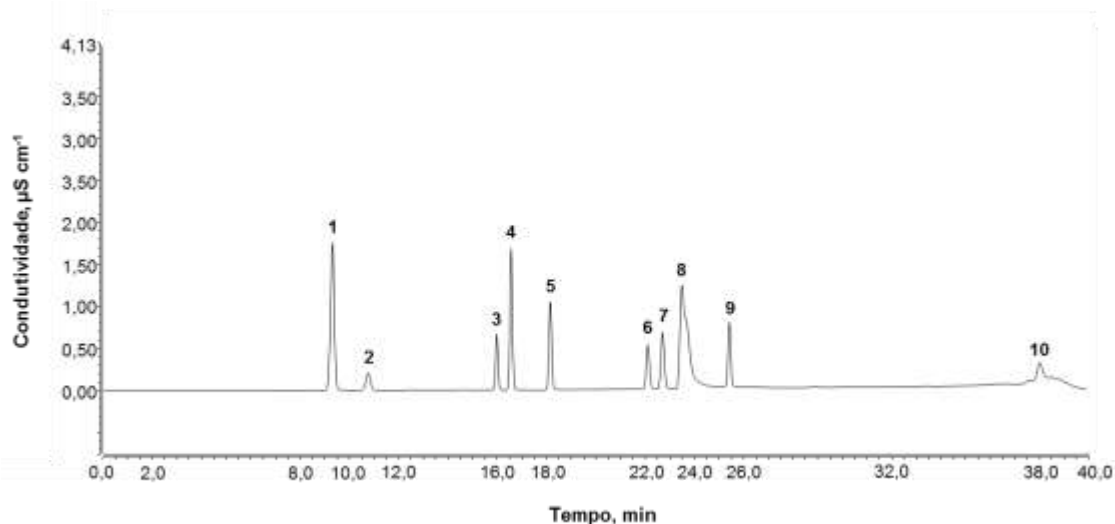
Diante disso, foi avaliado o uso do “Sistema IC 2”, que permite a utilização do modo de eluição por gradiente, além de dispor de um detector do tipo MS, o que abre a possibilidade de desenvolvimento de métodos robustos

4.5.2 Avaliação das condições cromatográficas no “Sistema IC 2”

A seletividade da fase móvel pode ser alterada, para compostos ionizáveis, por meio de mudanças no pH e pela força iônica. Por isso, um dos benefícios ao se trabalhar com eluição por gradiente, é que com as alterações na concentração do eluente há, também, alterações na força iônica. A força iônica auxilia em uma eluição mais lenta ou mais rápida das substâncias. Reduzindo a força iônica, a competição pelos grupos carregados do trocador é mínima e as substâncias são ligadas fortemente a ele. Aumentando a força iônica, aumenta-se a competição e reduz-se a interação entre o grupo trocador ($-\text{N}^+\text{R}_2\text{R}'\text{OH}$, neste caso) e as espécies (CASS e CASSIANO, 2015; COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). A coluna AS11-HC-4 μm é aplicada para separação de ânions inorgânicos e alguns ácidos orgânicos, comumente em matrizes aquosas, mas também em bebidas (sucos) (THERMO, 2013).

Em um primeiro momento, também para este sistema, foram utilizadas as condições recomendadas pelo fabricante (THERMO, 2013). Desse modo, foram empregados o gradiente de KOH (1 a 60 mmol L^{-1}), vazão de fase móvel em 0,3 mL min^{-1} e temperatura de 30 °C no compartimento de coluna, conforme descrito no item 3.5.2 Avaliação do “Sistema IC 2”. Na Figura 18 está mostrado o cromatograma obtido nessas condições.

Figura 18 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH (1 a 60 mmol L^{-1}) na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e $30 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna). 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - bromato 4 - cloreto 5 - nitrito 6 - brometo 7 - nitrato 8 - clorato + perclorato + carbonato 9 - sulfato 10 - iodeto.



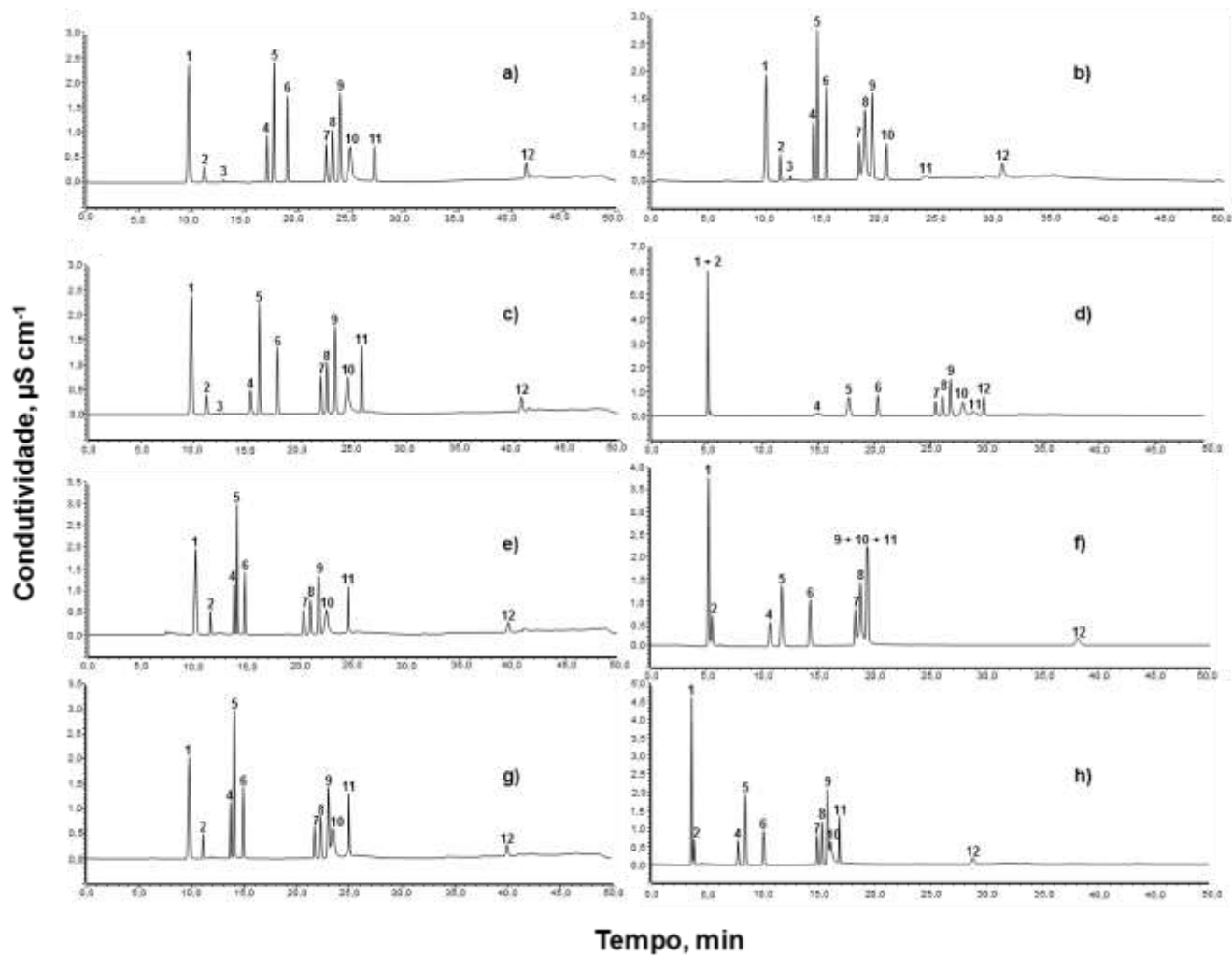
Como é possível observar, as condições recomendadas pelo fabricante, neste tipo de coluna, não foram suficientes para promover a separação das espécies desejadas. Ainda, no t_R de 15 min observou-se a sobreposição dos íons clorato, perclorato e carbonato, o que agrega uma dificuldade nas separações empregando esse sistema de geração de eluente, uma vez que carbonato está sempre presente na água e sua eliminação é difícil. Vale ressaltar que neste sistema, o carbonato está presente pois faz-se uso de uma fase móvel de KOH, gerada eletroliticamente apenas com a adição de água, diferentemente do “Sistema IC 1” que usa fase móvel com carbonato (Na_2CO_3 e NaHCO_3) mas utiliza-se supressão de sinal, com uma supressora de CO_2 . Uma vantagem do “Sistema IC 2” em relação ao “Sistema IC 1” é que já nessas condições iniciais se tem a separação do íon brometo do par clorato-perclorato. Isso provavelmente se deve ao uso da eluição no modo gradiente, promovendo assim, com concentrações crescentes de KOH, a separação destes ânions.

4.5.2.1 Avaliação de programas de eluição por gradiente

Diante dos resultados, foram investigados distintos gradientes de KOH, seguindo sugestões do fabricante ou com base em trabalhos encontrados na literatura (JACKSON *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2002; THERMO, 2013; THERMO, 2015).

Na Figura 19, tem-se um apanhado dos cromatogramas para os gradientes investigados, demonstrando, todavia, a separação não eficiente das espécies de interesse em todas as separações.

Figura 19 - Cromatogramas obtidos pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies (500 µg L⁻¹) utilizando diferentes programas de eluição com gradiente de KOH com vazão de fase móvel de 0,3 mL min⁻¹ e temperatura de 30 °C no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC-4µm). 1 - fluoreto + iodato 2 - acetato 3 - ácido fórmico 4 - bromato 5 - cloreto 6 - nitrito 7 - brometo 8 - nitrato 9 - clorato + perclorato 10 - carbonato 11 - sulfato 12 - iodeto.

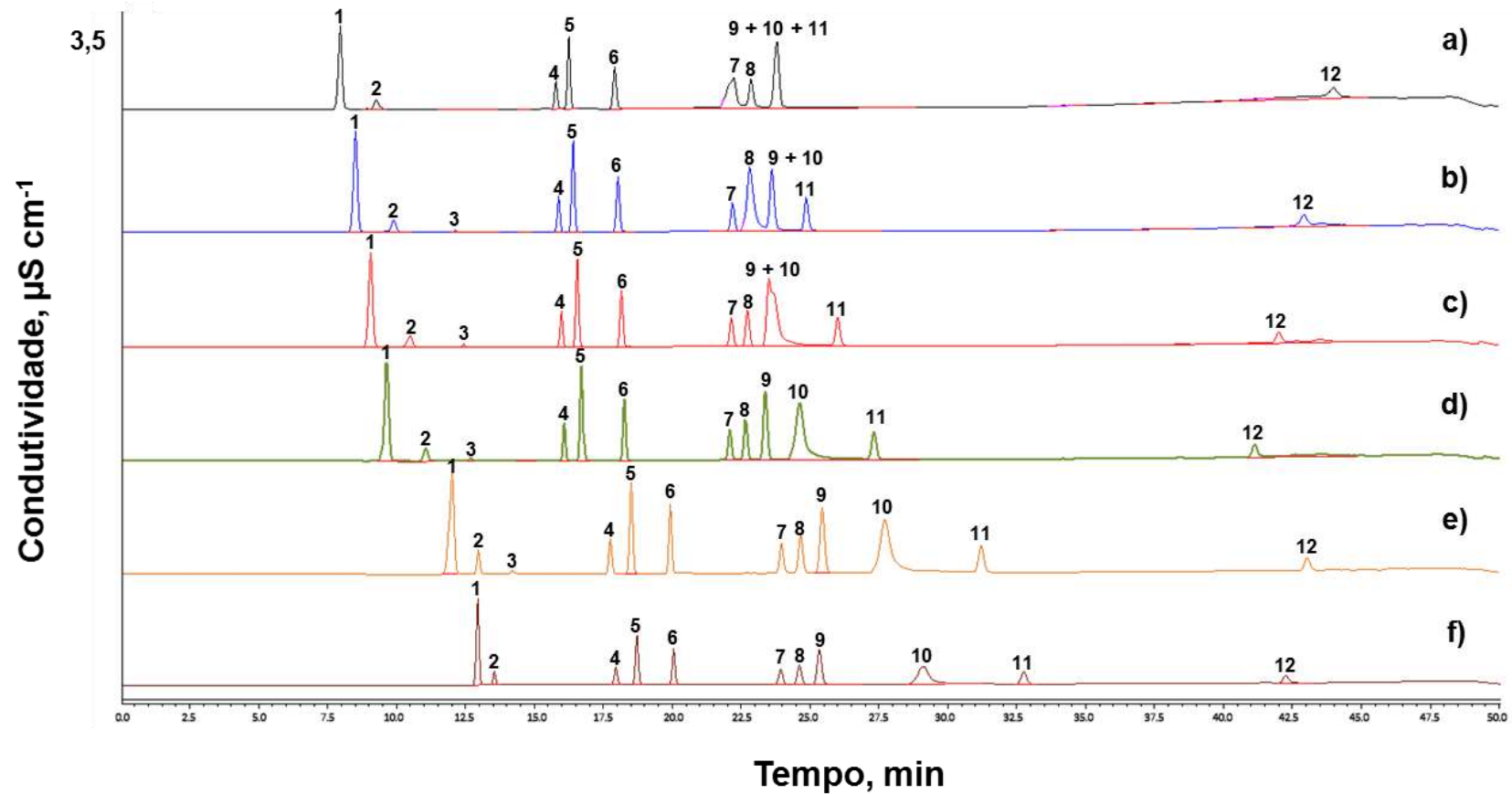


Considerando que estavam presentes 12 espécies, com exceção de carbonato, é possível observar que os diferentes programas para o gradiente de KOH não promoveram a separação de todas elas. Em alguns casos houve uma piora na separação de alguns picos cromatográficos (ex. Figura 19g e Figura 19h). Em outros, houve redução na capacidade de eluição e os picos apresentaram aumento no t_R (ex. Figura 19d).

4.5.2.2 Avaliação da temperatura do compartimento da coluna e da vazão da fase móvel

Na busca por uma condição cromatográfica adequada, foi selecionado o programa de eluição que resultava na melhor separação para uma avaliação da influência da temperatura do compartimento da coluna e da vazão de eluente. As temperaturas e vazões selecionadas para o estudo foram limitadas pelas especificações da coluna e também visando aplicações futuras utilizando o detector por MS. Na Figura 20, estão dispostos os cromatogramas obtidos para a avaliação da temperatura do compartimento da coluna, utilizando o programa “a” da Tabela 4 (cromatograma da Figura 20a).

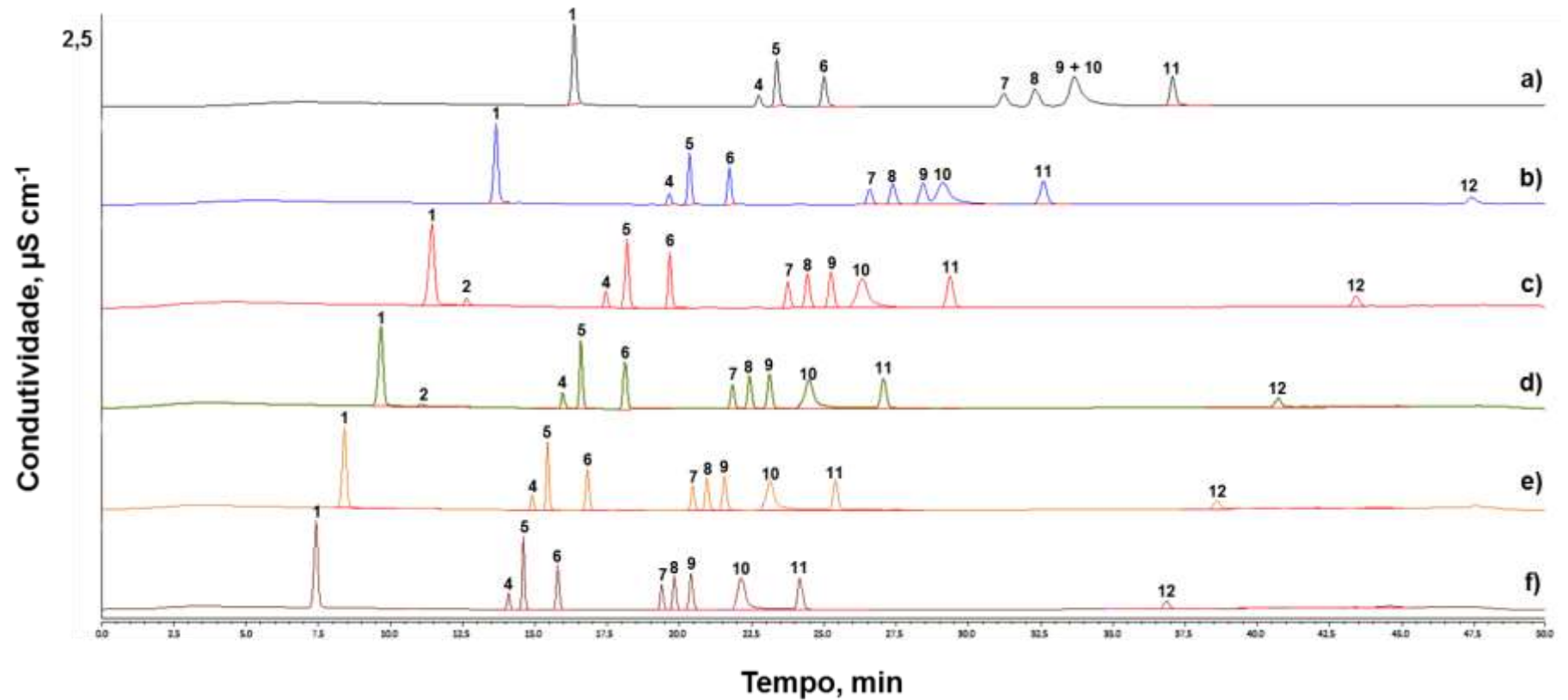
Figura 20 - Cromatograma obtido pelo "Sistema IC 2" para uma solução de referência multiespécies ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH e vazão de fase móvel de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ para diferentes temperaturas do compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC- $4\mu\text{m}$). **a)** $20 \text{ }^\circ\text{C}$ **b)** $25 \text{ }^\circ\text{C}$ **c)** $30 \text{ }^\circ\text{C}$ **d)** $35 \text{ }^\circ\text{C}$ **e)** $40 \text{ }^\circ\text{C}$ **f)** $45 \text{ }^\circ\text{C}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7** - brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12** - iodeto.



O controle de temperatura tem-se mostrado importante para otimizações cromatográficas, uma vez que estudos anteriores mostraram a melhora de eficiência na separação com o incremento da temperatura (LANCAS, 2012). Em temperaturas mais elevadas, a viscosidade é reduzida e a velocidade de difusão aumenta, fazendo com que a velocidade de troca de íons seja aumentada e com ela a eficiência. Dessa forma, com base nos cromatogramas obtidos nesta avaliação a temperatura de 35 °C (Figura 20d) foi escolhida para os próximos experimentos, visto que houve a separação de clorato e perclorato do carbonato. Além disso, os t_R foram relativamente menores, onde o último pico, iodeto, é identificado em aproximadamente 40 min. Por outro lado, esta avaliação ainda não solucionou a separação de fluoreto e iodato no t_R de, aproximadamente, 10 min.

A seguir, foi feita a avaliação da vazão da fase móvel e a Figura 21 mostra o perfil cromatográfico com vazões distintas.

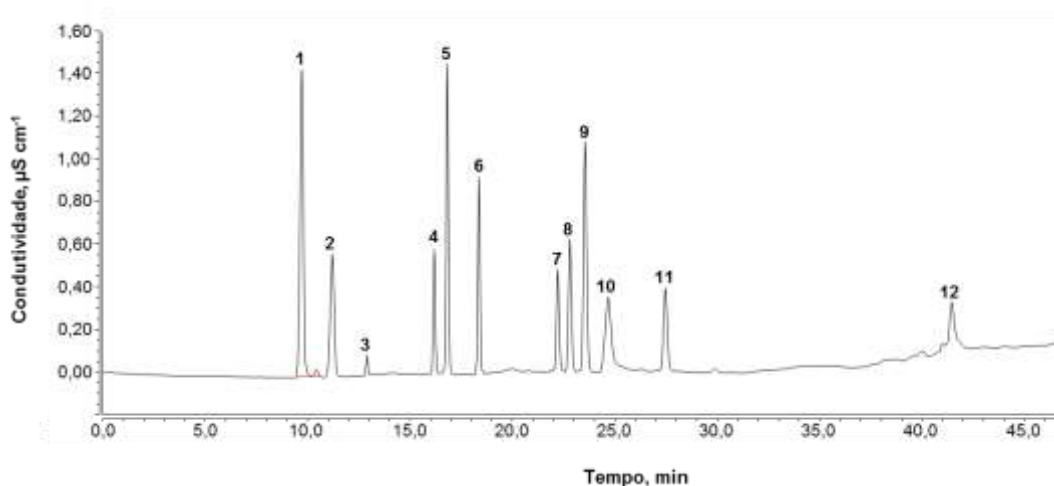
Figura 21 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH em diferentes vazões e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC- $4\mu\text{m}$). **a)** $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ **b)** $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ **c)** $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ **d)** $0,30 \text{ mL min}^{-1}$ **e)** $0,35 \text{ mL min}^{-1}$ **f)** $0,40 \text{ mL min}^{-1}$. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7** - brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12** - iodeto.



Como é possível observar, a variação da vazão também não proporcionou a separação completa das espécies desejadas, permanecendo a coeluição em t_R de aproximadamente 9 min (F^- e IO_3^-) e em t_R de aproximadamente 23 min (ClO_3^- e ClO_4^-). Assim, foi mantida a vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

Assim, com a seleção da vazão de eluente mais adequada ($0,3 \text{ mL min}^{-1}$) e de temperatura do compartimento da coluna em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ foi feita a injeção da solução multiespécies nessas condições (Figura 22) que resultou na melhor separação ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) para o “Sistema IC 2”.

Figura 22 - Cromatograma obtido pelo “Sistema IC 2” para uma solução de referência multiespécies ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) utilizando gradiente de KOH, na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento de coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC- $4\mu\text{m}$). **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7**- brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12** - iodeto.



Como pode ser observado, houve uma melhora na separação das espécies em relação ao par clorato-perclorato do pico de carbonato. Além disso, tem-se uma separação em que as duas espécies cloradas (clorato + perclorato) não coeluem com o brometo, como acontecia no “Sistema IC 1” (Figura 6). No entanto, ainda há a sobreposição das espécies fluoreto e iodato, bem como de clorato e perclorato. Após todas essas avaliações, esta foi a condição cromatográfica onde se obteve a melhor separação diante do detector utilizado. Cabe salientar que neste sistema não foi possível o uso de modificador orgânico na fase móvel, devido a utilização de cartuchos para geração eletrolítica do próprio eluente. Assim, a melhoria do método nesse sistema exige, obrigatoriamente, a avaliação e otimização do detector MS, o que esteve presente dentre os objetivos deste trabalho, mas não pode ser finalizado

em função da parada para manutenção do equipamento que apresentou defeitos e se tornou inoperante ao longo do mestrado e até seu término.

4.5.6 Análise de especiação de halogênios em saliva por IC

Na Tabela 6 estão sendo comparados alguns parâmetros nos dois sistemas investigados. Considerando o “Sistema IC 1”, as espécies F^- , IO_3^- , Br^- , ClO_3^- e ClO_4^- permaneceram coeluído e dessa forma esses parâmetros não foram apresentados, bem como para as espécies F^- , IO_3^- , ClO_3^- e ClO_4^- no “Sistema IC 2”. Os limites de detecção (LDs) e quantificação (LQs) foram calculados a partir da equação da reta e os seus erros relacionados.

Tabela 6 - Avaliação de parâmetros cromatográficos para o “Sistema IC 1” e “Sistema IC 2”.

Espécie	Faixa linear, $\mu\text{g L}^{-1}$	“Sistema IC 1”			“Sistema IC 2”		
		Equação linear, $y = ax + b$ (r)	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	Equação linear, $y = ax + b$ (r)	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$
Cl ⁻	5 – 100	$y = 0,0008x + 0,0005$ (0,9999)	2,2	7,3	$y = 0,0004x + 0,0014$ (0,9993)	4,9	16
	100 – 1000	$y = 0,0010x - 0,0302$ (0,9998)	28	94	$y = 0,0004x - 0,0031$ (0,9993)	54	179
	1000 – 10000	$y = 0,0011x - 0,1753$ (1,0000)	54	179	$y = 0,0004x + 0,0277$ (0,9999)	231	770
Br ⁻	5 – 100	-	-	-	$y = 0,0002x - 0,00003$ (1,0000)	1,2	4,1
	100 – 1000	-	-	-	$y = 0,0002x - 0,0029$ (0,9996)	41	137
	1000 – 10000	-	-	-	$y = 0,0002x + 0,0048$ (0,9999)	206	685
BrO ₃ ⁻	5 – 100	$y = 0,0003x + 0,00002$ (1,0000)	0,4	1,3	$y = 0,0001x - 0,00002$ (0,9999)	1,5	4,9
	100 – 1000	$y = 0,0004x - 0,0119$ (0,9997)	33,1	110	$y = 0,0002x - 0,0033$ (0,9994)	48,2	161
	1000 – 10000	$y = 0,0004x - 0,0769$ (0,9999)	231,3	771	$y = 0,0002x + 0,0088$ (0,9999)	299,5	998
I ⁻	5 – 100	Faixa não linear	-	-	Faixa não linear	-	-
	100 – 1000	$y = 0,0002x - 0,0044$ (0,9999)	17,1	57	$y = 0,0001x - 0,0017$ (1,0000)	11,1	40
	1000 – 10000	$y = 0,0003x - 0,1170$ (0,9999)	313,4	1045	$y = 0,0001x + 0,0051$ (1,0000)	177,1	590

Como é possível observar, foi possível a calibração das espécies Cl^- , Br^- , BrO_3^- e I^- . É possível afirmar que a maioria das espécies investigadas apresentam uma ampla faixa linear, em ambos os sistemas, viabilizando a análise de especiação em amostras que apresentam alta concentração dessas espécies, bem como para concentrações mais baixas. Ao se tratar do coeficiente de correlação (r), as espécies apresentaram um intervalo de 0,9994 a 1,000, o que indica uma boa resposta linear para faixa de concentração avaliada, estando de acordo com a literatura (ANVISA, 2004; LANÇAS, 2016). Vale salientar que a calibração do equipamento para as demais espécies foi possível, porém com o uso de soluções específicas de cada espécie. Entretanto, como apresentam separação inadequada, sua inclusão no método não foi considerada.

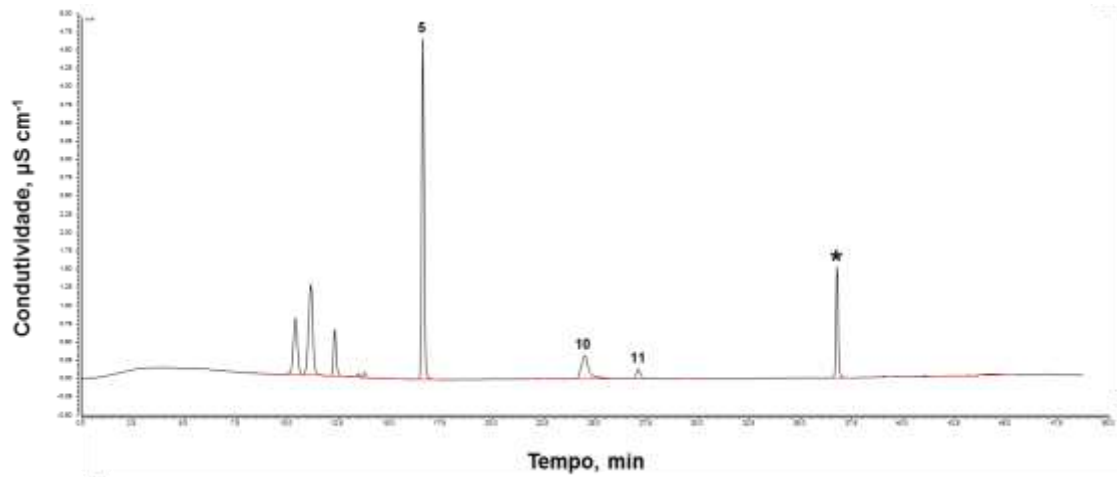
Em geral, o “Sistema IC 1” possibilitou LQs mais baixos que o “Sistema IC 2”, como por exemplo para Cl^- , que foram de 7,3 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Porém, para iodeto foi observado o inverso, sendo que no “Sistema IC 2” o LQ obtido é menor (40 $\mu\text{g L}^{-1}$) do que no “Sistema IC 1” (57 $\mu\text{g L}^{-1}$).

A partir do método desenvolvido, foi feita a injeção da amostra de saliva no “Sistema IC 2”, para a quantificação das espécies presentes. Na Tabela 7 estão apresentados os resultados para as espécies segundo o “Sistema IC 2” e para a concentração total, por ICP-MS e na Figura 23 está mostrado o cromatograma obtido.

Tabela 7 - Resultados para espécies halogenadas em saliva humana por IC (“Sistema IC 2”) e para o teor total de halogênios por ICP-MS ($n = 3$).

Espécies halogenadas, mg L^{-1}		Halogênios (total), mg L^{-1}	
Cloreto	720 ± 71	Cloro	668 ± 30
Brometo	$2,16 \pm 0,24$	Bromo	$2,07 \pm 0,12$
Iodeto	$< 2,0$	Iodo	$0,390 \pm 0,018$

Figura 23 - Cromatograma para saliva diluída 500 vezes obtido pelo “Sistema IC 2” utilizando gradiente de KOH, na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ no compartimento da coluna (Dionex™ IonPac™ AS11-HC- $4\mu\text{m}$) e detecção por condutividade. **1** - fluoreto + iodato **2** - acetato **3** - ácido fórmico **4** - bromato **5** - cloreto **6** - nitrito **7** - brometo **8** - nitrato **9** - clorato + perclorato **10** - carbonato **11** - sulfato **12**- iodeto * - fosfato.



Esses resultados são concordantes com os encontrados na literatura, sendo o cloreto a espécie em maior concentração. Ainda, os resultados obtidos pelo “Sistema IC 2” não apresentaram diferença significativa com os resultados obtidos por ICP-MS para cloro e bromo, o que permite assumir que o cloro está presente na forma de cloreto e que o bromo está presente na saliva, na forma de brometo. Além disso, não foi possível quantificar iodo pelo “Sistema IC 2”, uma vez que é necessária a diluição da amostra por, pelo menos, 50 vezes, devido à presença de concentrações altas dos outros constituintes (como o próprio cloreto, além de sulfato e fosfato), para evitar a saturação do sistema.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram a avaliação e a discussão da viabilidade e limitações de sistemas cromatográficos baseados na cromatografia de íons para determinação de espécies halogenadas em saliva humana. Foi possível confirmar que a técnica de cromatografia de íons é uma boa ferramenta para o presente estudo, porém, que é carente de sensibilidade, com o uso do detector de condutividade, para que possam ser investigadas espécies distintas de cloreto e brometo, que estão em concentrações mais elevadas. Foram avaliados dois sistemas de IC e nestes sistemas foram otimizadas condições como coluna cromatográfica, composição da fase móvel, vazão da fase móvel e, também, temperatura no compartimento da coluna.

Para identificação de halogênios e suas espécies no “Sistema IC 1”, a condição onde se obteve a melhor separação foi empregando a coluna aniônica Metrosep A Supp 7, a fase móvel na concentração de 3,6 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃ na vazão de 0,8 mL min⁻¹ e a temperatura do compartimento da coluna em 45 °C. Porém como este sistema realiza a eluição no modo isocrático, não possível atingir a separação de todas espécies com resolução adequada. As espécies coeluídas nessas condições foram fluoreto e iodato (t_R aproximadamente 6,1 min) e brometo, clorato e perclorato (t_R aproximadamente 16 min).

O “Sistema IC 2” possibilitou a separação das espécies coeluídas no “Sistema IC 1”, como o brometo do par clorato-perclorato, com uso do programa de eluição por gradiente nas concentrações de 1 a 60 mmol L⁻¹, na vazão de 0,3 mL min⁻¹ e temperatura do compartimento da coluna em 35 °C. Cabe salientar que este sistema possui a geração eletrolítica da fase móvel a partir de um cartucho, o que torna este sistema mais prático ao operador.

A avaliação da estabilidade da saliva humana frente aos meios de armazenamento proporcionou um conhecimento para quantificação de Cl, Br e I e, assim, permitiu concluir que é possível utilizar a amostra até 90 dias de refrigeração (4 °C), sem observar perdas significativas para Cl, Br e I. No caso de F, o estudo foi descontinuado após 8 dias devido à baixa concentração do elemento na amostra (< 0,5 mg L⁻¹).

Quanto ao procedimento de filtração, os resultados obtidos para sete membranas avaliadas demonstraram que este pré-tratamento, comum em métodos

cromatográficos, não apresentou efeito sobre a concentração total de Cl e Br. Apesar disso, foi observada contaminação para Cl, para algumas membranas. Para o caso de I, foram obtidos resultados subestimados com o uso dessa etapa.

Ainda, as concentrações de halogênios encontradas neste trabalho são concordantes com as concentrações relatadas na literatura. Foi possível confirmar que a espécie de halogênio presente na saliva em maior concentração é o cloreto, apresentando concentração de aproximadamente 670 mg L^{-1} . Além disso, foi possível identificar outras espécies como brometo, sulfato e fosfato.

Diante disso, o presente trabalho investigou a separação cromatográfica por IC e identificou as espécies de halogênios em saliva humana, apresentando uma ampla faixa de calibração, bem como baixos LDs e LQs para as espécies investigadas. O desenvolvimento de método usando a IC-MS fica ressaltado a partir dos resultados obtidos e segue sendo objetivo em trabalhos futuros, já que não foi possível em função da situação inoperante do equipamento até o fechamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANIM, A.; SAMUEL, A.; YAW, S.-A. **Instrumental Neutron Activation Analysis of Total Halogen and Extractable Organohalogen in Fish Samples from the Densu Basin**. 2010.
- ANVISA, Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência a Acreditação, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2004.
- BARRON, L.; NESTERENKO, P. N.; PAULL, B. Use of temperature programming to improve resolution of inorganic anions, haloacetic acids and oxyhalides in drinking water by suppressed ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, n. 2, p. 207-215, 2005.
- CASS, Q. B.; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida Novas tendências e aplicações**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- CAUDURO, V. H. *et al.* Successive digestions for pre-concentration and ultra-trace determination of Br and I by plasma-based atomic spectrometry and ion chromatography. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 239-244, 2019.
- CHARLES, L.; PÉPIN, D. Analysis of oxyhalides in water by ion chromatography–ionspray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 804, n. 1, p. 105-111, 1998.
- CHEN, Z. *et al.* Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography. **Clinica Chimica Acta**, v. 438, p. 231-235, 2015.
- CHEN, Z. F.; DARVELL, B. W.; LEUNG, V. W. H. Human salivary anionic analysis using ion chromatography. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 11, p. 863-869, 2004.
- CHOJNOWSKA, S. *et al.* Human saliva as a diagnostic material. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 185-191, 2018.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006.
- DEMKOWSKA, I.; POLKOWSKA, Ż.; NAMIEŚNIK, J. Application of ion chromatography for the determination of inorganic ions, especially thiocyanates in human saliva samples as biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. **Journal of Chromatography B**, v. 875, n. 2, p. 419-426, 2008.
- DIAZ-ARNOLD, A. M.; MAREK, C. A. The impact of saliva on patient care: A literature review. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 88, n. 3, p. 337-343, 2002.

- EL HADDAD, M. *et al.* Rapid simultaneous analysis of oxyhalides and inorganic anions in aqueous media by ion exchange chromatography with indirect UV detection. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 1, p. 108-111, 2015.
- EMONS, H. *et al.* Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology: **Sampling: Collection, Storage**. 2003.
- GILCHRIST, E. S. *et al.* A review of oxyhalide disinfection by-products determination in water by ion chromatography and ion chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 942, p. 12-22, 2016.
- GREENBERG, R. R.; BODE, P.; DE NADAI FERNANDES, E. A. Neutron activation analysis: A primary method of measurement. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 3, p. 193-241, 2011.
- HARRINGTON, C. F. *et al.* Atomic Spectrometry Update: review of advances in elemental speciation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 7, p. 1427-1468, 2015.
- HAUTMAN, D. P.; BOLYARD, M. Analysis of oxyhalide disinfection by-products and other anions of interest in drinking-water by ion chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 602, n. 1-2, p. 65-74, 1992.
- HE, X. *et al.* Determination of inorganic anions in the whole blood by ion chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 163, p. 58-63, 2019.
- HOU, R. S. A. X.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. **Encyclopedia of analytical chemistry: Inductively coupled plasma optical emission spectrometry**. 2016.
- HUANG, M. *et al.* **High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine**. 2008.
- HUANG, M. D. *et al.* Determination of iodine via the spectrum of barium mono-iodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 7, p. 697-701, 2009.
- HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.
- JACKSON, P. E. *et al.* Determination of inorganic anions in environmental waters with a hydroxide-selective column. **Journal of Chromatography A**, v. 884, n. 1, p. 175-184, 2000.
- KIGNEL, S. **Estomatologia: bases do diagnóstico para o clínico geral**. São Paulo: Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda, 2013.

- KIRK, A. B. *et al.* Perchlorate, iodine supplements, iodized salt and breast milk iodine content. **Science of The Total Environment**, v. 420, p. 73-78, 2012.
- KRZYZANIAK, S. R. *et al.* Determination of halogens and sulfur in high-purity polyimide by IC after digestion by MIC. **Talanta**, v. 158, p. 193-197, 2016.
- LANÇAS, F. **Efeitos de Temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. 2012.
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. 2º Edição. Campinas: Editora Átomo, 2016.
- LIMA, D. P. *et al.* Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. e184-e188, 2010.
- LÓPEZ-RUIZ, B. Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1, p. 607-627, 2000.
- LU, Y. *et al.* Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 249-254, 2015.
- LU, Z. *et al.* Determination of anions at trace levels in power plant water samples by ion chromatography with electrolytic eluent generation and suppression. **Journal of Chromatography A**, v. 956, n. 1, p. 129-138, 2002.
- LUND, W. Speciation analysis — why and how? **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 337, n. 5, p. 557-564, 1990.
- MARGOSIS, M.; TANNER, J. T.; LAMBERT, J. P. F. Neutron Activation Analysis of Halogens in Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 10, p. 1550-1555, 1971.
- MCCALL, A. S. *et al.* Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1380-1392, 2014.
- MELLO, P. A. *et al.* Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7615-7642, 2013.
- MELLO, P. d. A. *et al.* Métodos de Preparo de amostras para análise elementar: **Preparo de amostras para especiação química**. São Paulo: EditSBQ, 2016.
- MESKO, M. F. *et al.* Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: challenges and trends of sample preparation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 6, p. 1243-1261, 2016.

- METROHM, The column program. Herisau, 2016.
- MONTASER, A. **Inductively coupled plasma mass spectrometry**. New York: Wiley-VHC, 1998.
- MOREIRA, C. M. **Espécies de arsênio em moluscos bivalves determinadas por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS após extração assistida por micro-ondas**. 2013. 135 p. p. (Tese de doutorado)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- MORI, M. *et al.* Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of background electrolyte. **Journal of Chromatography B**, v. 887-888, p. 1-7, 2012.
- NESTERENKO, P. N.; PAULL, B. **Liquid chromatography: Chapter 9 - Ion chromatography**. Second edition. 2017.
- NORDBERG, M.; DUFFUS, J.; TEMPLETON, D. M., Glossary of terms used in toxicokinetics (IUPAC Recommendations 2003), Pure and Applied Chemistry, 2004.
- NOVO, D. L. R. *et al.* Bromine and iodine determination in human saliva: Challenges in the development of an accurate method. **Talanta**, v. 191, p. 415-421, 2019.
- NOVO, D. L. R. *et al.* Are there feasible strategies for determining bromine and iodine in human hair using interference-free plasma based-techniques? **Analytica Chimica Acta**, v. 1060, p. 45-52, 2019.
- PARK, Y. D. *et al.* Analyses of organic acids and inorganic anions and their relationship in human saliva before and after glucose intake. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 1, p. 1-11, 2014.
- PEREIRA, R. M. *et al.* Feasibility of halogen determination in noncombustible inorganic matrices by ion chromatography after a novel volatilization method using microwave-induced combustion. **Talanta**, v. 147, p. 76-81, 2016.
- PICOLOTO, R. S. *et al.* Simultaneous determination of bromine and iodine in milk powder for adult and infant nutrition by plasma based techniques after digestion using microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 107, p. 86-92, 2015.
- PICOLOTO, R. S. *et al.* An in situ pre-concentration method for fluorine determination based on successive digestions by microwave-induced combustion. **Talanta**, v. 194, p. 314-319, 2019.
- SNOOK, R. D. **Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry**. 1992.

- TEMPLETON DOUGLAS, M. *et al.*, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), Pure and Applied Chemistry, 2000.
- THERMO, Column Product Manual, 2013.
- THERMO, Application Update 198 - Improved Determination of Trace Concentrations of Oxyhalides and Bromide in Drinking Water Using a Hydroxide-Selective Column, USA, 2015.
- THERMO, AN107: Ions (anions) in physiological fluids, USA, 2015.
- VANHOE, H. *et al.* Effect of solvent type on the determination of total iodine in milk powder and human serum by inductively-coupled plasma-mass spectrometry. **Analyst**, v. 118, n. 8, p. 1015-1019, 1993.
- WUILLOUD, R. G.; ALTAMIRANO, J. C. Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health: **Speciation of Halogen Compounds**. 2005.