

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DOUTORADO EM QUÍMICA**

**Felipe Dias dos Reis**

**Análise de saliva humana para determinação de Ca, K, Mg e Na por técnicas espectrométricas e correlações de seus níveis com condições fisiológicas do organismo**

**Juiz de Fora  
2020**

**Felipe Dias dos Reis**

**Análise de saliva humana para determinação de Ca, K, Mg e Na por técnicas espectrométricas e correlações de seus níveis com condições fisiológicas do organismo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.  
Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa

Juiz de Fora

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Reis, Felipe Dias dos.

Análise de saliva humana para determinação de Ca, K, Mg e Na por técnicas espectrométricas e correlações de seus níveis com condições fisiológicas do organismo / Felipe Dias dos Reis. -- 2020. 99 f. : il.

Orientador: Rafael Arromba de Sousa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

1. Preparo de amostra. 2. Determinação de metais. 3. Saliva humana. 4. Espectrometria de Absorção Atômica. 5. Íons metálicos. I. Sousa, Rafael Arromba de, orient. II. Título.

**Felipe Dias dos Reis**

**Análise de saliva humana para determinação de Ca, K, Mg e Na por técnicas espectrométricas e correlações de seus níveis com condições fisiológicas do organismo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovada em 01 de outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

*Rafael Sousa*

---

Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

*Rafael Sousa*

---

Dra. Greice Trevisan Macarovscha

Rhodia Brasil

*Rafael Sousa*

---

Profa. Dra. Andrea Pinto de Oliveira

Universidade Federal do Paraná

*Rafael Sousa*

---

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Universidade Federal de Juiz de Fora

*Rafael Sousa*

---

Prof. Dr. Júlio César José da Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais, Jesse e Vina, à minha irmã Alana e à toda minha família.

## AGRADECIMENTOS

O maior agradecimento eu ofereço a Deus, que transformou minha vida e me mostrou que, além de ser poderoso e eterno, é também meu Pai e está sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus pais, Jesse e Vina, e minha irmã Alana, por todo o amor, apoio e suporte em toda a minha vida. Agradeço também a toda a minha grande e linda família, avó, tios e primos que sempre estiveram juntos comigo. Minha família é uma das maiores fontes de alegria na minha vida.

À minha família Bola de Neve Juiz de Fora, por ter me acolhido e me mostrado como é viver em comunhão. Especialmente à Ana Paula e ao Leomar, por toda força e amizade.

Ao meu orientador Rafael, pela oportunidade de trabalho e aprendizado, e pela disposição em me orientar em uma área totalmente nova para mim.

Ao Lemos Laboratório<sup>®</sup> pela parceria e doação de parte das amostras.

Ao professor Olavo dos Santos Pereira Júnior, da Faculdade de Farmácia da UFJF, pela ajuda durante o trabalho e viabilização das coletas no Hospital Universitário.

Aos meus amigos de graduação, especialmente a galera do quadrado (Kamila, William, Giselle, Taimara, Fernanda, Juliana, Alessandra, Carol, Maria, Natália e Tasiane).

Aos meus amigos do laboratório Ângela, Paola, Agatha, Joseane, Jefferson, Fernanda, Náira, Thalles, Rafael Oliveira, Jemima e Marciel. Obrigado por toda a ajuda e a convivência agradável.

Ao aluno Hugo Camarano Belgo, que fez seu trabalho de conclusão de curso dentro deste projeto.

Aos alunos de iniciação científica Caroline e Maurício por toda a contribuição a esse trabalho.

Aos professores do departamento de química que foram muito importantes na minha formação: Antônio Carlos, Gustavo, Rosana, Renato, Luiz Fernando, Marcone, Flávia, Ana Paula, Emanuel, Ivoni e Mara.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e à Capes pelo apoio financeiro.

“Não imitem o comportamento e os costumes deste mundo, mas deixem que Deus os transforme por meio de uma mudança em seu modo de pensar, a fim de que experimentem a boa, agradável e perfeita vontade de Deus para vocês.”

(BÍBLIA, Romanos, 12, 2)

## RESUMO

Saliva é um fluido biológico composto por vários compostos orgânicos e inorgânicos. Sua composição rica, em decorrência de um processo de formação complexo, leva a saliva a ser um fluido biológico importante para coletar informações fisiológicas do organismo. Compostos orgânicos em saliva humana têm sido largamente estudados e a correlação de seus níveis com condições fisiológicas são bem reportados na literatura, mas, para os constituintes inorgânicos, não há tantos estudos quanto sobre os orgânicos. Além disso, há lacunas na literatura sobre estudos que investigam o preparo de amostras de saliva de forma sistemática, muitas vezes sendo encontrados procedimentos de digestão ácida complexos e pouco discutidos. Neste contexto, o objetivo do presente projeto foi desenvolver um método para análise direta de saliva humana para determinação dos metais por F AAS e F AES. O método desenvolvido forneceu resultados equivalentes aos obtidos através do método de referência, a digestão ácida. Assim, o método desenvolvido foi aplicado em dois estudos de caso. O primeiro envolveu determinar a composição de Ca, K, Mg e Na na saliva de 109 indivíduos, com o objetivo de investigar implicações desses níveis com seis condições fisiológicas: sexo, desordem de glicose no sangue, osteoporose, palpitações cardíacas, massa muscular diminuída e perda de peso não intencional. Foi verificado que homens apresentaram tendência a maiores concentrações de K que mulheres, idosos apresentaram tendência a menores valores de Ca, Na e K, pessoas sem desordem de glicose no sangue apresentaram tendência a maiores concentrações de Ca, pessoas com osteoporose apresentaram tendência a menores concentrações de Ca, pessoas com palpitações cardíacas apresentaram tendência a menores concentrações de Na e Ca e maiores de Mg, pessoas sem alterações na massa muscular apresentaram tendências a maiores concentrações de Na que pessoas com diminuição de massa muscular e pessoas com perda de peso não intencional apresentaram tendência a menores valores de Na e Ca. O segundo estudo de caso envolveu 30 amostras de pacientes renais submetidos à hemodiálise. As amostras foram coletadas antes e depois do procedimento de hemodiálise e os resultados para Ca, K, Mg e Na apresentaram variações sem um padrão, aumentando e diminuindo de forma diferente para cada paciente. Embora um padrão não tenha sido identificado, os resultados indicaram que o procedimento de hemodiálise interfere na composição mineral da saliva.

**Palavras-chave:** Preparo de amostra. Determinação de metais. Saliva humana. Espectrometria de Absorção Atômica. Sódio. Potássio, Magnésio. Cálcio.



## ABSTRACT

Saliva is a biological fluid composed by several organic and inorganic compounds. Its rich composition, due to a complex formation process, allows saliva to be an important biological fluid for collecting information from the organism. Organic compounds in human saliva have been largely studied and the correlation of their levels with physiological conditions are well reported in literature but, concerning inorganic constituents, there are not as much studies as on organic. Furthermore, there are gaps in literature concerning studies that investigate saliva samples preparation in a systematic way, many times being found very complex and little discussed acid digestion procedures. In this context, the aim of the present project was to develop a method for direct analysis of human saliva to determine metals by F AAS and F AES. The developed method provided results equivalent to those obtained through the reference method, the acid digestion. Thereby, the developed method was applied in two case studies. The first one involved to determine the Ca, K, Mg and Na salivary composition from 109 individuals, aiming to investigate implications of these levels to six physiological conditions: sex, blood glucose disorder, osteoporosis, heart palpitation, decreased muscular mass and unintentional weight loss. It was verified that men showed tendency to higher K concentrations than women, elderly showed tendency to lower Ca, Na and K values, people without blood glucose disorder showed tendency to higher Ca concentrations, people with osteoporosis showed tendency to lower Ca concentrations, people with heart palpitation showed tendency to lower Na and Ca concentrations and higher Mg concentrations, people without alterations in muscular mass showed tendency to higher Na concentrations than people with decreased muscular mass and people with unintentional weight loss showed tendency to lower Na and Ca values. The second case study involved 30 samples from people submitted to hemodialysis. The samples were collected before and after hemodialysis procedure and the results for Ca, K, Mg and Na showed variations without a pattern, increasing and decreasing in different ways to each patient. Although a pattern have not been identified, the results indicated that the hemodialysis procedure interfered in the salivary mineral composition.

**Keywords:** Sample preparation. Metal determination. Human saliva. Atomic Absorption Spectrometry. Sodium. Potassium. Magnesium. Calcium.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	– Classes de espécies/compostos orgânicos e inorgânicos mais encontrados na saliva e alguns exemplos.....	16
Desenho 1	– Desenho ilustrando as posições das glândulas salivares parótidas, sublinguais e submandibulares de um organismo humano.....	17
Fotografia 1	– Tubos de amostras recebidos do Lemos Laboratório®.....	29
Fotografia 2	– Imagem do digestor assistido por radiação micro-ondas modelo SpeedWave Four, da marca Berghof.....	31
Fotografia 3	– Imagem do banho ultrassônico modelo USC 2800, da marca Unique.....	32
Fotografia 4	– Imagem da centrífuga de bancada modelo NT 810, da marca Nova Técnica....	32
Fotografia 5	– Imagem do espectrômetro de absorção atômica modelo SOLAAR M5, da marca Thermo Scientific.....	33
Fotografia 6	– Imagem do fotômetro de chama modelo DM-61, da marca Digimed.....	34
Fotografia 7	– Imagem do deionizador modelo Purelab Option-Q, da marca Elga.....	35
Fotografia 8	– Imagem do condutivímetro de bancada modelo HMCDB-150, da marca Highmed.....	35
Fotografia 9	– Fotos de uma mistura obtida pela diluição de uma amostra de saliva em água.....	41
Gráfico 1	– Gráfico mostrando as variações nas concentrações de Na e K em uma suspensão de uma amostra ao longo de 95 dias.....	43
Gráfico 2	– Curva de adição de padrão de Mg preparada com uma amostra mistura, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F AAS.....	44
Gráfico 3	– Curva de adição de padrão de Mg em meio de HNO <sub>3</sub> 2% (v/v), preparada com uma amostra mistura, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F AAS.....	45
Gráfico 4	– Curva de adição de padrão de Mg em meio de Triton X-100 0,1% (v/v), preparada com uma amostra mistura, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F AAS.....	46
Gráfico 5	– Curva de adição de padrão de Mg, preparada com uma amostra mistura submetida à sonicação, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F AAS.....	47
Gráfico 6	– Curva de pirólise para determinação de Mn em saliva humana por GF AAS....	51

Figura 1	– Sinais de absorvância de Mn para as temperaturas de pirólise de 1100 °C (a) e 1400 °C (b) para amostra de saliva humana.....	51
Gráfico 7	– Curva de atomização para determinação de Mn em saliva humana por GF AAS.....	52
Figura 2	– Sinais de absorvância de Mn para as temperaturas de pirólise de 1300 (a), 1500 (b), 1700 (c), 1800 (d) e 2500 °C (e).....	53
Gráfico 8	– Comparação das curvas externas e de adição de padrão para Mg, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata.....	61
Gráfico 9	– Comparação das curvas externas e de adição de padrão para Ca, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata.....	62
Gráfico 10	– Comparação das curvas externas e de adição de padrão para Na, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata.....	62
Gráfico 11	– Comparação das curvas externas e de adição de padrão para K, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata.....	63
Gráfico 12	– Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de Mg determinados para as 109 amostras.....	69
Gráfico 13	– Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de Ca determinados para as 109 amostras.....	70
Gráfico 14	– Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de Na determinados para as 109 amostras.....	70
Gráfico 15	– Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de K determinados para as 109 amostras.....	71
Gráfico 16	– Gráficos <i>boxplot</i> apresentando os valores de concentração de Mg, Ca, Na e K para as 109 amostras.....	71
Gráfico 17	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração de Mg, Ca, Na e K entre homens e mulheres nas 109 amostras.....	74
Gráfico 18	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas até 59 anos e de 60 em diante.....	75
Gráfico 19	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem desordens de glicose no sangue.....	76
Gráfico 20	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem osteoporose.....	77

Gráfico 21	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem palpitações cardíacas.....	78
Gráfico 22	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg entre pessoas com e sem palpitações cardíacas.....	78
Gráfico 23	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem diminuição de massa muscular.....	79
Gráfico 24	– Gráficos <i>boxplot</i> comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem perda de peso não intencional.....	80
Figura 3	– Capa da edição de Abril da revista <i>Analytical Methods</i> , que apresenta uma arte gráfica baseada no presente projeto.....	94
Figura 4	– Parte da primeira página do artigo, onde aparecem informações que permitem que ele seja encontrado no site da revista.....	95
Gráfico 25	– Perfil de uma curva de titulação condutimétrica de Cl <sup>-</sup> com AgNO <sub>3</sub> obtida para uma das amostras de saliva analisada.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Condições experimentais para as determinações de Ca e Mg por F AAS, Na e K por F AES e Mn por GF AAS.....	33
Tabela 2	– Programa de aquecimento da digestão assistida por radiação micro-ondas para a amostra mistura de saliva.....	37
Tabela 3	– Valores estimados de densidade para cinco amostras aleatórias de saliva.....	42
Tabela 4	– Concentrações determinadas em triplicata para Na e K na amostra mistura inicial, através dos dois métodos de digestão ácida: assistida por micro-ondas e na chapa de aquecimento.....	55
Tabela 5	– Valores calculados e tabelados de F e t para comparação entre os métodos de digestão assistida por radiação micro-ondas e na chapa de aquecimento.....	55
Tabela 6	– Concentração determinadas para Mg, Ca, Na e K em uma amostra mistura de saliva, obtidas com e sem centrifugação antes da análise.....	57
Tabela 7	– Concentrações determinadas para Mg, Ca, Na e K no sobrenadante de uma amostra mistura de saliva, obtidas através de digestão ácida e através de análise direta (apenas diluição em água), com todos os procedimentos realizados em triplicata.....	59
Tabela 8	– Parâmetros analíticos das curvas de calibração externa construídas para Mg, Ca, Na e K.....	60
Tabela 9	– Concentrações determinadas de Mg, Ca, Na e K em uma amostra mistura e valores de recuperação cada analito, obtidos em ensaios de adição e recuperação.....	64
Tabela 10	– Concentrações determinadas para Na e K em uma amostra mistura de saliva humana, obtidas por calibração externa com e sem padrão interno.....	65
Tabela 11	– Valores obtidos para limite de detecção, limite de quantificação e concentração característica para os analitos através método proposto.....	66
Tabela 12	– Concentrações determinadas de Na, K, Mg e Ca nas 109 amostras.....	67
Tabela 13	– Concentrações determinadas de Mg, Ca, Na e K para amostras dos pacientes renais, coletadas antes e depois da hemodiálise.....	81
Tabela 14	– Valores de Cl <sup>-</sup> determinados em triplicata na solução de NaCl preparada.....	97
Tabela 15	– Concentrações de Cl <sup>-</sup> determinadas por titulação condutimétrica para 25 amostras.....	98

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

CE	Eletofórese Capilar, do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AES	Espectrometria de Emissão Atômica em Chama, do inglês <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MW	Micro-ondas, do inglês <i>Microwave</i>
RSD	Desvio-padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
s	Desvio-padrão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	UTILIZAÇÃO DE SALIVA COMO FLUIDO BIOLÓGICO PARA DIAGNÓSTICOS.....	18
1.2	TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA ANÁLISE DE SALIVA.....	21
1.3	PREPARO DE SALIVA PARA ANÁLISE.....	23
1.4	QUESTÕES ÉTICAS.....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>28</b>
3.1	OBTENÇÃO E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS.....	28
<b>3.1.1</b>	<b>Questões Éticas</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Critérios de Inclusão e Exclusão de Doadores</b> .....	<b>30</b>
3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	30
3.3	LIMPEZA DOS MATERIAIS.....	30
3.4	EQUIPAMENTOS.....	31
3.5	PREPARO DE AMOSTRA.....	36
<b>3.5.1</b>	<b>Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas</b> .....	<b>36</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Digestão em chapa de aquecimento</b> .....	<b>37</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Centrifugação das amostras</b> .....	<b>37</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Estimativa da densidade das amostras</b> .....	<b>37</b>
3.6	OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL.....	38
3.7	DESCARTE DOS RESÍDUOS.....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>41</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A AMOSTRA.....	41
<b>4.1.1</b>	<b>Estabilidade da suspensão</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Heterogeneidade da suspensão</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Considerações sobre determinação de Mn por GF AAS</b> .....	<b>48</b>
4.1.3.1	<i>Otimização das condições experimentais</i> .....	49
4.1.3.2	<i>Uso de modificador químico</i> .....	49
4.1.3.3	<i>Temperatura de Secagem</i> .....	49
4.1.3.4	<i>Temperatura de Pirólise</i> .....	50
4.1.3.5	<i>Temperatura de Atomização</i> .....	52
4.2	PREPARO DE AMOSTRA.....	54

4.2.1	<b>Comparação entre as digestões ácidas assistida por radiação micro-ondas e em chapa de aquecimento</b> .....	<b>54</b>
4.2.2	<b>Otimização do método proposto e comparação com o método de referência</b> .....	<b>56</b>
4.3	<b>CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO PROPOSTO</b> .....	<b>59</b>
4.4	<b>APLICAÇÃO DO MÉTODO</b> .....	<b>66</b>
4.4.1	<b>Amostras recebidas do Lemos Laboratório®</b> .....	<b>67</b>
4.4.2	<b>Amostras coletadas no Hospital Universitário</b> .....	<b>80</b>
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>83</b>
5.1	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>86</b>
	<b>ANEXO A – Artigo publicado</b> .....	<b>94</b>
	<b>ANEXO B – Determinação de Cloreto em parte das amostras</b> .....	<b>96</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido biológico encontrado na cavidade bucal, composto por vários compostos orgânicos e inorgânicos, originários principalmente das glândulas salivares, da gengiva e da mucosa oral. Além disso, os compostos encontrados na saliva são também originados das vias respiratórias superiores, da orofaringe, do refluxo gastrointestinal, de resíduos alimentares e do sangue (LIMA; DINIZ; MOIMAZ; SUMIDA *et al.*, 2010). Ou seja, para sua composição, a saliva tem contribuições de fontes locais da cavidade bucal, assim como de outros sistemas do organismo. Mais especificamente, as substâncias que compõem a saliva compreendem peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, hormônios e eletrólitos (CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007; KUBALA; STRZELECKA; GRZEGOCKA; LIETZ-KIJAK *et al.*, 2018; PFAFFE; COOPER-WHITE; BEYERLEIN; KOSTNER *et al.*, 2011), como apresentado no Quadro 1. Apesar dessa composição complexa, cerca de 98 a 99,5% da saliva é composta por água (KUBALA; STRZELECKA; GRZEGOCKA; LIETZ-KIJAK *et al.*, 2018; PINK; SIMEK; VONDRAKOVA; FABER *et al.*, 2009).

Cerca de 90% do volume de saliva é produzido por três tipos de glândulas salivares principais: parótidas, sublinguais e submandibulares, como apresentado no Desenho 1. Embora essas sejam as principais, há também um elevado número (de 200 a 400) de glândulas salivares menores, que contribuem com cerca de 10% do volume total (KUBALA; STRZELECKA; GRZEGOCKA; LIETZ-KIJAK *et al.*, 2018). As células parótidas são totalmente serosas, ou seja, secretam apenas fluido aquoso, enquanto as células sublinguais e submandibulares são seromucosas, produzindo tanto fluido aquoso, quanto mucoso (glicoproteico, mais espesso e viscoso que o aquoso). Já o total de glândulas menores é constituído tanto por glândulas serosas quanto por mucosas (CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007). Chama-se de saliva total o fluido composto por todas essas contribuições, sem nenhum tipo de separação devido à origem.

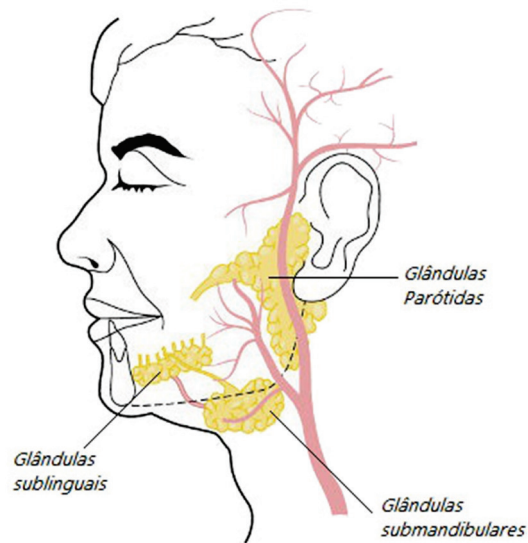
Os constituintes inorgânicos mais comuns na saliva são os íons sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, bicarbonato e fosfato. Eles vêm principalmente do sangue e podem ser transportados para a saliva através de processos ativos e passivos, ou seja, com e sem gasto de energia, respectivamente. Em relação aos íons metálicos,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  estão envolvidos no transporte ativo de substâncias através das membranas celulares, enquanto  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  tem a função de ativar algumas enzimas (CASTAGNOLA; PICCIOTTI; MESSANA; FANALI *et al.*, 2011; KUBALA; STRZELECKA; GRZEGOCKA; LIETZ-KIJAK *et al.*, 2018).

Quadro 1 – Classes de espécies/compostos orgânicos e inorgânicos mais encontrados na saliva e alguns exemplos

<b>Tipo de substâncias</b>	<b>Espécies/Compostos</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Inorgânicas</b>	Íons metálicos	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>
	Ânions	Cl <sup>-</sup> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
<b>Orgânicas</b>	Ácidos graxos	Ácido α-linoleico Ácido araquidônico
	Aminas	Putrecina Cadaverina Indol
	Anticorpos	Anticorpos de HIV Anticorpos de Hepatite C
	Antioxidantes	Ácido úrico Bilirrubina Creatina
	Enzimas	Amilase salivar Lisozima
	Carboidratos	Glicose
	Hormônios	Aldosterona Cortisol Estradiol Progesterona Testosterona
	Lipídios	Colesterol Glicerídeos de ácidos graxos
	Outras proteínas	Albumina Cistatinas Histatinas Mucinas

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Desenho 1 – Desenho ilustrando as posições das glândulas salivares parótidas, sublinguais e submandibulares de um organismo humano



Fonte: <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/glandulas-salivares.htm>, acesso em 15-04-2020 às 18h30.

As concentrações de íons  $K^+$  e  $HCO_3^-$  na saliva são consideravelmente altas, enquanto as de  $Na^+$  e  $Cl^-$  são bem menores; as concentrações desses quatro íons são intimamente relacionadas. Durante o processo de secreção, a saliva flui pelos dutos salivares, onde ocorre modificação acentuada em sua composição iônica. Nesses dutos, os íons  $Na^+$  sofrem reabsorção ativa, enquanto os íons  $K^+$  são secretados ativamente, em troca com os íons  $Na^+$ . Deste modo, a concentração de íons  $Na^+$  é bastante reduzida, enquanto a de  $K^+$  é acentuadamente aumentada. A concentração de  $K^+$  na saliva pode ser até sete vezes maior que no plasma, enquanto a concentração de  $Na^+$  pode variar de 1/7 a 1/10 da concentração encontrada no plasma (GUYTON; HALL; ESBÉRARD; CIPOLLA NETO *et al.*, 1997).

Conforme a saliva passa pelos dutos salivares, o processo de reabsorção de  $Na^+$  continua e há excesso dessa reabsorção em relação à de  $K^+$ , o que gera potencial negativo nestes dutos. Isto causa efeito na concentração de  $Cl^-$ , que cai para níveis baixos juntamente com os íons  $Na^+$  (GUYTON; HALL; ESBÉRARD; CIPOLLA NETO *et al.*, 1997).

Os íons  $HCO_3^-$  também são secretados pelos dutos e essa secreção é, em partes, devido à troca destes íons com íons  $Cl^-$ . Como resultado, a concentração de  $HCO_3^-$  pode ser até três vezes maior que no plasma e a de  $Cl^-$ , assim como de  $Na^+$ , pode ser de 1/7 a 1/10 de sua concentração no plasma (GUYTON; HALL; ESBÉRARD; CIPOLLA NETO *et al.*, 1997).

A composição da saliva também pode ser alterada pela forma como ela é produzida. Existem formas de estimular sua produção, levando a aumentos no volume produzido durante determinado período de tempo. Jensdottir *et al.* mostraram duas formas de estimulação: a primeira corresponde à mastigação de goma de mascar não-ácida e a segunda corresponde à sucção de uma bala ácida dura, sem mastigar. No primeiro caso, a estimulação se dá devido ao sabor da goma de mascar, associado à mastigação; no segundo caso, a estimulação acontece devido ao sabor da bala, associado à presença de substâncias ácidas. Foi mostrado que a saliva produzida de forma estimulada apresenta concentração dos componentes diferentes das concentrações observadas quando ela é produzida de forma não estimulada (JENSDOTTIR; NAUNTOFTE; BUCHWALD; BARDOW, 2005). Outros métodos de estimulação da produção de saliva são mastigação de cera de parafina, mastigação de elásticos de borracha e manter na boca substâncias como cristais de suco em pó ou alimentos contendo ácidos (CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007).

De maneira geral, um ser humano adulto produz de 500 a 1500 mL de saliva por dia, a uma taxa de cerca de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Condições fisiológicas e patológicas podem, no entanto, alterar qualitativa e quantitativamente a produção de saliva. Alguns desses fatores são: estado fisiológico e hormonal, idade, influências hereditárias, higiene oral, uso de drogas e práticas de exercícios (PFAFFE; COOPER-WHITE; BEYERLEIN; KOSTNER *et al.*, 2011).

A saliva tem diversas funções importantes para o organismo, entre elas: participação no sistema digestivo e também na ingestão de alimentos, ajuda na reconstituição dos tecidos moles, balanceamento da microflora oral e remineralização dos dentes. Sua contribuição para o sistema digestivo se deve ao fato de possuir em sua composição a amilase salivar, uma enzima que inicia a digestão de amido já na boca. Além disso, muitos processos imunes e defensivos ocorrem através de proteínas salivares (PINK; SIMEK; VONDRAKOVA; FABER *et al.*, 2009). Por esses motivos, a xerostomia, condição clínica caracterizada pela alteração da quantidade e qualidade de saliva, traz um impacto negativo não só para a boca, mas também para todo o corpo.

## 1.1 UTILIZAÇÃO DE SALIVA COMO FLUIDO BIOLÓGICO PARA DIAGNÓSTICOS

Por suas propriedades, sua importância para o corpo e a contribuição do sangue para sua composição, a saliva tem sido vista como uma ferramenta útil no diagnóstico e monitoramento do estado clínico de uma pessoa, podendo indicar desordens tanto estritamente orais quanto do organismo como um todo. Por causa de sua origem, composição, funções e interações com outros sistemas do organismo, a análise da saliva é uma importante fonte para a avaliação de condições fisiológicas e patológicas (CASTAGNOLA; PICCIOTTI; MESSANA; FANALI *et al.*, 2011;

CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007; LIMA; DINIZ; MOIMAZ; SUMIDA *et al.*, 2010; PFAFFE; COOPER-WHITE; BEYERLEIN; KOSTNER *et al.*, 2011).

Kalk *et al.* demonstraram que a saliva é um ótimo fluido para o diagnóstico da síndrome de Sjögren, tendo potencial inclusive para substituir outros fluidos cujas coletas são mais invasivas. Nesse estudo, o método de diagnóstico foi através das concentrações de sódio, cloreto e fosfato na saliva, assim como o fluxo de saliva produzida por grupos específicos de glândulas salivares (KALK; VISSINK; STEGENGA; BOOTSMA *et al.*, 2002).

Elloumi *et al.* estudaram o período de recuperação de atletas de *rugby* baseando-se nas mudanças dos níveis de cortisol e testosterona na saliva por uma semana após a competição. Foi mostrado que a razão entre os níveis de testosterona e cortisol na saliva constitui um importante marcador biológico para alteração na homeostase (estado de equilíbrio do organismo, independente de alterações do meio externo) no período seguinte à uma competição (ELLOUMI; MASO; MICHAUX; ROBERT *et al.*, 2003).

Vários estudos mostram a saliva como um excelente fluido para o diagnóstico de infecções bacterianas e virais, através da quantificação de anticorpos (CROWCROFT; VYSE; BROWN; STRACHAN, 1998; HODINKA; NAGASHUNMUGAM; MALAMUD, 1998; YAARI; TOVBIN; ZLOTNICK; MOSTOSLAVSKY *et al.*, 2006). De forma semelhante, testes de saliva para anticorpos específicos também são importantes para avaliação da imunidade no corpo humano em resposta à vacinação (NIEMINEN; ESKOLA; KÄYHTY, 1998).

Em um estudo de 2004, Siqueira *et al.* mostraram que a concentração de sódio na saliva de crianças com síndrome de Down é cerca de 65% maior que em crianças saudáveis da mesma faixa etária. Já a concentração de íons potássio é cerca de 30% menor (SIQUEIRA; DE OLIVEIRA; MUSTACCHI; NICOLAU, 2004). De forma semelhante, Kurban *et al.* mostraram a correlação entre níveis de zinco na saliva de pacientes com distúrbios na tireoide e pessoas saudáveis. Foi concluído que a quantidade de zinco na saliva decresce em casos de hipotireoidismo e hipotireoidismo subclínico (KURBAN; MEHMETOGLU; YERLIKAYA; GÖNEN, 2013). Existem, porém, poucos estudos como esse, correlacionando níveis de íons metálicos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  com desordens no organismo. Em sua grande maioria, os estudos com saliva se concentram na determinação de seus componentes orgânicos.

Em anos recentes, tem-se visto o aumento no número de estudos realizando análise de saliva para diagnósticos (MCGEER; LEE; KENNEDY; MCGEER, 2020; TAAHERI; BAKHSHI; ARYANKIA; NOORMOHAMMADI, 2014). Há esforços sendo realizados no sentido de se estabelecer uma fundação científica internacional para diagnósticos através de saliva (ISFSD, *International Scientific Foundation of Salivary Diagnosis*), com o objetivo de criar protocolos

padronizados para a utilização da saliva como fluido de diagnóstico (MEDIOUNI; KACZOR-URBANOWICZ; MADIOUNI, 2019). Com a possível criação dessa fundação, esse campo de estudos provavelmente irá crescer e se tornar ainda mais relevante.

Em relação ao número de amostras utilizado nos estudos, encontra-se grande variação. Foi realizado um levantamento da literatura envolvendo 21 artigos com estudos de análise de saliva humana, em sua maioria para determinação de espécies metálicas, mas alguns para determinação de espécies orgânicas. Dentre eles, quatro têm foco em desenvolvimento de método ou avaliações instrumentais, tendo número de amostras de saliva analisados variando de 1 a 30 (BURGUERA P; SANCHEZ DE BRICEÑO; RONDON; BURGUERA *et al.*, 1998; CHEN; BAIR; HSU; CHIU *et al.*, 2015; OLMEDO; PLA; HERNÁNDEZ; LÓPEZ-GUARNIDO *et al.*, 2010; SAAR-REISMAA; VAHER; KALJURAND; KULP *et al.*, 2017). Cinco deles tem foco na aplicação para avaliação de contaminação por exposição ambiental, tendo o número de amostras variando de 49 a 274 (BHOWMICK; KUNDU; ADHIKARI; CHATTERJEE *et al.*, 2015; COSTA DE ALMEIDA; UMBELINO DE FREITAS; BARBOSA; TANUS-SANTOS *et al.*, 2009; GIL; HERNÁNDEZ; MÁRQUEZ; FEMIA *et al.*, 2011; NTIHABOSE; SURETTE; FOUCHER; CLARISSE *et al.*, 2018; WANG; DU; ZHENG, 2008). Os demais visam a utilização da saliva como meio de diagnóstico ou para avaliação de condições fisiológicas, tendo o número de amostras variando de 20 a 1095 (CROWCROFT; VYSE; BROWN; STRACHAN, 1998; ELLOUMI; MASO; MICHAUX; ROBERT *et al.*, 2003; KALK; VISSINK; STEGENGA; BOOTSMA *et al.*, 2002; KIM; KIM; KHO, 2010; KURBAN; MEHMETOGLU; YERLIKAYA; GÖNEN, 2013; SHIGEMI; TANAKA; HAYASHIDA; MAKI, 2008; SIQUEIRA; DE OLIVEIRA; MUSTACCHI; NICOLAU, 2004; STAFF; HARDING; MORTON; JONES *et al.*, 2014; SUZUKI; FURUHASHI; SESOKO; KOSUGE *et al.*, 2016; WATANABE; TANAKA; SHIGEMI; HAYASHIDA *et al.*, 2009; YAARI; TOVBIN; ZLOTNICK; MOSTOSLAVSKY *et al.*, 2006; ZAMANI POZVEH; SEIF; GHALAYANI; MALEKI *et al.*, 2015).

A importância da composição mineral da saliva também pode ser evidenciada através de estudos que avaliam sua composição para a verificação de contaminação de pessoas por espécies inorgânicas. Alguns desses estudos mostram a utilização da análise de saliva para estimar exposição ambiental e ocupacional a contaminantes inorgânicos, tais como chumbo (COSTA DE ALMEIDA; UMBELINO DE FREITAS; BARBOSA JR; TANUS-SANTOS *et al.*, 2009; NRIAGU; BURT; LINDER; ISMAIL *et al.*, 2006), manganês (WANG; DU; ZHENG, 2008), cádmio (TALIO; LUCONI; MASI; FERNÁNDEZ, 2010), cromo (GIL; HERNÁNDEZ; MÁRQUEZ; FEMIA *et al.*, 2011), entre outros.

A saliva também atua como meio extrator de contaminantes inorgânicos presentes na cavidade bucal. Alguns estudos apresentaram a determinação de chumbo, cobre, níquel e cromo na saliva de pessoas que usam aparelhos ortodônticos que continham esses metais (KALIČANIN; AJDUKOVIĆ, 2008; MIKULEWICZ; CHOJNACKA; WOŹNIAK; DOWNAROWICZ, 2011). Quando pessoas têm contato com contaminantes inorgânicos e esses entram em seus organismos, um dos locais possível para acumulação são os dentes. Em adição a isso, a saliva tem a capacidade de extrair essas espécies acumuladas nos dentes (MIKULEWICZ; CHOJNACKA; WOŹNIAK; DOWNAROWICZ, 2011). Portanto, através de sua análise, podem-se obter informações sobre níveis de contaminantes inorgânicos nos dentes e no corpo como um todo.

Normalmente, a dosagem de metais no organismo requer fluidos como sangue ou urina, que não apresentam coleta tão simples quanto a da saliva. Neste contexto, a saliva se apresenta como uma alternativa não-invasiva e de amostragem mais simples.

Embora seja possível a retirada de saliva de conjuntos de glândulas específicas, tais procedimentos não são simples. Entretanto, a coleta de saliva total não estimulada é bastante simples, rápida e não demanda um profissional treinado (CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007). Além disso, a saliva total é mais representativa do todo, já que é composta por fluidos originários das diversas glândulas salivares, além das contribuições de outros sistemas do organismo, como citado anteriormente. Apesar de simples, alguns cuidados na coleta devem ser tomados para minimizar influências externas na produção da saliva, como a não ingestão de alimentos e líquidos (com exceção de água) ou escovação dental por, pelo menos, uma hora anterior à coleta.

Atualmente, o desenvolvimento de análises de fluidos biológicos obtidos a partir de meios não-invasivos é muito desejável; e essa é uma das grandes vantagens de se utilizar a saliva como fluido de análise. Ela é um material cuja coleta é não-invasiva, rápida e apresenta baixo custo.

## 1.2 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA ANÁLISE DE SALIVA

A análise de amostras de saliva pode ser realizada através de diferentes técnicas, dependendo dos analitos. É comum a utilização de métodos colorimétricos associados a técnicas espectrofotométricas (até mesmo kits específicos são vendidos para essa finalidade), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Eletroforese Capilar (CE), Espectrometria de Massas (MS) e outras (CHEN; BAIR; HSU; CHIU *et al.*, 2015; CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007; SAAR-REISMAA; VAHER; KALJURAND; KULP *et al.*, 2017;

SUZUKI; FURUHASHI; SESOKO; KOSUGE *et al.*, 2016). Especificamente para espécies metálicas, frequentemente se usa CE (MORI; HU; HASEBE; TANAKA *et al.*, 2002; TIMERBAEV, 2008), ICP-MS (Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado), ICP OES (Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado) (BHOWMICK; KUNDU; ADHIKARI; CHATTERJEE *et al.*, 2015; KIM; KIM; KHO, 2010; NTHABOSE; SURETTE; FOUCHER; CLARISSE *et al.*, 2018; ZAMANI POZVEH; SEIF; GHALAYANI; MALEKI *et al.*, 2015), AAS (Espectrometria de Absorção Atômica) e AES (Espectrometria de Emissão Atômica) (JENS DOTIR; NAUNTOFTE; BUCHWALD; BARDOW, 2005; OLMEDO; PLA; HERNÁNDEZ; LÓPEZ-GUARNIDO *et al.*, 2010; SHIGEMI; TANAKA; HAYASHIDA; MAKI, 2008). No presente projeto foram utilizadas as técnicas F AAS (Espectrometria de Absorção Atômica em Chama) para determinação de Ca e Mg e F AES (Espectrometria de Emissão Atômica em Chama) para determinação de K e Na.

As técnicas espectrométricas se baseiam nos processos de absorção e emissão de radiação eletromagnética por espécies químicas. Mais especificamente, as técnicas F AAS e F AES se baseiam, respectivamente, na absorção e na emissão de radiação eletromagnética por átomos de determinado elemento químico.

O processo de absorção atômica acontece quando um átomo no estado fundamental absorve energia radiante, passando para um nível de energia mais elevado. Essa radiação que incide nos átomos é emitida por uma fonte externa e a quantidade absorvida pelos mesmos é proporcional às suas concentrações na amostra. Esse processo de absorção acontece com átomos gasosos no estado fundamental, que são gerados através de um atomizador. No caso da F AAS, o atomizador é a chama; para a GF AAS, o atomizador é o forno de grafite.

O processo de emissão de radiação acontece quando um átomo (ou íon) gasoso em um estado excitado emite energia radiante e retorna a um nível de menor energia (WELZ; SPERLING, 1999). Assim como no processo de absorção atômica, a quantidade de radiação emitida por uma amostra é proporcional à concentração dos elementos geradores dessa emissão, na amostra. Para esse processo acontecer é necessário que os átomos ou íons sejam excitados e isso é realizado através de um estímulo externo, como calor ou energia elétrica. No caso da F AES, esse estímulo é uma chama de gás liquefeito de petróleo (GLP).

As técnicas de F AAS, F AES e GF AAS são bem estabelecidas e largamente utilizadas em pesquisas e diversas aplicações. A F AAS e a F AES apresentam limites de detecção na faixa de  $\text{mg L}^{-1}$ , enquanto a GF AAS na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Além disso, esta última apresenta sensibilidade maior que F AAS e F AES, embora tenha uma menor frequência analítica. De maneira geral, são técnicas seletivas, com precisão e exatidão adequadas para muitas



finalidades, especialmente para determinação de elementos ao nível de traços. Além disso, estas técnicas apresentam custos moderados, quando comparadas com outras, como ICP OES e ICP-MS, o que pode propiciar que sejam mais empregadas pelos laboratórios de análise.

### 1.3 PREPARO DE SALIVA PARA ANÁLISE

Um dos grandes desafios das pesquisas em Química Analítica é o preparo das amostras. Obter as espécies de interesse em forma adequada para uma análise específica pode ser um processo complexo, envolvendo muitas etapas, reagentes, equipamentos, tempo e energia. De maneira geral, o preparo de amostras é a etapa mais demorada de todo o processo analítico (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016).

Além de demorado e dispendioso, o preparo de amostra também pode oferecer riscos de contaminação e de perdas de analitos por volatilização, já que muitos procedimentos envolvem temperaturas elevadas (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016). Por isso, levando-se em consideração economia de tempo e recursos, o ideal é que a etapa de preparo das amostras garanta que os analitos estejam em forma adequada para determinação, mas também que os processos envolvidos sejam o mais simples possível.

Um método de preparo de amostra comum para a determinação de metais é a decomposição ácida por via úmida, também chamada digestão ácida. Nele, um ácido, uma mistura de ácidos ou, eventualmente, peróxido de hidrogênio são empregados e aquecidos juntamente com a amostra. Idealmente, a digestão ácida decompõe toda a matriz orgânica da amostra, mantendo os íons metálicos em solução, livres de interferências. Isso é possível porque grande parte dos metais pode ser convertida em espécies inorgânicas não voláteis e estáveis em meio ácido (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016).

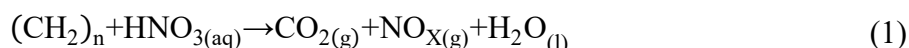
Por estes motivos, a digestão ácida é um método convencional para preparo de amostras para determinação de metais. Muitos trabalhos, inclusive, utilizam a digestão ácida como método de referência para comparações com novos métodos propostos (ADOLFO; DO NASCIMENTO; LEAL; BOHRER *et al.*, 2020; ÁLVAREZ; CARRILLO, 2012; DOS SANTOS; DE ANDRADE; GALVÃO; FELSNER, 2019; LOURDES, 2016).

Duas técnicas amplamente utilizadas são a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e digestão ácida com aquecimento convectivo (chapa de aquecimento). A digestão em chapa de aquecimento é realizada em um sistema aberto e, portanto, submetida apenas à pressão atmosférica. Por ser um equipamento simples, a chapa de aquecimento não demanda acessórios e materiais caros para sua utilização e, normalmente, sua manutenção não envolve grandes

custos. Por isso e por fornecer digestões eficientes para muitas aplicações, a digestão ácida na chapa de aquecimento é largamente utilizada.

Entretanto, por se tratar de um sistema aberto, há risco de perda de analitos voláteis, especialmente quando se trabalha com temperaturas elevadas. Além disso, há maior risco de contaminação, especialmente quando reagentes são adicionados continuamente durante o processo. Com isso, normalmente o consumo de reagentes é maior e a eficiência da digestão pode ser menor, quando comparada com sistemas fechados (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016). Mas, mesmo podendo apresentar os problemas citados, é um procedimento muito difundido e que fornece ótimos resultados quando os procedimentos são realizados com o rigor necessário.

Em contrapartida, há a vantagem de ser possível a digestão de massas de amostra elevadas e também de se ter controle maior durante todo o processo, podendo-se, inclusive, ter indicação visual de quando a digestão chega ao fim (ou resta apenas matéria orgânica em nível residual). Isso é possível porque a decomposição da matéria orgânica ocorre com a liberação de vapores nitrosos, que possuem coloração marrom intensa (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016). A reação química envolvida está representada na equação geral não balanceada apresentada na Equação 1.



Os vapores marrons liberados são devido à formação de  $\text{NO}_2$  durante a decomposição. Além de  $\text{NO}_2$ , outra espécie comumente formada é  $\text{NO}$ , que reage com o oxigênio do ar formando  $\text{NO}_2$  (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016).

A digestão assistida por radiação micro-ondas é realizada em sistema fechado, sendo possível submeter a amostra a altas pressões. Com isso, a eficiência da digestão pode ser consideravelmente maior que na chapa de aquecimento e consumir um tempo menor. Além disso, o risco de contaminação e o consumo de reagentes são menores, embora a massa possível de amostra a ser digerida também seja menor. Entretanto, a grande desvantagem em relação à chapa de aquecimento é o elevado custo do equipamento, dos acessórios e da manutenção (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016).

Apesar de sua ampla utilização e da possibilidade de obtenção de ótimos resultados, a digestão ácida é um método laborioso, demanda o uso de reagentes e energia, além de oferecer risco de contaminação das amostras e perda de analitos ao longo das etapas. Com isso, a frequência

analítica é reduzida, já que o preparo pode gastar até 2/3 do tempo total de análise, e o custo geral da análise é maior que métodos mais simples e com menos etapas (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016).

Nos últimos anos, tem-se valorizado cada vez mais métodos de preparo de amostras ambientalmente amigáveis, que gerem cada vez menos impactos ao meio ambiente. Para isso, é importante minimizar uso de reagentes e energia, de forma que menos resíduos sejam gerados e que haja menos riscos para o analista e para o ambiente (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; LENARDÃO; FREITAG; DABDOUB; BATISTA *et al.*, 2003). Neste contexto, métodos de preparo de amostra que evitem digestão ácida são interessantes e podem ser ambientalmente amigáveis, o que é particularmente oportuno quando se considera os princípios da Química Verde.

No caso da saliva, embora seja uma amostra com composição complexa, a grande porcentagem de água em sua composição contribui para uma digestão ácida mais fácil do que outros fluidos biológicos com maior percentual de matéria orgânica. Entretanto, ainda assim, se encontra na literatura procedimentos laboriosos para a decomposição da matéria orgânica.

Ntihabose *et al.* digeriram amostras de saliva com ácido nítrico concentrado, usando uma proporção de ácido/amostra de 1:5. O procedimento consistiu no aquecimento da mistura de ácido e amostra a 65 °C por 48h, para posterior determinação de Mn (NTIHABOSE; SURETTE; FOUCHER; CLARISSE *et al.*, 2018). Lemos *et al.* digeriram 2,0 mL de saliva com 4,0 mL de ácido nítrico concentrado e 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v), aquecendo a mistura em um forno a 75 °C por 6h, para posterior determinação de Hg (LE MOS; DOS SANTOS, 2014). Bohwmick *et al.* propuseram um método simples e menos laborioso, com ácido nítrico concentrado sendo adicionado a uma solução da amostra de forma a se obter concentração final de ácido de 2% (v/v), para a determinação de As (BHOWMICK; KUNDU; ADHIKARI; CHATTERJEE *et al.*, 2015). É importante notar que esses estudos citados não fornecem muitos detalhes sobre algumas das etapas do preparo de amostras como, por exemplo, o método de aquecimento. Isso dificulta a aplicação ou reprodução dos métodos descritos. Essa avaliação de alguns estudos na literatura indica que não é possível concluir que as amostras de saliva realmente precisam de tratamentos tão “intensos” como estes reportados acima.

Em situações em que há elevado número de amostras a serem analisadas é particularmente interessante um preparo de amostra simplificado, de modo a se aumentar a frequência analítica. Nesses casos, métodos com menos etapas ou mesmo baseados em análise direta podem ser avaliados ou desenvolvidos, como feito neste trabalho.

#### 1.4 QUESTÕES ÉTICAS

Para a utilização de amostras humanas em projetos de pesquisa é necessária a aprovação de um Comitê de Ética. O processo de avaliação ética é demorado e bastante burocrático, já que tem o objetivo de proteger os indivíduos que doam amostras para serem analisadas. Para isso, é necessário que os pesquisadores envolvidos tenham formação e experiência adequadas para o trabalho e se cerquem de todos os cuidados exigidos para a proteção da identidade e de possíveis dados dos doadores, para evitar ao máximo qualquer tipo de exposição. Além disso, o processo também visa assegurar o correto manuseio, armazenamento e descarte de amostras e resíduos gerados em todas as etapas, de forma a proteger o meio ambiente e também todos os profissionais envolvidos direta ou indiretamente em qualquer uma das etapas do projeto. Assim, um trabalho ambiental e socialmente responsável pode ser realizado.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra de saliva humana para determinação de Mg, Ca, Na e K e aplicação do método desenvolvido em amostras coletadas para estudos de caso, com o intuito de investigar possíveis correlações dos níveis destes metais com condições fisiológicas dos doadores.

Dentro disso, os objetivos específicos desse trabalho foram:

- a) avaliação de métodos de preparo de amostra baseados em digestão ácida e comparação de seus desempenhos em relação à análise direta;
- b) desenvolvimento de um método analítico para a determinação de Mg e Ca por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (F AAS) e de Na e K por Espectrometria de Emissão Atômica em Chama (F AES);
- c) aplicação do método desenvolvido em dois estudos de caso: um para amostras cedidas pelo Lemos Laboratório<sup>®</sup> e outro para amostras de pacientes renais submetidos à hemodiálise no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora;
- d) investigação de possíveis correlações entre os níveis de metais encontrados e condições fisiológicas dos doadores.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Os aspectos experimentais envolvidos nesse trabalho estão descritos nessa seção, que engloba a obtenção e a armazenagem das amostras, as questões éticas envolvidas em trabalhos que utilizam amostras humanas, descrições de soluções, reagentes, equipamentos e limpeza dos materiais utilizados, assim como dos procedimentos de preparo de amostra, da otimização instrumental e do descarte dos resíduos gerados.

#### 3.1 OBTENÇÃO E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste projeto foram obtidas de duas formas: parte foi cedida pelo Lemos Laboratório<sup>®</sup> e parte foi coletada pelo discente. O Lemos Laboratório<sup>®</sup> é um laboratório de exames clínicos situado na cidade de Juiz de Fora; uma das opções de exames oferecida a seus clientes é a dosagem de hormônios em saliva. O Lemos Laboratório<sup>®</sup> atende clientes tanto de Juiz de Fora, quanto de outras cidades. Em casos de outras cidades, as amostras são enviadas através de kits adquiridos pelos clientes, que fazem coleta própria em suas casas. Em parceria firmada com o Lemos Laboratório<sup>®</sup>, ficou acordado que parte da saliva recebida em sua rotina seria doada para o aproveitamento no presente projeto, com a devida autorização do doador.

Os clientes dos quais as amostras foram coletadas foram consultados sobre a possibilidade da utilização de sua saliva em estudos acadêmicos. Nos casos em que os clientes permitiram, o Lemos Laboratório<sup>®</sup> encaminhou o volume em excesso para o uso neste projeto. No total, foram recebidas 109 amostras de indivíduos diferentes, com um volume médio de 3 mL cada.

As coletas foram realizadas de forma não estimulada, ou seja, sem uso de nenhum tipo de substância ou alimento para estimular a produção da saliva. O procedimento de coleta foi bastante simples: o indivíduo cuspiu no tubo fornecido até que o volume coletado fosse adequado. Em seguida, o tubo era selado e armazenado para posterior envio ao Lemos Laboratório<sup>®</sup>. Por ter utilizado esse método de coleta, as amostras obtidas são consideradas como saliva total, já que tem contribuições de todas as glândulas salivares de forma conjunta.

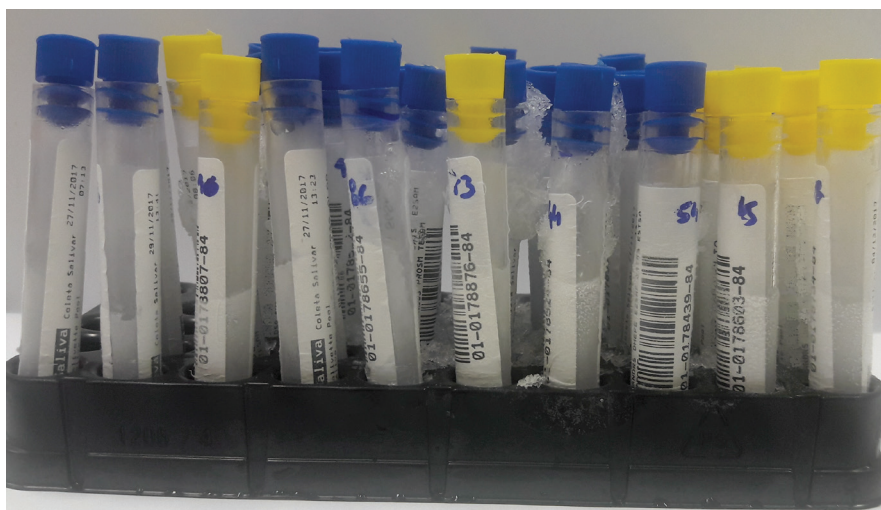
O Lemos Laboratório<sup>®</sup> também forneceu alguns dados clínicos de cada um dos doadores, com a devida autorização dos mesmos. Deste modo, não houve contato nenhum entre o discente e os doadores cujas amostras foram cedidas pelo Lemos Laboratório<sup>®</sup>. Esses dados clínicos incluíram idade, peso, uso de medicamentos, doenças existentes e alguns sintomas diversos. É importante ressaltar, no entanto, que essas informações foram declaradas pelo próprio doador.

Além disso, o discente realizou coleta de amostras no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora. Foram coletadas amostras de 15 pacientes renais que estavam sendo submetidos à hemodiálise. Como o interesse era verificar se haveria variações nos níveis dos analitos na saliva possivelmente causada pela hemodiálise, coletou-se uma amostra antes e uma depois do procedimento para cada paciente, totalizando 30 amostras. Os pacientes que concordaram em doar amostras receberam os tubos e realizaram a coleta individualmente em um lugar onde sua privacidade fosse garantida, seguindo o mesmo procedimento utilizado pelo Lemos Laboratório®.

Todas as amostras, tanto as doadas pelo Lemos Laboratório®, quanto as coletadas pelo discente, foram armazenadas sob refrigeração a -18 °C a partir do momento que chegavam ao laboratório de trabalho e eram mantidas dessa forma até sua utilização. A Fotografia 1 mostra alguns tubos com amostras na forma como foram recebidos pelo Lemos Laboratório®.

Todos os doadores e seus dados clínicos, quando disponíveis, foram tratados como números, para a preservação total da identidade de cada um. Logo, os nomes dos doadores não foram publicados ou expostos de nenhuma forma.

Fotografia 1 – Tubos de amostras recebidos do Lemos Laboratório®



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

### 3.1.1 Questões Éticas

Por envolver amostra de fluidos humanos, esse projeto necessitou de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

O projeto foi submetido ao CEP, de acordo com as normas da universidade, e aprovado tanto para recebimento das amostras do Lemos Laboratório®, quanto para coleta própria do

discente. O número do parecer de aprovação para recebimento de amostras do Lemos Laboratório® é 1.942.856 e o número do parecer de aprovação para coleta própria é 2.243.017.

### 3.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão de Doadores

A população disponível para a doação de amostras de saliva para esse projeto foi formada pelas pessoas que utilizaram o Lemos Laboratório® para análise hormonal de saliva, seja por iniciativa própria ou por indicação médica. E, dentre essas, foram incluídas pessoas com diferentes perfis para que os dados obtidos pudessem ter o máximo de abrangência possível. Além disso, foram incluídas pessoas que utilizavam o Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora para tratamento de hemodiálise.

No grupo de doadores estão pessoas com idade variando de 23 a 78 anos. Não foram incluídos no trabalho pessoas com transtornos mentais, doenças infecciosas ou em estágio terminal.

## 3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Ácido nítrico concentrado (Vetec, 65% (m/m)) foi utilizado nos procedimentos de digestão e também foi adequadamente diluído para se obter a concentração de 1% (v/v) em todas as soluções de padrões preparadas.

As soluções dos analitos foram preparadas a partir de diluições de soluções estoque de padrões para Espectrometria de Absorção Atômica de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . As soluções padrões de trabalho de sódio (SpecSol), potássio (SpecSol), magnésio (Vetec) e cálcio (Ultra Scientific) foram preparadas nas faixas de  $5\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $15\text{-}60 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,10\text{-}0,40 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,00\text{-}4,75 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Todas essas soluções foram preparadas em meio de  $\text{HNO}_3$  1% (v/v) e em triplicatas autênticas.

Utilizou-se também  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{NaCl}$  sólidos para preparo de soluções para determinação de cloreto por titulação condutimétrica, utilizando condutivímetro de bancada (Highmed HMCDB-150).

## 3.3 LIMPEZA DOS MATERIAIS

Todos os materiais e vidrarias utilizados com as amostras e soluções preparadas foram previamente lavados com água de abastecimento e detergente, seguido de um segundo enxague



com água deionizada. Após isso, foram levados à um banho de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) e deixados submersos por 24 horas para descontaminação. Após isso, os materiais e vidrarias eram secos à temperatura ambiente para, então, serem utilizados.

### 3.4 EQUIPAMENTOS

As digestões ácidas foram realizadas através de um digestor assistido por radiação micro-ondas (modelo SpeedWave Four, Berghof), apresentado na Fotografia 2 e uma chapa de aquecimento digital (modelo SXD 125, Sterilifer). A sonicação das amostras foi realizada em um banho ultrassônico com potência de 150 W (modelo USC 2800, Unique), apresentado na Fotografia 3, enquanto as centrifugações foram realizadas em uma centrífuga de bancada (modelo NT 810, Nova Técnica), apresentada na Fotografia 4.

Fotografia 2 – Imagem do digestor assistido por radiação micro-ondas modelo SpeedWave Four, da marca Berghof



Fonte: <https://www.dksh.com/global-en/products/ins/berghof-microwave-digester-speedwave-4>, acesso em 11-11-2020, às 10h25.

Fotografia 3 – Imagem do banho ultrassônico modelo USC 2800, da marca Unique



Fonte: <http://www.unique.ind.br/usc2800.html>, acesso em 11-11-2020, às 12:25.

Fotografia 4 – Imagem da centrífuga de bancada modelo NT 810, da marca Nova Técnica



Fonte: <https://novatecnica.com.br/produtos/centrifugas-laboratorio/nt810-centrifuga-laboratorial-bancada.html>, acesso em 11-11-2020, às 12h30.

As determinações de Ca e Mg foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica (modelo SOLAAR M5, Thermo Scientific), apresentado na Fotografia 5. A mistura de gases empregada para determinação de Mg foi ar/acetileno, com vazão de acetileno de  $1,1 \text{ L min}^{-1}$ . Para Ca, a mistura de gases foi óxido nitroso/acetileno, com vazão de acetileno de  $4,0 \text{ L min}^{-1}$ . Todos os gases utilizados tinham pureza acima de 99%. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco monoelementares como fonte de radiação, operando com corrente a 75%, e lâmpada

de Deutério (D<sub>2</sub>) como corretor de fundo. Mais condições experimentais como comprimentos de onda para cada analito, fenda espectral e corrente das lâmpadas estão apresentadas na Tabela 1.

Fotografia 5 – Imagem do espectrômetro de absorção atômica modelo SOLAAR M5, da marca Thermo Scientific



Fonte: <https://www.labwrench.com/equipment/19810/thermo-scientific-thermo-solaar-m6>, acesso em 20-11-2020 às 17h30.

Tabela 1 – Condições experimentais para as determinações de Ca e Mg por F AAS, Na e K por F AES e Mn por GF AAS

Analito	Comprimento de onda (nm)	Fenda espectral (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Altura do queimador (mm)	Gases	Vazão de combustível (L min <sup>-1</sup> )
Mg	285,2	0,5	4	7,0	Ar comp./C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	1,1
Ca	422,7	0,5	6	9,4	N <sub>2</sub> O/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	4,0
Na	590	–	–	–	Ar comp./GLP	5,0
K	766	–	–	–	Ar comp./GLP	5,0
Mn	279,5	0,2	5	–	Ar	–

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Obs.: Ca e Mg foram determinados por F AAS, K e Na por F AES e Mn por GF AAS

Para os estudos iniciais com Mn, as determinações foram realizadas por GF AAS, com lâmpada de cátodo oco emitindo em 279,5 nm, com fenda espectral de 0,2 nm e corrente da lâmpada de 5 mA, conforme mostrado na Tabela 1. O corretor de fundo também foi uma lâmpada de Deutério. O gás de purga utilizado foi argônio comercial, com 99,9% de pureza; durante a atomização, a vazão do gás era interrompida durante a atomização.

As determinações de Na e K foram realizadas em um fotômetro de chama (modelo DM-61, Digimed), apresentado na Fotografia 6, com GLP (Ultrafaz) como combustível e ar comprimido como oxidante. O fluxo do combustível foi de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . Estas informações e os comprimentos de onda de emissão para estes analitos utilizados nas análises estão apresentados na Tabela 1. Além das informações apresentadas na Tabela 1, para F AES algumas condições adicionais foram: resolução de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , tempo de resposta de 8 segundos e velocidade de aspiração de  $(5,8 \pm 0,1) \text{ mL min}^{-1}$ . Essas informações são relevantes para F AES, já que o consumo relativamente elevado de solução pode ser um fator crítico quando se tem acesso a pouco volume de cada amostra individual, como ocorreu neste projeto.

Fotografia 6 – Imagem do fotômetro de chama modelo DM-61, da marca Digimed



Fonte: <http://www.furb.br/web/3065/cursos/graduacao/cursos/nutricao/infraestrutura>, acesso em 11-11-2020, às 12h.

Água ultrapura, com condutância menor que  $0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$ , utilizada em todas as soluções preparadas foi obtida em um deionizador (Elga Purelab Option-Q), apresentado na Fotografia 7.

Fotografia 7 – Imagem do deionizador modelo Purelab Option-Q, da marca Elga



Fonte: <https://profilab24.com/en/laboratory/water-stills-treatment/elga-purelab-option-q-7-bp>, acesso em 11-11-2020, às 12h15.

Medidas de condutividade foram realizadas em um condutivímetro de bancada (Highmed HMCDB-150), apresentado na Fotografia 8.

Fotografia 8 – Imagem do condutivímetro de bancada modelo HMCDB-150, da marca



Highmed

Fonte: <https://www.highmed.com.br/hmcd-b-150-condutivimetro-microprocessado-bancada/p>, acesso em 11-11-2020, às 12h20.

### 3.5 PREPARO DE AMOSTRA

Três métodos de preparo de amostra foram avaliados neste estudo e serão detalhados nas sessões seguinte, a saber:

- a) digestão ácida assistida por radiação micro-ondas;
- b) digestão ácida em chapa de aquecimento;
- c) análise direta precedida por uma etapa de pré-tratamento, na qual as amostras foram centrifugadas.

Todos os procedimentos de preparo de amostra e validação analítica foram realizados com amostras misturas, formadas por alíquotas de várias amostras individuais, de acordo com a disponibilidade de amostras em cada etapa do estudo. Nos procedimentos realizados com finalidade de comparação com outros, foi utilizada uma mesma amostra mistura.

#### **3.5.1 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas**

Uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  da amostra mistura foi transferida para um frasco de Teflon. Após isso, 4,0 mL de ácido nítrico concentrado e 3,7 mL de água deionizada foram adicionados; o frasco foi fechado e levado ao digestor, seguindo o programa de aquecimento apresentado na Tabela 2. O sistema foi aquecido até 180 °C durante um período de 20 minutos e mantido nessa temperatura por mais 20 minutos. Então a temperatura foi diminuída a 50 °C durante um período de um minuto. Em seguida, o sistema foi desligado e os frascos foram levados para a capela, onde permaneceram fechados até atingirem a temperatura ambiente. Após isso, os frascos foram abertos e as soluções resultantes foram transferidas para um balão volumétrico de 25,00 mL, que foi preenchido com água deionizada até a marca de aferição. Esse procedimento foi realizado com triplicatas autênticas e um frasco para o branco do método foi preparado, onde todos os reagentes foram adicionados, mas não a amostra, e então submetido à mesma rampa de temperatura que as amostras.

Tabela 2 – Programa de aquecimento da digestão assistida por radiação micro-ondas para a amostra mistura de saliva

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (min)	Tempo (min)	Potência* (%)
1	180	20	20	80
2	50	1	0	0

Fonte: Adaptado de Manual de Métodos Berghof (2013)

\* Potência máxima aplicada: 1200 W

### 3.5.2 Digestão em chapa de aquecimento

Uma alíquota de 300 µL da amostra mistura foi transferida para um béquer e 2,0 mL de ácido nítrico concentrado foram adicionados. O béquer foi levado à chapa de aquecimento e coberto com um vidro de relógio, de forma que o sistema fosse mantido em refluxo. O béquer então foi aquecido a 80 °C por 50 minutos. Após resfriado a temperatura ambiente, a solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 25,00 mL, que foi preenchido até a marca de aferição com água deionizada. Esse procedimento foi realizado com triplicatas autênticas e um béquer para o branco do método também foi preparado, onde todos os reagentes foram adicionados, mas não a amostra, e então submetido ao mesmo procedimento de digestão que as amostras.

### 3.5.3 Centrifugação das amostras

A centrifugação da amostra mistura e das amostras individuais foi realizada a 3500 rpm (2421 x g) por 10 minutos. Após isso, o sobrenadante foi transferido para um frasco adequado para posterior utilização, mantendo a mesma proporção de diluição feita nas digestões, como citado no item anterior.

A unidade para indicar rotação apresentada acima (x g) é a RCF (Força Centrífuga Relativa). Uma RCF de 2421 x g significa que a força centrífuga que está sendo aplicada é 2421 vezes maior que a força gravitacional da Terra (PENDLETON, 2006).

### 3.5.4 Estimativa da densidade das amostras

As densidades das amostras foram estimadas diretamente através do cálculo da razão massa/volume. Para isso, no momento em que as soluções de amostras foram preparadas, um

volume de 300  $\mu\text{L}$  de amostra foi medido com micropipeta e dispensado diretamente em um tubo de Falcon já posicionado na balança. Assim a massa dessa alíquota foi determinada e a densidade calculada.

### 3.6 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

Alguns parâmetros analíticos de desempenho foram avaliados para o método proposto. Estes parâmetros foram determinados para cada analito através da análise de soluções de padrões em diferentes concentrações e de uma amostra mistura. Os parâmetros escolhidos, de acordo com a IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983; THOMPSON; ELLISON STEVEN; FAJGELJ; WILLETTS *et al.*, 1999) e outros protocolos (BRITO; DE AMARANTE JUNIOR; POLESE; RIBEIRO, 2003; NTHABOSE; SURETTE; FOUCHER; CLARISSE *et al.*, 2018), incluem limites de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) e quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*), faixa linear, precisão, exatidão e, no caso das análises por Espectrometria de Absorção Atômica, concentração característica ( $C_0$ ).

Os parâmetros LOD e LOQ foram calculados seguindo recomendações da IUPAC e de artigos na literatura (DA SILVA CAMPOS ALMEIDA; ALMEIDA PESSANHA; SANT'ANA; SANTOS SIMÕES *et al.*, 2019; IUPAC, 1997; M<sup>a</sup>; LOURDES; MIMURA; SOUSA *et al.*, 2016; MIMURA; FERREIRA; SILVA, 2017), de acordo com as Equações 2 e 3.

$$\text{LOD} = \frac{3sB}{S} \quad (2)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10sB}{S} \quad (3)$$

em que  $sB$  é o desvio-padrão do coeficiente linear e  $S$  é o coeficiente angular da curva analítica.

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a normalidade dos resíduos da curva de calibração e a homocedasticidade foi avaliada através do teste de Cochran. A linearidade e a falta de ajuste da regressão foram avaliadas através de ANOVA.

Foi realizada uma procura por material de referência certificado para amostra de saliva humana nos principais fornecedores, mas não foi encontrado. Por isso, a exatidão foi avaliada



por estudos de adição e recuperação, de acordo com a Equação 4. Para isso, foram adicionados às amostras volumes adequados das soluções padrões dos analitos Mg, Ca, Na e K. Além disso, efeitos de matriz foram avaliados através de comparações de calibração externa com calibração por adição de padrão.

$$R\% = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde R% é o fator de recuperação em porcentagem,  $C_1$  é a concentração do analito na amostra na qual o padrão foi adicionado,  $C_2$  é a concentração do analito na amostra sem adição de padrão e  $C_3$  é a concentração esperada devido à quantidade de padrão adicionada.

A concentração característica é um parâmetro para avaliação de sensibilidade em determinações por F AAS. Ela é definida como a concentração do analito que fornece absorvância de 0,0044 u.a., que corresponde à absorção de 1% da radiação que chega à amostra (WELZ; SPERLING, 1999). Assim,  $C_0$  é calculada através da Equação 5.

$$C_0 = \frac{C \times 0,0044}{A} \quad (5)$$

em que C é a concentração de uma solução padrão escolhida e A é a absorvância correspondente a essa solução padrão escolhida.

As condições experimentais da F AAS foram otimizadas utilizando soluções padrão dos analitos e estão apresentadas na Tabela 1, no item 3.4, juntamente com as condições da F AES. Como a F AES foi realizada através de um fotômetro de chama, foram utilizadas as condições de fábrica do equipamento.

Testes estatísticos foram realizados nos dados obtidos nos estudos de validação. O teste F foi realizado para comparação das variâncias de dois métodos, utilizando a Equação 6.

$$F_{cal} = \frac{s^2_{maior}}{s^2_{menor}} \quad (6)$$

em que  $s^2_{maior}$  é a maior variância entre os dois métodos e  $s^2_{menor}$  é a menor variância.

O teste t não-pareado com variância agrupada foi realizado para comparação entre os resultados obtidos por dois métodos diferentes. Para isso, é necessário calcular a variância agrupada ( $S_{agrupado}$ ) e o valor de t, através das Equações 7 e 8, respectivamente.

$$s_{\text{agrupado}} = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2}} \quad (7)$$

em que  $n_1$  é o número de medidas realizadas através do método 1,  $n_2$  é o número de medidas realizadas através do método 2,  $s_1^2$  é a variância do método 1 e  $s_2^2$  é a variância do método 2.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{\text{agrupado}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (8)$$

em que  $\bar{x}_1$  é a média dos valores obtidos pelo método 1 e  $\bar{x}_2$  é a média dos valores obtidos pelo método 2.

Por estar relacionado às concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , como mencionado anteriormente,  $\text{Cl}^-$  também foi determinado em algumas amostras por titulação condutimétrica e estes resultados estão apresentados no Anexo 2. Utilizou-se a Equação 9 para o cálculo do erro relativo ( $E\%$ ), uma estimativa da exatidão de um resultado obtido em relação ao valor real na amostra.

$$E\% = \left( \frac{C_m - C_r}{C_r} \right) \times 100 \quad (9)$$

em que  $C_m$  é a concentração medida e  $C_r$  é a concentração real da solução padrão de  $\text{NaCl}$   $0,008 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.7 DESCARTE DOS RESÍDUOS

Como o objeto de estudo desse projeto é um fluido biológico, os resíduos gerados precisaram ser tratados de forma diferenciada dos demais resíduos gerados no laboratório de trabalho. Assim, os resíduos e os descartáveis que tiveram contato com as amostras foram armazenados separadamente, para posterior encaminhamento à incineração.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos em cada uma das etapas desse trabalho estão apresentados nessa seção, juntamente com as discussões relacionadas, englobando características das amostras, considerações sobre a determinação de Mn por GF AAS, procedimentos de preparo de amostra, características analíticas do método desenvolvido e aplicação do método em dois estudos de caso.

### 4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS

A saliva é uma amostra biológica bastante complexa, apesar de ser composta por cerca de 98 a 99,5% de água (CHIAPPIN; ANTONELLI; GATTI; DE PALO, 2007; KUBALA; STRZELECKA; GRZEGOCCA; LIETZ-KIJAK *et al.*, 2018; LIMA; DINIZ; MOIMAZ; SUMIDA *et al.*, 2010). Uma evidência experimental disso foi a observação de que a maior parte das amostras obtidas (recebidas e coletadas) não formavam uma solução totalmente translúcida, pois apresentavam partículas sólidas, suspensas no meio, como mostra a Fotografia 9.

Fotografia 9 – Fotos de uma mistura obtida pela diluição de uma amostra de saliva em água



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Além da secreção produzida nas glândulas salivares, a saliva também é formada por resíduos provenientes da gengiva e da mucosa oral, assim como mucos da faringe e da cavidade nasal, restos alimentares (que podem ser minimizados ao se realizar a coleta de pessoas em jejum por algumas horas) e células epiteliais e do sangue (CASTAGNOLA; PICCIOTTI;

MESSANA; FANALI *et al.*, 2011). Essa composição extremamente complexa é o que faz com que a grande maioria das amostras de saliva apresentassem partículas sólidas. Entretanto, apesar da quantidade destas partículas variar visualmente de pessoa para pessoa, as densidades das amostras são próximas entre si e, em alguns casos, ligeiramente acima da densidade da água. A Tabela 3 mostra valores de densidade estimados para cinco amostras aleatórias, identificadas como A<sub>X</sub>, com X variando de 1 a 5, a média, o desvio-padrão (s) e o desvio-padrão relativo (RSD).

Tabela 3 – Valores estimados de densidade para cinco amostras aleatórias de saliva

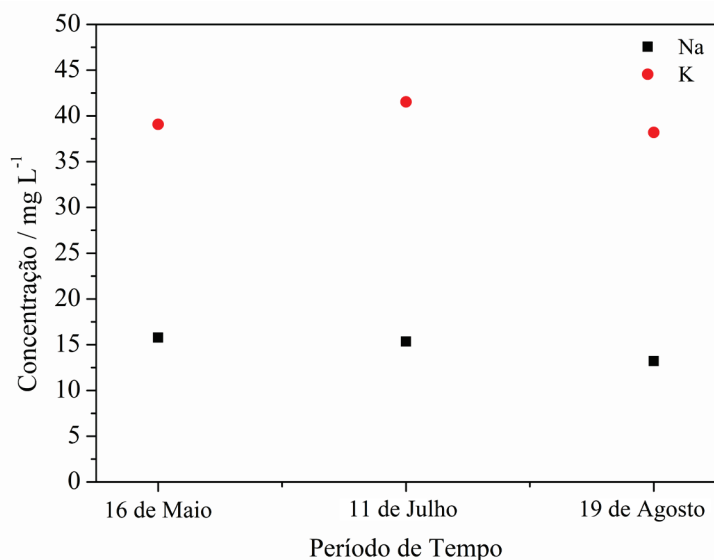
Amostra	Densidade estimada (g mL <sup>-1</sup> )
A <sub>1</sub>	1,0226
A <sub>2</sub>	1,0096
A <sub>3</sub>	1,0154
A <sub>4</sub>	0,9958
A <sub>5</sub>	1,0356
Média	1,0158
s	0,0148
RSD	1,5

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 4.1.1 Estabilidade da suspensão

Com a diluição de uma amostra em água, a suspensão formada tinha caráter heterogêneo, sendo possível perceber visualmente partículas sólidas de tamanhos diferentes. Depois de alguns minutos em repouso, essas partículas se depositam no fundo do frasco. Entretanto, com agitação, essas partículas podiam ser suspensas novamente. O Gráfico 1 apresenta as concentrações de Na e K para uma mesma amostra diluída em água, analisada três vezes ao longo de 95 dias, com agitação antes de cada análise.

Gráfico 1 – Gráfico mostrando as variações nas concentrações de Na e K em uma suspensão de uma amostra ao longo de 95 dias



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os valores de concentração mostrados no Gráfico 1 são os valores da solução de leitura. O RSD ao longo de 95 dias foi de 9,3% para Na e 4,4% para K, o que indica que a determinação desses dois metais majoritários não foi grandemente influenciada pela heterogeneidade da suspensão.

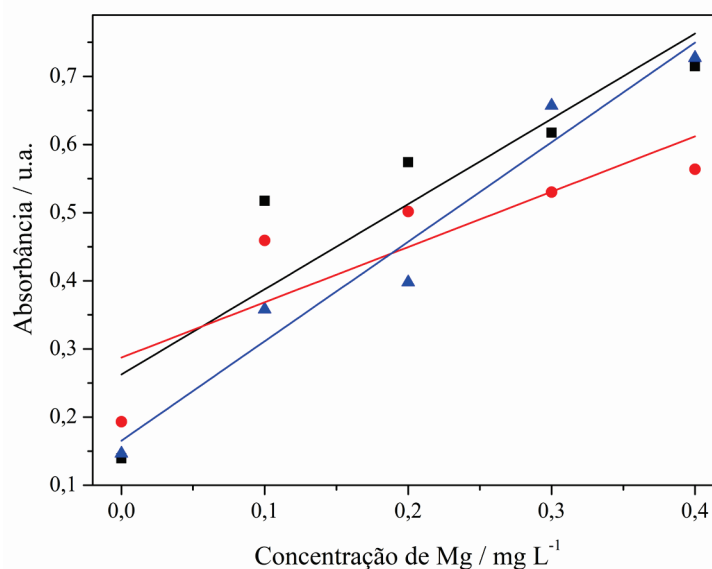
#### 4.1.2 Heterogeneidade da suspensão

Embora a heterogeneidade da suspensão não tenha influenciado na determinação dos analitos majoritários, para os constituintes minoritários foi observada grande influência, já que réplicas de uma mesma amostra apresentaram desvios padrão relativos muito elevados. Para essa avaliação foram feitos estudos com base no teor de Mg, um dos constituintes minoritários da saliva. As determinações de Mg foram realizadas por F AAS. Nesse estudo pretendia-se incluir também o Ca mas, por limitações circunstanciais, na ocasião, não foi possível a sua determinação.

Estudos da avaliação de efeitos de matriz serão apresentados adiante. Entretanto, nesse momento do projeto, para evitar tais efeitos, escolheu-se trabalhar com curvas de adição de padrão. O Gráfico 2 mostra uma curva de adição de padrão de Mg realizada em triplicata, preparada a partir de uma amostra mistura. Os gráficos estão apresentados com as triplicatas

em cada ponto experimental ao invés de barras de erros para ressaltar visualmente os altos desvios entre as réplicas.

Gráfico 2 – Curva de adição de padrão de Mg preparada com uma amostra mistura, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F AAS



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

É possível perceber que os pontos experimentais apresentam grande variação de sinal. O primeiro ponto, por exemplo, apresenta RSD de 18,3%, que é um valor extremamente alto para F AAS. É importante ressaltar que, apesar de visualmente a triplicata do primeiro ponto variar menos que as dos outros, os valores de absorbância são baixos, o que propicia desvios maiores quando os cálculos são realizados.

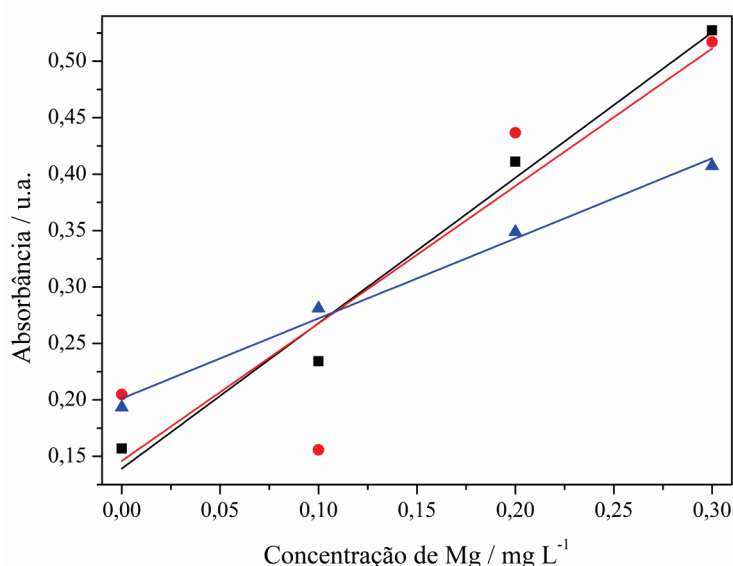
Essa grande variação acontece em decorrência da baixa homogeneidade da suspensão que é formada. Desse modo, cada alíquota que é pipetada fornecesse quantidades diferentes do analito, já que as partículas sólidas possuem tamanhos diferentes; isto impossibilita a obtenção de resultados confiáveis. Por isso, as curvas obtidas apresentaram baixa linearidade, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) nos valores de 0,8025, 0,7484 e 0,9577.

Como dito anteriormente, isso não foi observado para determinação de Na e K através do fotômetro de chama. Isso aconteceu porque este equipamento, que é baseado no fenômeno de emissão atômica, é consideravelmente menos sensível que o espectrômetro de absorção atômica. Por esse motivo, no fotômetro de chama, as variações nas alíquotas não causaram variações significativas nos sinais analíticos de Na e K, que são fornecidos pelo equipamento com apenas uma casa decimal. Além disso e principalmente, Na e K estão presentes nas amostras em

concentrações consideravelmente mais elevadas que Mg, o que fez com que pequenas variações nas alíquotas não fossem percebidas. Isso está dentro do esperado, já que constituintes minoritários são mais afetados pela heterogeneidade.

Um estudo na literatura propõe a acidificação da suspensão de saliva com HNO<sub>3</sub> (ZAMANI POZVEH; SEIF; GHALAYANI; MALEKI *et al.*, 2015). Isso foi testado em uma curva de adição de padrão preparada com uma amostra mistura em meio de HNO<sub>3</sub> 2%, que foi preparada em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Curva de adição de padrão de Mg em meio de HNO<sub>3</sub> 2% (v/v), preparada com uma amostra mistura, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F AAS



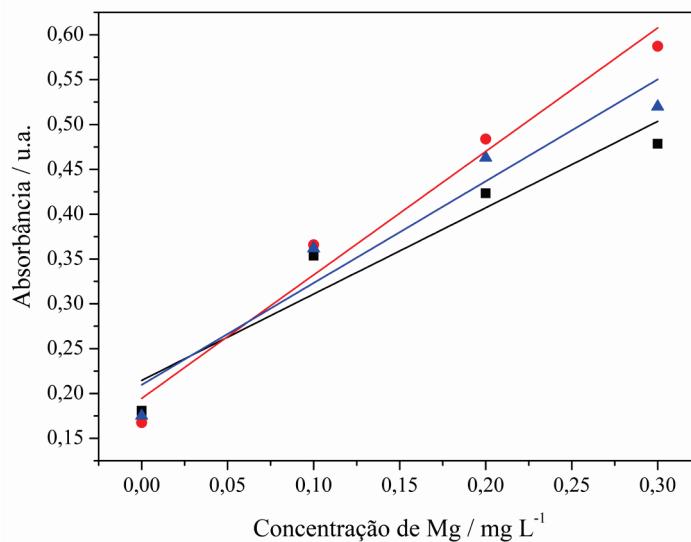
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Como pode ser observado, os sinais dos analitos nos pontos experimentais continuaram apresentando grande variação. Os valores de RSD variaram de 11 a 28% e os valores de R<sup>2</sup> para as três curvas foram 0,9804, 0,8025 e 0,9915, valores abaixo do que seria adequado para essas retas desse tipo.

Um outro estudo (BURGUERA P; SANCHEZ DE BRICEÑO; RONDON; BURGUERA *et al.*, 1998) relata a utilização de surfactantes para estabilização da suspensão. Para esse teste, uma nova curva de adição de padrão em triplicata foi preparada em meio de Triton X-100 0,1% (v/v). Os resultados estão apresentados no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Curva de adição de padrão de Mg em meio de Triton X-100 0,1% (v/v), preparada com uma amostra mistura, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F

AAS



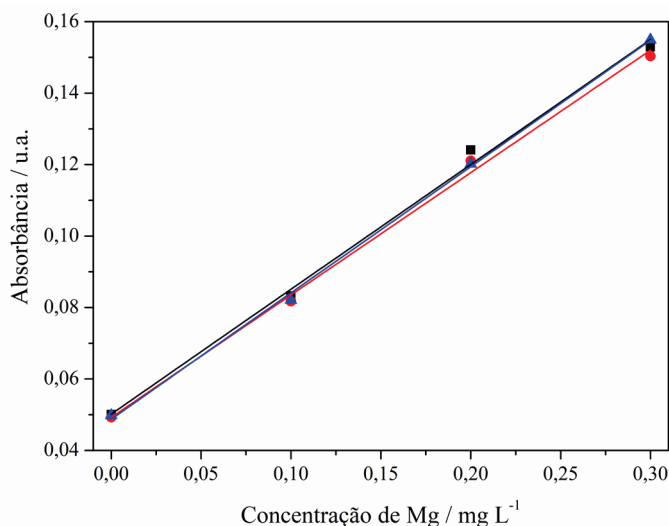
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Mesmo com o agente surfactante, os sinais apresentaram variações consideráveis, embora menores que nos casos anteriores. Ainda assim, as variações foram maiores do que o que seria aceitável e os valores de  $R^2$  das três curvas foram 0,9231, 0,9747 e 0,9374, também abaixo do aceitável para retas desse tipo.

Para solucionar esse problema de homogeneidade da suspensão, testou-se o efeito de ondas de ultrassom sobre as partículas. O processo de sonicação diminui o tamanho das partículas e, deste modo, era esperado que a homogeneidade da suspensão aumentasse. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 5.



Gráfico 5 – Curva de adição de padrão de Mg, preparada com uma amostra mistura submetida à sonicação, realizada em triplicata autêntica, com determinação de Mg por F AAS



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Com sonicação, os sinais de Mg apresentaram desvios padrão relativos baixos (todos menores que 1,7%) e a linearidade das curvas foi adequada, com valores de  $R^2$  de 0,9960, 0,9971 e 0,9991. A sonicação foi realizada por 15 minutos e, antes da retirada de cada alíquota, a suspensão foi sonicada por 15 segundos.

Portanto, os resultados mostraram que a sonicação torna a suspensão mais homogênea, já que diminui o tamanho das partículas, fazendo com que seja possível a retirada de alíquotas representativas. Assim, caso haja interesse na análise da suspensão formada pela diluição de saliva em água para determinação de micronutrientes, este procedimento torna-se viável. Além disso, por se tratar de um equipamento simples, é comum haver nos laboratórios um banho ultrassônico ou, caso não haja, a aquisição é “barata”. Isso pode ser particularmente interessante na rotina de laboratórios de análises clínicas.

Algumas considerações foram apresentadas acerca das amostras e foram citados dados obtidos para Mg, Na e K. Entretanto, várias das amostras recebidas foram analisadas para se verificar a presença de diversos outros metais, incluindo macro e micronutrientes. Por F AES analisou-se as amostras para investigar a presença de Na, K e Li, enquanto a técnica de F AAS foi utilizada para investigar a presença de Mg, Ca, Cu, Fe e Ni. Já por GF AAS as amostras foram analisadas para investigar a presença de Ag, As, Cd, Cr e Mn. Entretanto, foram obtidos sinais analíticos apreciáveis apenas para Na, K, Mg, Ca e Mn.

Como já mencionado, a concentração de  $\text{Cl}^-$  na saliva está fortemente relacionado às concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , que são os constituintes majoritários nas amostras; por isso, optou-se quantificar o íon  $\text{Cl}^-$  nas amostras. Essa análise foi realizada empregando-se a titulação condutimétrica para 25 das amostras. Essas amostras foram escolhidas de forma totalmente aleatória e, depois de escolhidas, constatou-se que elas representavam bem o conjunto amostral, já que compreenderam amostras de homens e mulheres de diversas faixas etárias. Os resultados obtidos serão apresentados no Anexo 2.

#### 4.1.3 Considerações sobre determinação de Mn por GF AAS

Inicialmente havia interesse na determinação de metais por GF AAS. Porém, como citado anteriormente, dos metais investigados por GF AAS, foi detectado sinal analítico apenas para Mn. Os constituintes traço, apesar de sua baixa porcentagem, apresentam funções importantes para o organismo. Como exemplo, pode-se citar a ação do Cr no combate à diabetes (PIERZAK, 2018). De forma semelhante, o Mn é um elemento essencial para o organismo humano, apesar de ser um constituinte traço. Está envolvido em processos fisiológicos importantes, como crescimento de ossos, desenvolvimento de cartilagem e tecido conjuntivo, funções reprodutivas, neuronais e nos sistemas imunológico e digestivo (SANTOS; BATOREU; MATEUS; MARREILHA DOS SANTOS *et al.*, 2014). Estudos realizados com pacientes submetidos à nutrição parenteral mostraram que pode haver desenvolvimento de dermatites, diminuição no crescimento de cabelos e unhas e perda de peso moderada quando há redução grande na administração de Mn (FRIEDMAN; FREELAND-GRAVES; BALES; BEHMARDI *et al.*, 1987; HARDY; GILLANDERS; HARDY, 2008). Portanto, o Mn é um elemento relevante para o organismo e interessante para o presente projeto.

Iniciou-se o estudo para determinação desse metal através da avaliação das condições instrumentais. Entretanto, após esse estudo inicial, a quantificação de Mn foi interrompida por problemas instrumentais que impediram a continuação do desenvolvimento do método e aplicação deste nas amostras. Ainda assim, alguns resultados foram obtidos e estão apresentados abaixo, podendo ser úteis para eventuais interessados na determinação de Mn em saliva humana por GF AAS.

Da mesma forma como foi discutido para os analitos quantificados nesse projeto, foi realizado um estudo para avaliar a presença de Mn nas partículas sólidas nas amostras. Os resultados mostraram que o sinal de Mn decresce mais de 80% depois que a amostra é centrifugada, o que demonstra que grande parte do sinal analítico de Mn vem das partículas sólidas na saliva.

A proposta inicial foi avaliar como as amostras responderiam ao serem analisadas sem qualquer diluição. Para isso, alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  de amostra foram diretamente introduzidas no tubo de grafite.

#### *4.1.3.1 Otimização das condições experimentais*

As principais etapas em um programa de aquecimento do GF AAS são secagem, pirólise e atomização. As temperaturas dessas etapas foram otimizadas de forma univariada, utilizando uma amostra mistura diluída em meio aquoso, com fator de diluição igual a 10.

#### *4.1.3.2 Uso de modificador químico*

O manual do equipamento indica o uso de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  como modificador químico para determinação de Mn. Entretanto, esse modificador apresentou altos sinais analíticos, comparáveis aos pontos mais altos da curva de calibração. As amostras, no entanto, fornecem sinais de Mn adequados para análise e os sinais de absorbância gerados (que serão mostrados a frente) possuem perfil dentro do esperado. Como será apresentado nas próximas seções, há quantidades apreciáveis de Mg naturalmente nas amostras. Assim, o Mg já presente nas amostras pode ter atuado como um modificador químico “natural”, levando a perfis adequados dos sinais de absorbância. Por esses motivos, realizou-se a otimização sem o uso de modificador químico.

#### *4.1.3.3 Temperatura de Secagem*

Para a definição da temperatura de secagem, normalmente se utiliza a temperatura de ebulição do solvente como parâmetro. Por esse motivo, inicialmente foi testada a temperatura de secagem de 100  $^\circ\text{C}$ .

Entretanto, com essa temperatura de secagem, passou-se a observar projeção de amostra do tubo durante a etapa seguinte, de pirólise. Uma das possíveis explicações para isso é que, nessa temperatura, não há evaporação eficiente do solvente. É importante notar que a viscosidade do meio é aumentada pela presença da saliva.

Dois estudos na literatura (BURGUERA P; SANCHEZ DE BRICEÑO; RONDON; BURGUERA *et al.*, 1998; OLMEDO; PLA; HERNÁNDEZ; LÓPEZ-GUARNIDO *et al.*, 2010) indicam a realização da secagem em duas etapas. Foi constatado que a secagem em apenas uma

etapa ou em temperaturas acima de 130 °C leva à perda de amostra por projeção. Desse modo, a secagem nesses estudos foi realizada nas temperaturas de 110 °C e 130 °C.

Em um estudo de determinação de metais em vinho (MAZON, 2013), também foi proposto um programa de secagem em duas temperaturas. Nesse caso, uma etapa inicial a 110 °C por 50 segundos foi necessária devido ao aumento de volume gerado pelo uso de dois modificadores e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após essa etapa, a secagem foi finalizada a 130 °C.

No presente trabalho essas duas temperaturas foram testadas com dois tempos de secagens diferentes. Primeiramente, foi testada a secagem com 30 segundos a 110 °C e 30 segundos a 130 °C. Posteriormente, foi testado o tempo de 15 segundos em cada uma dessas temperaturas.

Em ambos os casos, não foi observada perda de amostra por projeção durante a etapa de pirólise. Além disso, os resultados não mostraram vantagens em relação a aumento de sinal analítico para o tempo de 30 segundos em cada temperatura. Por esse motivo, visando economia do gás Argônio, optou-se por realizar a secagem a 110 e 130 °C, com 15 segundos em cada temperatura.

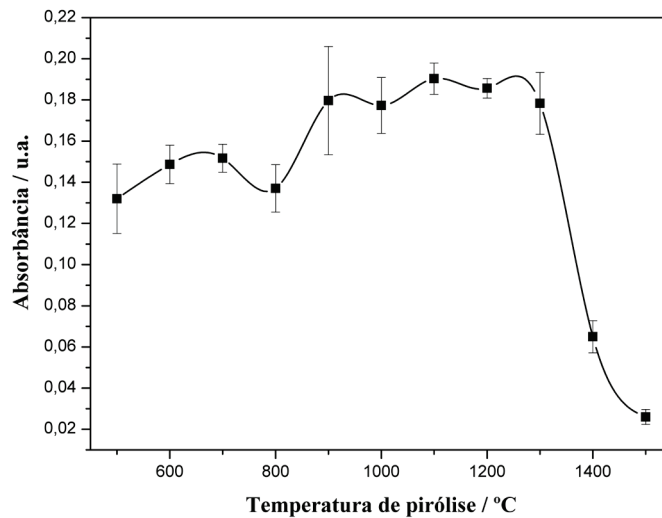
#### *4.1.3.4 Temperatura de Pirólise*

A pirólise é a etapa onde, idealmente, a matéria orgânica é eliminada, sem a perda de analito. Especialmente no caso desse projeto, por haver a pretensão de realizar análise direta da amostra, ou seja, sem digestão, a pirólise é uma etapa fundamental.

A temperatura de pirólise foi otimizada fixando-se a secagem em 110 e 130 °C e a atomização em 1800 °C (valor recomendado pelo fabricante do equipamento para atomização de Mn). Foram testadas temperaturas de pirólise de 500 a 1500 °C, com incrementos de 100 °C.

O Gráfico 6 mostra a curva de pirólise obtida.

Gráfico 6 – Curva de pirólise para determinação de Mn em saliva humana por GF AAS

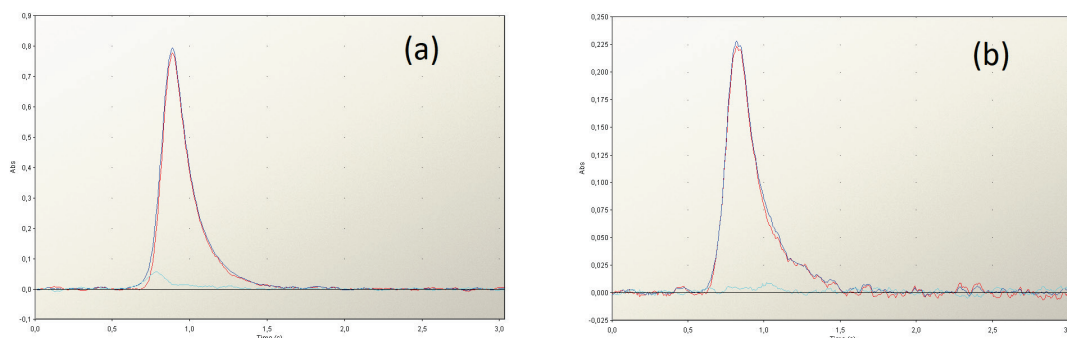


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A escolha da temperatura ótima de pirólise levou em consideração três parâmetros: maior sinal analítico associado a menor temperatura possível (para maior vida útil do tubo de grafite) e com perfil adequado do sinal de absorbância.

A temperatura de 1100 °C apresentou sinal médio maior que as temperaturas menores e maiores e baixo RSD (4%). Além disso, o sinal de absorbância para essa temperatura de pirólise mostra que a atomização ocorre de forma satisfatória. A Figura 1 mostra dois sinais de absorbância, um para temperatura de pirólise de 1100 °C e outro de 1400 °C.

Figura 1 – Sinais de absorbância de Mn para as temperaturas de pirólise de 1100 °C (a) e 1400 °C (b) para amostra de saliva humana



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na temperatura de 1400 °C, ruídos aparecem e o sinal de absorbância começa a se alargar, o que também foi observado para as temperaturas de 1200 e 1300 °C. A partir de 1200 °C observa-

se e diminuição do sinal, o que indica que, nessa temperatura, já está acontecendo atomização do analito ainda na etapa de pirólise, o que não deve acontecer. Portanto, conclui-se que a temperatura ótima de pirólise é a de 1100 °C. O livro *Atomic Absorption Spectrometry* (WELZ; SPERLING, 1999) indica a temperatura de 1400 °C para a pirólise do Mn, com a utilização do modificador químico  $Mg(NO_3)_2$ ; já o fabricante do equipamento indica a temperatura de 900 °C. A temperatura ótima encontrada no presente trabalho está entre esses dois valores, sendo que foi possível a realização da pirólise de forma adequada mesmo sem a utilização de modificador químico.

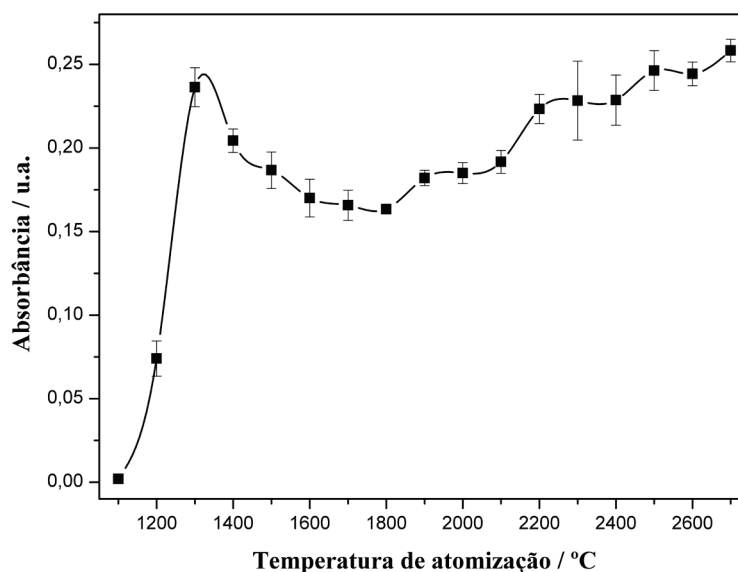
#### 4.1.3.5 Temperatura de Atomização

A atomização é a etapa onde o analito estudado é levado ao estado atômico neutro e gasoso, no qual irá absorver radiação eletromagnética. A condição ideal é que a atomização aconteça em uma única etapa (o que pode ser verificado pelo perfil do sinal de absorbância) e que o tempo de residência da nuvem atômica formada na zona de observação seja o maior possível.

A temperatura de atomização foi otimizada fixando-se a secagem em 110 e 130 °C e a pirólise em 1100 °C. Foram testadas temperaturas de atomização de 1500 a 2700 °C, com incrementos de 100 °C.

A curva de atomização obtida está apresentada no Gráfico 7.

Gráfico 7 – Curva de atomização para determinação de Mn em saliva humana por GF AAS



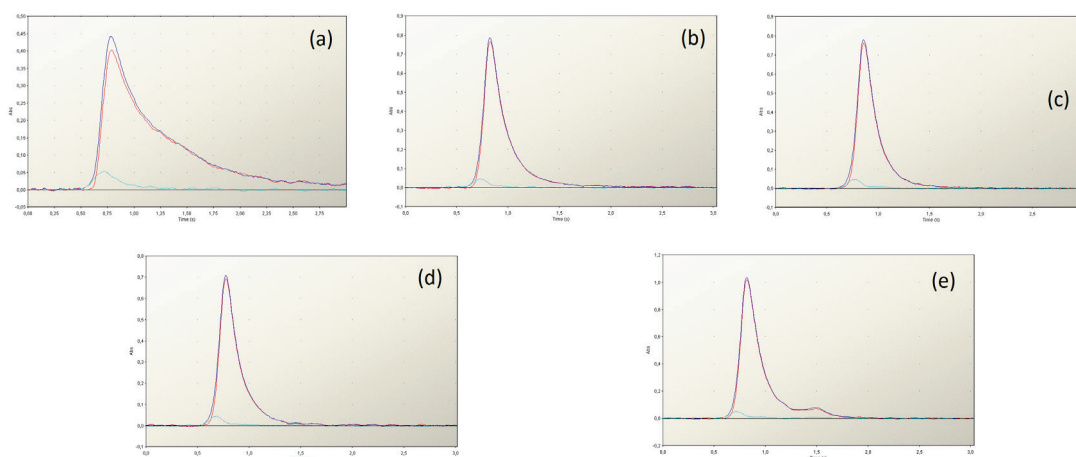
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Pode-se observar que o sinal analítico em 1300 °C é elevado, entretanto o sinal de absorvância (Figura 2a) possui a cauda longa, com elevado sinal, fazendo com que a área integrada seja maior. Isso mostra que, nessa temperatura, a formação de átomos de  $Mn_{(g)}$  acontece em um tempo maior que o ideal, o que não é adequado.

A partir de 1500 °C (Figura 2b), o sinal de absorvância começa a ficar mais fino, mostrando que a formação de átomos de Mn ocorre em tempo menor. Em 1700 °C, o sinal de absorvância (Figura 2c) apresentou o melhor perfil e, por isso, essa temperatura foi considerada ótima. A partir de 1800 °C (Figura 2d) a cauda do sinal de absorvância começa a aumentar até que, em 2000 °C, começa a formação de um sinal de absorvância secundário, que pode ser visto claramente na temperatura de 2500 °C (Figura 2e).

No livro *Atomic Absorption Spectrometry* (WELZ; SPERLING, 1999), a temperatura de atomização indicada para Mn, quando a análise é feita com uso de modificador químico  $Mg(NO_3)_2$ , é de 1900 °C, já o fabricante do equipamento indica a temperatura de 1800 °C. Assim, com os resultados presentes, foi possível realizar atomização de forma adequada a 1700 °C e sem utilização de modificador químico.

Figura 2 – Sinais de absorvância de Mn para as temperaturas de pirólise de 1300 (a), 1500 (b), 1700 (c), 1800 (d) e 2500 °C (e)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Portanto, as condições ideais para análise direta de saliva para determinação de Mn são: secagem a 110 e 130 °C, pirólise a 1100 °C e atomização a 1700 °C. Deste modo, foi possível estabelecer as condições ótimas para a determinação de Mn em saliva através da GF AAS. Em possíveis estudos futuros, a avaliação da precisão e da exatidão das medidas precisa ser realizada para se garantir um bom desempenho do método de análise com essas condições

experimentais propostas. Assim, a aplicação do método em amostras de saliva pode levar a resultados interessantes sobre os níveis desse microconstituente no organismo em relação às suas condições fisiológicas.

## 4.2 PREPARO DE AMOSTRA

Em estudos de determinação de metais, as técnicas de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e na chapa de aquecimento são bastante utilizadas. Essas duas técnicas foram avaliadas para a saliva e os resultados obtidos através delas estão apresentados a seguir.

### **4.2.1 Comparação entre as digestões ácidas assistida por radiação micro-ondas e em chapa de aquecimento**

Com uma amostra mistura, as performances dos dois métodos de digestão ácida disponíveis no laboratório (digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e digestão ácida em chapa de aquecimento) foram avaliadas.

A amostra mistura foi digerida através desses dois métodos, sem separação prévia das partículas sólidas presentes. Em ambos os casos obtiveram-se soluções translúcidas e incolores, sem qualquer partícula sólida visível. Além disso, durante o processo de digestão na chapa de aquecimento, não foi possível observar desprendimento de vapores nitrosos, o que evidenciou percentual baixo de matéria orgânica presente. Isso demonstra que métodos descritos na literatura que utilizam digestões ácidas geram desperdício de energia e reagentes, já que vão além do que é necessário para uma amostra com as características da saliva.

Por praticidade instrumental, a comparação entre os dois métodos de digestão foi realizada apenas para Na e K, que puderam ser determinados através da fotometria de chama. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos.



Tabela 4 – Concentrações determinadas em triplicata para Na e K na amostra mistura inicial, através dos dois métodos de digestão ácida: assistida por micro-ondas e na chapa de aquecimento

Replicata	Micro-ondas		Chapa de aquecimento	
	Na (mg L <sup>-1</sup> )	K (mg L <sup>-1</sup> )	Na (mg L <sup>-1</sup> )	K (mg L <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	158	758	167	833
<b>2</b>	175	792	150	767
<b>3</b>	167	800	158	767
<b>Média</b>	167	783	158	789
<b>RSD (%)</b>	5,1	2,8	5,4	4,8

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O RSD mostra a proximidade dos valores obtidos em cada uma das réplicas em torno da média. O RSD foi calculado para cada conjunto de medidas e, no geral, o maior valor encontrado foi de 5,4%, o que mostra boa precisão nos resultados obtidos.

A comparação estatística (teste F e teste t não-pareado com variância agrupada, depois de verificado o pressuposto de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk) entre os resultados dos dois métodos de digestão está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores calculados e tabelados de F e t para comparação entre os métodos de digestão assistida por radiação micro-ondas e na chapa de aquecimento

	F		t	
	Na	K	Na	K
<b>Valores calculados</b>	1,0	3,0	1,2	0,2
<b>Valores tabelados</b>	19,0		4,3	

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os valores calculados de F foram menores que o valor tabelado para os graus de liberdade em questão. Deste modo, pode-se concluir que não há diferença significativa nas precisões quando são comparadas as análises das amostras digeridas com assistência de radiação micro-ondas e em chapa de aquecimento.

Os valores calculados de t (1,2 para Na e 0,2 para K) foram menores que o valor tabelado (4,3 para os graus de liberdade envolvidos), o que indica que não há diferença significativa

entre as médias dos resultados dos dois métodos. Então, pôde-se verificar que os métodos de digestão assistida por radiação micro-ondas e em chapa de aquecimento são estatisticamente equivalentes. Escolheu-se, então, a chapa de aquecimento como método de referência para as etapas seguintes, devido à maior conveniência em relação à logística do laboratório.

#### **4.2.2 Otimização do método proposto e comparação com o método de referência**

Como mencionado anteriormente, as amostras de saliva apresentam partículas sólidas em seu meio, provenientes de restos alimentares e resíduos celulares e de mucosas, principalmente (NTIHABOSE; SURETTE; FOUCHER; CLARISSE *et al.*, 2018). Por isso, o procedimento usual adotado na literatura para a análise de saliva é fazer uma etapa de pré-tratamento, onde as amostras são centrifugadas para a separação da parte sólida (NTIHABOSE; SURETTE; FOUCHER; CLARISSE *et al.*, 2018; OLMEDO; PLA; HERNÁNDEZ; LÓPEZ-GUARNIDO *et al.*, 2010; SUZUKI; FURUHASHI; SESOKO; KOSUGE *et al.*, 2016). O objetivo da eliminação destas partículas é evitar a sua interferência nos resultados, levando a resultados que não reflitam a composição mineral da saliva de fato.

Levando isso em consideração, o método proposto no presente estudo foi a centrifugação das amostras, como uma etapa de pré-tratamento, seguida por diluição em água deionizada. Por contar apenas com uma etapa de pré-tratamento e uma diluição em água deionizada, o método proposto pode ser considerado uma análise direta.

Nesta etapa do estudo, para investigar a interferência das partículas sólidas no sinal analítico, uma comparação foi realizada através da análise direta de uma nova amostra mistura (preparada com amostras aleatórias) com centrifugação e sem centrifugação. Os resultados para Mg, Ca, Na e K estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração determinadas para Mg, Ca, Na e K em uma amostra mistura de saliva, obtidas com e sem centrifugação antes da análise

Analito	Concentração determinada <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		t <sub>calculado</sub> <sup>b</sup>
	Com centrifugação	Sem centrifugação	
Mg	3,80 ± 0,55	3,42 ± 0,89	1,56
Ca	18,3 ± 7,8	44,8 ± 2,2	23,55
Na	145 ± 4	146 ± 11	0,35
K	552 ± 23	602 ± 50	3,81

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

<sup>a</sup> Concentração determinada = (média ± intervalo de confiança a 95%). <sup>b</sup> t<sub>tabelado</sub> = 4,303

Através do Teste t agrupado, pôde-se perceber que o processo de centrifugação não mudou as concentrações de Mg, Na e K na amostra, porque os valores obtidos são estatisticamente equivalentes no nível de confiança de 95%, já que os valores de t calculados são menores que o valor tabelado. Entretanto, para Ca esses dois procedimentos não forneceram resultados estatisticamente comparáveis, já que o valor de t calculado foi maior que o tabelado. Percebeu-se que a concentração diminuiu mais de 50% depois da centrifugação, o que indicou que as partículas sólidas presentes nessa amostra mistura tem uma composição expressiva de Ca. Isso está realmente dentro do esperado, já que o Ca é um mineral essencial para o corpo humano e, em especial, para a boca, já que é muito importante como um elemento estrutural para os dentes (YU; ZHANG; LU; WANG *et al.*, 2017). Assim, é esperado teores consideráveis de Ca na saliva e nas partículas presentes na boca.

Entretanto, em termos biológicos, o processo de centrifugação é necessário, já que a parte sólida não reflete a composição mineral da saliva produzida pelo corpo. Portanto, essas partículas sólidas originárias de restos alimentares, de mucosas e de células precisam ser removidas.

Um dos objetivos deste projeto é o desenvolvimento de um método de análise direta de saliva para determinação de metais. A análise direta oferece muitas vantagens quando se compara com métodos que envolvam preparo de amostra, tais como: maior simplicidade e rapidez, diminuindo as etapas do método analítico e aumentando a frequência analítica; diminuição do gasto de reagentes e energia e, conseqüentemente, da periculosidade dos procedimentos experimentais; diminuição do risco de contaminação da amostra e perda de analitos; menor geração de resíduos e maior detectabilidade dos analitos, já que pouca ou nenhuma diluição se faz necessária (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016).

Além disso, nos últimos anos, muitos artigos, livros e conferências têm sido produzidos, tendo como assunto central a diminuição dos impactos humanos negativos no planeta e na sua capacidade de sustentar vida. Frequentemente, dessas discussões nascem alvos específicos a serem alcançados pela comunidade, tais como minimização de desperdícios, aumento de reciclagem ou abordagens acerca de sustentabilidade. Nesse contexto, aparecem os conceitos de Química Verde e de Química Analítica Verde, que trazem incentivo ao desenvolvimento de métodos que demandem menos recursos, reagentes, energia e tempo (ANASTAS; ZIMMERMAN, 2003; BERTON; LANA; RÍOS; GARCÍA-REYES *et al.*, 2016; DE LA GUARDIA; RUZICKA, 1995; GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; LENARDÃO; FREITAG; DABDOUB; BATISTA *et al.*, 2003). Deste modo, um método de análise direta está dentro desses princípios de Química Analítica Verde e, portanto, é ambientalmente amigável.

O método desenvolvido nesse projeto consiste na análise direta de saliva humana para determinação de Mg, Ca, Na e K. Ele consiste em uma etapa de centrifugação das amostras como pré-tratamento, seguida pela diluição do sobrenadante em água deionizada.

As amostras, quando chegavam ao laboratório, eram levadas à refrigeração a -18 °C. No momento do uso, elas eram descongeladas à temperatura ambiente. Em seguida, elas eram levadas para a centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos, como descrito no subitem 3.5.3. Após a centrifugação, o sobrenadante era separado e adequadamente diluído. Essas soluções eram, então, levadas aos equipamentos para análise.

Para avaliação e validação dos resultados obtidos por análise direta, realizou-se a comparação dos resultados com aqueles obtidos através da digestão do sobrenadante. Os resultados obtidos através desses dois métodos, todos em triplicata, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentrações determinadas para Mg, Ca, Na e K no sobrenadante de uma amostra mistura de saliva, obtidas através de digestão ácida e através de análise direta (apenas diluição em água), com todos os procedimentos realizados em triplicata

Analito	Concentração determinada <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		t <sub>calculado</sub> <sup>b</sup>
	Digestão	Análise direta	
<b>Mg</b>	3,35 ± 0,56	3,80 ± 0,55	2,47
<b>Ca</b>	23,8 ± 11,6	18,3 ± 7,8	1,68
<b>Na</b>	153 ± 15	145 ± 4	0,35
<b>K</b>	601 ± 57	552 ± 23	3,36

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

<sup>a</sup> Concentração determinada = (média ± intervalo de confiança a 95%). <sup>b</sup> t<sub>tabelado</sub> = 4,303

O Teste t mostrou que não há diferenças significativas entre os dois métodos, no nível de 95% de confiança, já que os valores de t calculados são menores que o tabelado. Portanto, a análise direta, que compreendeu a centrifugação das amostras e diluição do sobrenadante em água, se mostrou adequada para a quantificação de Mg, Ca, Na e K em saliva, já que forneceu resultados equivalentes ao método usado como referência.

Levando-se em consideração todas as etapas do processo, desde o descongelamento das amostras, passando pela centrifugação e pela diluição em água até chegar à análise em si, calcula-se que seja possível obter resultados para um grupo de 20 amostras por hora. Considerando um grupo maior de amostras passando por cada etapa do processo, pode-se atingir frequências analíticas ainda maiores. Deste modo é possível, inclusive, a utilização do método em análises de rotina.

#### 4.3 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO PROPOSTO

O método proposto neste projeto, isto é, centrifugação e posterior diluição em água, foi avaliado analiticamente. Por não ter o procedimento de digestão e o pré-tratamento ser simples, constituído apenas por centrifugação e diluição, este método foi considerado análise direta. Por esse motivo, o método de calibração escolhido foi a calibração externa. As curvas externas foram construídas em triplicata, através da diluição dos padrões analíticos dos analitos em meio de HNO<sub>3</sub> 1% (v/v). O primeiro ponto das curvas foi de uma solução em branco, ou seja, apenas HNO<sub>3</sub> 1% (v/v). A Tabela 8 apresenta parâmetros analíticos e estatísticos das curvas obtidas.

Tabela 8 – Parâmetros analíticos das curvas de calibração externa construídas para Mg, Ca, Na e K

		Mg	Ca	Na	K
<b>Faixa linear</b> (mg L <sup>-1</sup> )		0-0,5	0-4,00	0-20	0-60
<b>Equação de</b> <b>reta</b>		A = 0,3775[Mg] + 0,0086	A = 0,1503[Ca] + 0,0031	A = 0,9334[Na] – 0,0858	A = 1,1038[K] – 0,4163
<b>R<sup>2</sup></b>		0,9912	0,9945	0,9981	0,9985
<b>Shapiro-Wilk</b>	W <sub>calc</sub> /W <sub>tab</sub>	0,889/0,881	0,914/0,881	0,980/0,923	0,963/0,923
<b>Cochran</b>	C <sub>calc</sub> /C <sub>tab</sub>	0,638/0,684	0,431/0,684	0,233/0,478	0,271/0,478
	Falta de ajuste F <sub>calc</sub> /F <sub>tab</sub>	0,37/3,71	0,47/3,71	1,07/2,58	1,40/2,58
<b>ANOVA</b>	Linearidade F <sub>calc</sub> /F <sub>tab</sub>	1463/4,67	4181/4,67	12957/4,24	16592/4,24

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Todas as hipóteses estatísticas foram testadas no nível de confiança de 95%. O teste de Shapiro-Wilk avalia se os dados obtidos seguem uma distribuição normal, ou seja, gaussiana. No caso de curvas de calibração, que são construídas com soluções de concentrações crescentes dentro da faixa de trabalho e, conseqüentemente, os sinais analíticos também são crescentes, o teste de Shapiro-Wilk é realizado com os resíduos da curva. Esses resíduos são a diferença, ponto a ponto, entre os valores de concentração previstos pelo modelo matemático e as concentrações reais preparadas em laboratório. Para todos os analitos, os valores calculados de W foram maiores que os valores tabelados, mostrando que os resíduos seguem uma distribuição normal.

O teste de Cochran avalia a homocedasticidade dos dados, ou seja, se a variância é constante em todos os pontos testados. Para todos os analitos, os valores de C calculado foram menores que os valores tabelados, o que evidencia que os dados são homocedásticos.

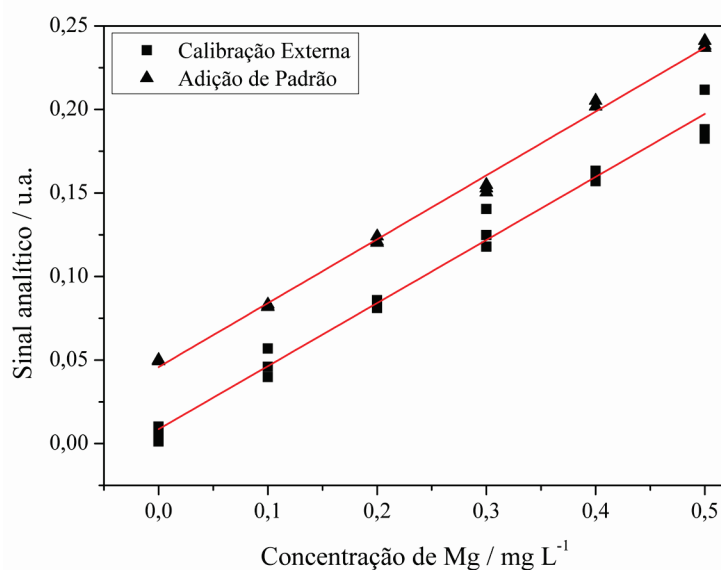
Através da ANOVA (análise de variância) foram testadas a linearidade do modelo e a falta de ajuste. Pelo teste da linearidade, pode-se garantir que há uma relação linear entre concentração e sinal analítico em cada um dos pontos da curva de calibração. O teste da falta de ajuste mostra se essa relação linear se mantém também nas regiões entre os pontos da curva, ou seja, regiões onde não foram preparadas soluções. A ANOVA mostrou que a linearidade da regressão é garantida, já que os valores calculados de F foram mais de 10 vezes superiores ao valor tabelado, para todos os analitos. Além disso, a ANOVA também mostrou que não há falta

de ajuste entre os pontos experimentais, já que os valores calculados de F ficaram menores que os valores tabelados, também para todos os analitos. As faixas lineares de trabalho foram, 0-0,5, 0-4,00, 0-20 e 0-60 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para Mg, Ca, Na e K.

A existência de efeitos de matriz foi avaliada através do método de adição de padrão. Nesse método, uma curva de calibração é construída em presença de amostra, sendo uma quantidade constante de amostra adicionada em cada solução. Para esse ensaio, novamente uma amostra mistura foi utilizada e cada ponto da curva foi preparado em triplicata.

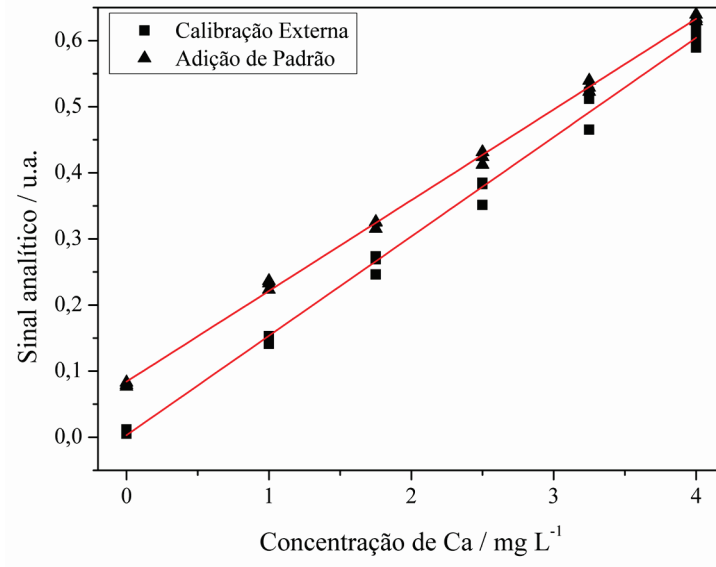
A avaliação de efeitos de matriz foi feita através da comparação dos coeficientes angulares das curvas de adição de padrão com os coeficientes angulares das curvas externas, que são preparadas somente com os padrões, sem a presença de amostra. Os Gráficos de 8 a 11 mostram as curvas de adição de padrão juntamente com as curvas externas, para cada um dos analitos. Para cada um dos analitos as duas curvas foram analisadas no mesmo dia, primeiro a externa, seguida pela de adição de padrão.

Gráfico 8 – Comparação das curvas externas e de adição de padrão para Mg, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata



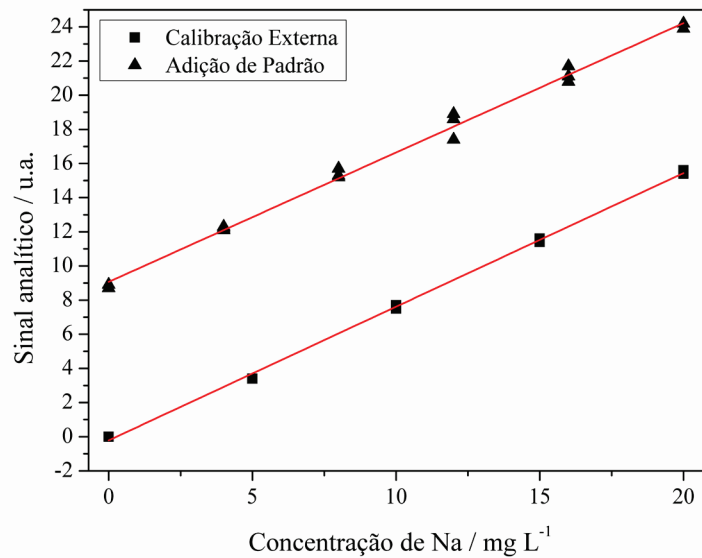
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Gráfico 9 – Comparação das curvas externas e de adição de padrão para Ca, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

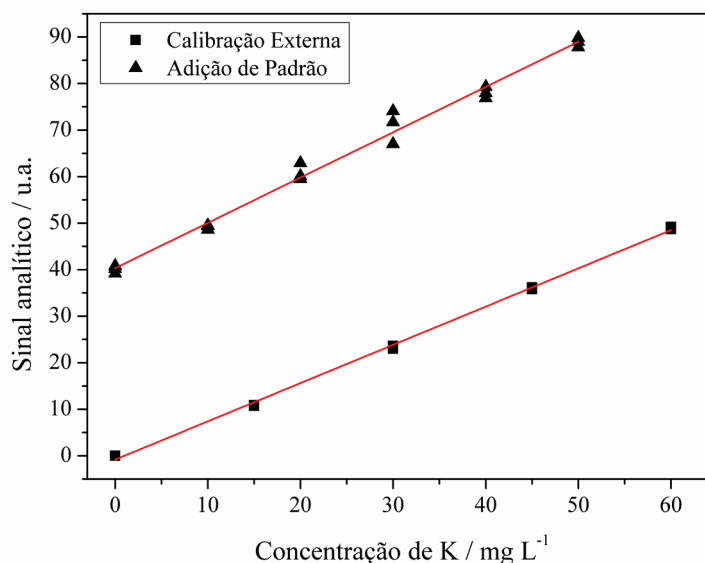
Gráfico 10 – Comparação das curvas externas e de adição de padrão para Na, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



Gráfico 11 – Comparação das curvas externas e de adição de padrão para K, com todos os pontos experimentais realizados em triplicata



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

As curvas externa e de adição de padrão para todos os elementos foram aproximadamente paralelas. A inclinação de uma curva de calibração é uma forma de se avaliar a sensibilidade do método (BRITO; DE AMARANTE JUNIOR; POLESE; RIBEIRO, 2003). Para um analito específico, quando o coeficiente angular de uma curva de adição de padrão é próximo do coeficiente angular de uma curva externa, considera-se que não há efeitos de matriz interferindo na quantificação desse analito. Isso porque curvas de adição de padrão são construídas em um meio cuja a amostra está presente e, portanto, o analito está em contato com a amostra, susceptível a possíveis interferências. Assim, se a sensibilidade do método para sua determinação por adição de padrão for equivalente à sensibilidade em um meio sem a amostra, há indicação de ausência de efeitos de matriz (DE PAULA; CRUZ; REZENDE; CASSELLA, 2016; OLMEDO; PLA; HERNÁNDEZ; LÓPEZ-GUARNIDO *et al.*, 2010). Portanto, devido à proximidade das curvas entre si, concluiu-se que não há evidências de efeitos de matriz para a determinação de Mg, Ca, Na e K por calibração externa.

A precisão e a exatidão do método proposto foram avaliadas. O RSD foi calculado a partir de 10 leituras de uma mesma amostra. Os valores para todos os analitos ficaram abaixo de 8%, o que indica boa precisão nas medidas (BRITO; DE AMARANTE JUNIOR; POLESE; RIBEIRO, 2003).

A exatidão foi avaliada através de ensaios de adição e recuperação, já que não há material de referência certificado para determinação de metais em saliva. Sendo um dos

métodos mais utilizados para validação de processos analíticos, ensaios de adição e recuperação estão relacionados com a exatidão porque refletem a quantidade do analito recuperado em relação à quantidade presente na amostra (BRITO; DE AMARANTE JUNIOR; POLESE; RIBEIRO, 2003; MAROTO; RIU; BOQUÉ; XAVIER RIUS, 1999).

Para esses ensaios foram adicionadas quantidades definidas de soluções dos analitos às amostras, que então foram centrifugadas e diluídas (mantendo a diluição utilizada nas etapas de preparo de amostra). Os ensaios foram realizados em dois níveis de concentração, escolhidos com base nas curvas de calibração; cada nível foi feito em triplicata. Para Mg, as concentrações adicionadas corresponderam ao primeiro e ao último ponto da curva de calibração, enquanto que para Ca, Na e K corresponderam ao primeiro e penúltimo pontos das curvas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações determinadas de Mg, Ca, Na e K em uma amostra mistura e valores de recuperação cada analito, obtidos em ensaios de adição e recuperação

<b>Analito</b>	<b>Concentração determinada<sup>a</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração adicionada (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Mg</b>	2,57 ± 0,06	0,10	103 ± 10
		0,40	91 ± 3
<b>Ca</b>	10,8 ± 1,1	1,0	96 ± 6
		3,5	96 ± 5
<b>Na</b>	191 ± 6	5	101 ± 13
		15	100 ± 12
<b>K</b>	829 ± 41	15	95 ± 13
		45	93 ± 4

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

<sup>a</sup> Concentração determinada = (média ± intervalo de confiança a 95%).

Os valores extremos de recuperação encontrados foram 91 e 103%, que correspondem aos níveis baixo e alto de Mg; os valores para todos os demais analitos ficaram entre esses dois. Esses resultados mostram que o método possui exatidão adequada, já que a faixa aceita para o nível de concentração envolvido é de 90 a 107% (BRITO; DE AMARANTE JUNIOR; POLESE; RIBEIRO, 2003). Além disso, esses valores de recuperação corroboram com o fato de não haver evidências de efeitos de matriz na determinação dos analitos nas condições

instrumentais otimizadas, assim como indicado pela comparação das curvas de adição de padrão com as curvas externas.

A determinação de Na e K foi realizada por fotometria de chama, que é uma técnica simples e de menor custo instrumental, quando comparada à F AAS. A faixa de trabalho que o fotômetro de chama utilizado permite é de 1 a 100 mg L<sup>-1</sup>, fornecendo resultados confiáveis nessa faixa. Entretanto, este equipamento pode apresentar variações instrumentais durante as análises, o que pode levar a resultados inadequados. Por isso, é comum a utilização de padrão interno para correção, no sinal, de possíveis variações instrumentais que podem ocorrer.

Um padrão interno é um elemento com características químicas semelhantes às dos analitos, que é adicionado às amostras e às curvas analíticas em uma concentração específica, sendo posteriormente determinado simultaneamente com os analitos. Variações instrumentais também podem acontecer nas determinações por F AAS. Mas, como o equipamento utilizado não permite determinações simultâneas de elementos, não é possível o uso de padrão interno.

No presente projeto, a necessidade do uso de padronização interna para a determinação de Na e K foi avaliada com a utilização de Li como padrão interno. Uma solução padrão de Li foi utilizada na preparação das curvas de calibração externa e também adicionada na amostra mistura, de forma a se obter concentração final de Li de 10 mg L<sup>-1</sup> nas soluções de leitura. Os resultados obtidos com uso do padrão interno foram comparados com os resultados obtidos sem o seu uso. A Tabela 10 mostra esses dados.

Tabela 10 – Concentrações determinadas para Na e K em uma amostra mistura de saliva humana, obtidas por calibração externa com e sem padrão interno

Analito	Concentração determinada <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )		t <sub>calculado</sub> <sup>b</sup>
	Sem padrão interno	Com padrão interno	
Na	489 ± 38	485 ± 86	1,561
K	1488 ± 57	1481 ± 125	0,998

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

<sup>a</sup> Concentração determinada = (média ± intervalo de confiança a 95%). <sup>b</sup> t<sub>tabelado</sub> = 2,776

O Test t não-pareado com variância agrupada foi aplicado para comparação e, como os valores de t calculados foram menores que o valor tabelado, pôde-se verificar que a determinação sem uso de padrão interno forneceu resultados estatisticamente equivalentes aos da determinação com o uso de padrão interno. Portanto, o uso de padrão interno para a determinação de Na e K em saliva não foi necessário.

Os parâmetros de validação estão listados na Tabela 11. São mostrados os valores de LOD e LOQ instrumentais e do método e os valores de  $C_0$  para Mg e Ca (Na e K foram determinados por fotometria de chama e, portanto, o conceito de concentração característica não se aplica).

Tabela 11 – Valores obtidos para limite de detecção, limite de quantificação e concentração característica para os analitos através método proposto

Analito	LOD e LOQ instrumentais	LOD e LOQ do método	$C_0$
	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )
<b>Mg</b>	0,03 e 0,09	0,5 e 1,5	0,01
<b>Ca</b>	0,14 e 0,46	2,3 e 7,7	0,03
<b>Na</b>	0,33 e 1,11	5,5 e 18,5	–
<b>K</b>	1,10 e 3,66	18,4 e 61,1	–

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os limites de detecção e quantificação instrumentais para todos os analitos foram mais baixos que os primeiros pontos de suas respectivas curvas de calibração. De forma semelhante, os limites de detecção e quantificação de todos os analitos foram adequados para suas respectivas determinações nas amostras.

A sensibilidade, mensurada através da concentração característica, também se mostrou adequada. Para Mg,  $C_0$  obtida foi igual à informada pelo fabricante do equipamento (0,01 mg L<sup>-1</sup>). Para Ca, a  $C_0$  ficou acima da informada pelo fabricante (0,003 mg L<sup>-1</sup>), mas sua determinação não foi impedida, já que sua concentração na maior parte das amostras era em níveis de dezenas de mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Para a aplicação do método desenvolvido nesse projeto, foram realizados dois estudos de caso em amostras de saliva humana. Um dos estudos foi realizado com as amostras recebidas do Lemos Laboratório® e o outro com as amostras coletadas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Esses dois estudos foram escolhidos para testar a aplicabilidade do método em procedimentos de rotinas, já que um número alto de amostras foi analisado, e para investigar se a composição de Mg, Ca, Na e K na saliva é influenciada por fatores fisiológicos do organismo.

#### 4.4.1 Amostras recebidas do Lemos Laboratório®.

Foram recebidas 109 amostras do Lemos Laboratório®, acompanhadas por fichas contendo informações fisiológicas dos pacientes. Nessas fichas, de preenchimento próprio de cada doador, há dados acerca de doenças, sintomas diversos e outras características como peso e idade. Esse número de 109 amostras, embora menor que de alguns estudos de larga abrangência, está dentro do que se costuma ser reportado na literatura, como mencionado no item de Introdução dessa tese.

Os resultados da determinação de Mg, Ca, Na e K nas amostras recebidas do Lemos Laboratório® estão apresentadas na Tabela 12. As concentrações variaram de 0,53 a 7,72 para Mg, de 7,44 a 66,11 para Ca, de 22 a 315 para Na e de 132 a 833 mg L<sup>-1</sup> para K. Esses valores são similares aos valores de outros dois estudos reportados na literatura (KALK; VISSINK; STEGENGA; BOOTSMA *et al.*, 2002; KIM; KIM; KHO, 2010).

Tabela 12 – Concentrações determinadas de Na, K, Mg e Ca nas 109 amostras

(continua)

Amostra	Na (mg L <sup>-1</sup> )	K (mg L <sup>-1</sup> )	Mg (mg L <sup>-1</sup> )	Ca (mg L <sup>-1</sup> )
P1	81	257	2,55	28,7
P2	184	372	3,14	46,7
P3	210	647	<LOD	<LOD
P4	130	314	3,32	36,8
P5	129	358	1,43	16,7
P6	315	409	1,50	22,7
P7	187	592	1,40	<LOD
P8	131	404	2,59	25,5
P9	73	461	<LOD	<LOD
P10	153	494	1,47	30,6
P11	217	530	5,68	41,1
P12	180	603	3,30	44,5
P13	23	245	1,81	19,6
P14	82	473	5,89	66,1
P15	184	491	1,74	20,0
P16	47	342	3,03	31,4
P17	274	664	6,65	38,9
P18	75	245	1,45	15,6
P19	82	334	2,55	35,9
P20	85	352	<LOD	<LOD
P21	128	455	<LOD	<LOD
P22	102	434	<LOD	<LOD
P23	38	269	1,22	17,1
P24	58	326	4,35	21,4
P25	82	320	1,64	18,9
P26	135	411	1,91	20,1
P27	118	360	0,74	17,5
P29	58	286	<LOD	<LOD
P30	99	154	1,49	20,0
P31	83	492	3,05	27,6
P32	201	423	<LOD	<LOD

Tabela 12 – Concentrações determinadas de Na, K, Mg e Ca nas 109 amostras

(continuação)

Amostra	Na (mg L <sup>-1</sup> )	K (mg L <sup>-1</sup> )	Mg (mg L <sup>-1</sup> )	Ca (mg L <sup>-1</sup> )
P33	91	284	1,25	12,0
P34	63	320	1,06	19,5
P35	164	275	2,81	33,4
P36	152	416	<LOD	<LOD
P37	102	310	<LOD	<LOD
P38	86	470	0,65	18,0
P39	215	572	5,17	33,1
P40	49	630	4,03	18,5
P41	93	453	0,69	15,6
P42	89	461	<LOD	<LOD
P43	65	163	1,99	35,6
P44	61	450	0,94	13,9
P45	101	312	2,32	16,2
P46	44	170	1,77	16,3
P47	245	466	1,73	28,1
P48	63	234	7,66	<LOD
P49	94	132	1,99	18,3
P50	63	425	1,20	16,0
P51	189	684	0,92	24,0
P52	32	277	1,06	9,4
P53	105	521	2,15	21,7
P54	37	201	0,67	9,0
P55	46	274	1,93	9,9
P56	67	243	5,15	22,7
P57	96	618	1,87	18,9
P58	212	435	4,37	43,0
P59	55	268	2,18	19,2
P60	112	252	2,08	17,5
P61	195	389	1,98	19,4
P62	65	381	0,61	10,5
P63	67	325	3,13	25,6
P64	93	447	2,13	55,3
P65	39	364	2,29	23,2
P66	179	476	2,02	17,2
P67	98	299	2,52	23,4
P68	41	235	2,05	26,4
P69	186	468	5,47	48,8
P70	77	259	1,64	19,8
P71	67	303	<LOD	<LOD
P72	37	163	1,30	11,5
P73	138	335	1,76	15,1
P74	60	137	<LOD	10,5
P75	91	255	<LOD	<LOD
P76	122	381	1,64	13,3
P77	105	354	2,17	24,6
P78	48	292	3,35	21,4
P79	106	438	1,64	16,7
P80	56	273	1,74	15,5
P81	70	693	0,65	11,4
P82	41	287	3,36	27,7
P83	39	288	1,12	15,2
P84	93	342	2,57	22,7
P85	138	206	0,66	12,1
P86	212	457	3,43	54,6
P87	217	833	7,72	38,6
P88	91	225	3,42	19,0
P89	79	254	0,89	9,5

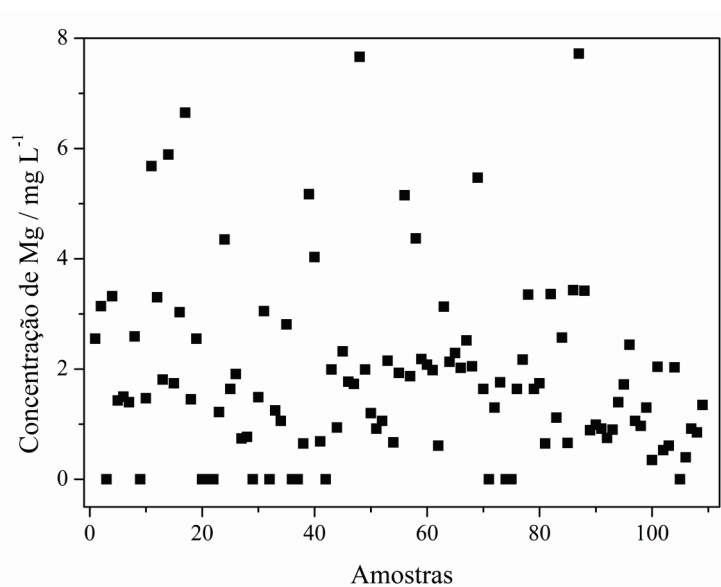
Tabela 12 – Concentrações determinadas de Na, K, Mg e Ca nas 109 amostras

(conclusão)				
Amostra	Na (mg L <sup>-1</sup> )	K (mg L <sup>-1</sup> )	Mg (mg L <sup>-1</sup> )	Ca (mg L <sup>-1</sup> )
P90	56	308	0,99	10,6
P91	37	140	0,92	12,2
P92	42	187	0,75	11,9
P93	56	232	0,90	14,4
P94	29	298	1,40	11,9
P95	41	290	1,72	15,4
P96	74	326	2,44	21,5
P97	56	266	1,06	31,5
P98	65	494	0,97	13,9
P99	93	364	1,30	16,4
P100	48	256	<LOD	10,6
P101	150	393	2,04	45,9
P102	42	186	0,53	11,2
P103	48	153	0,61	10,8
P104	77	247	2,03	30,3
P105	124	312	<LOD	<LOD
P106	55	259	<LOD	16,5
P107	22	160	0,92	9,5
P108	29	191	0,85	7,4
P109	125	618	1,35	16,5

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

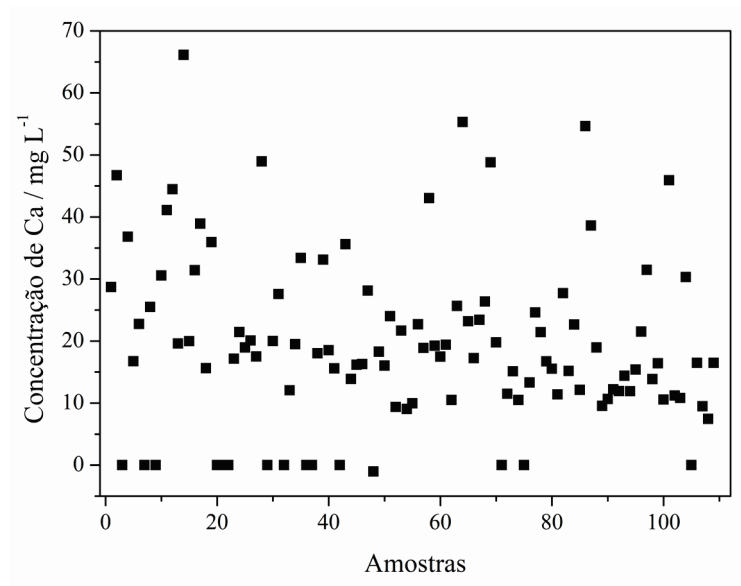
Foi observada grande variação nas concentrações de Mg, Ca, Na e K entre as amostras analisadas. Para uma percepção visual dessa variação, gráficos de dispersão foram plotados e estão apresentados nos Gráficos de 12 a 15.

Gráfico 12 – Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de Mg determinados para as 109 amostras



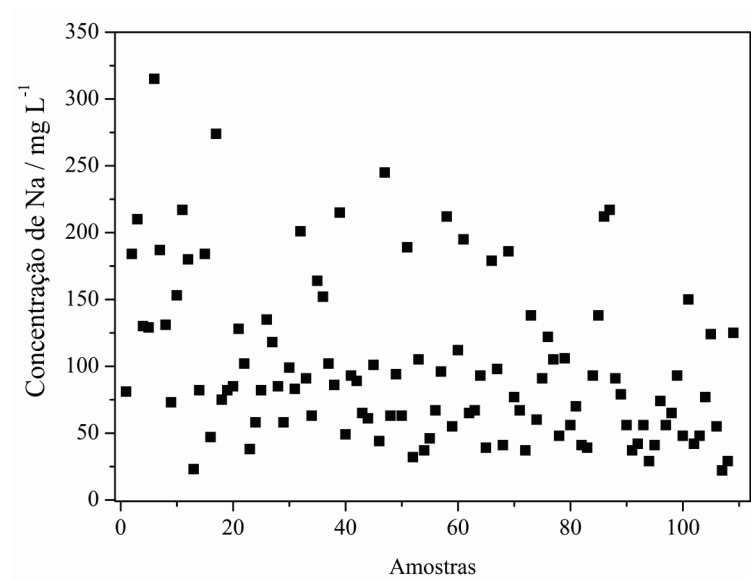
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Gráfico 13 – Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de Ca determinados para as 109 amostras



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

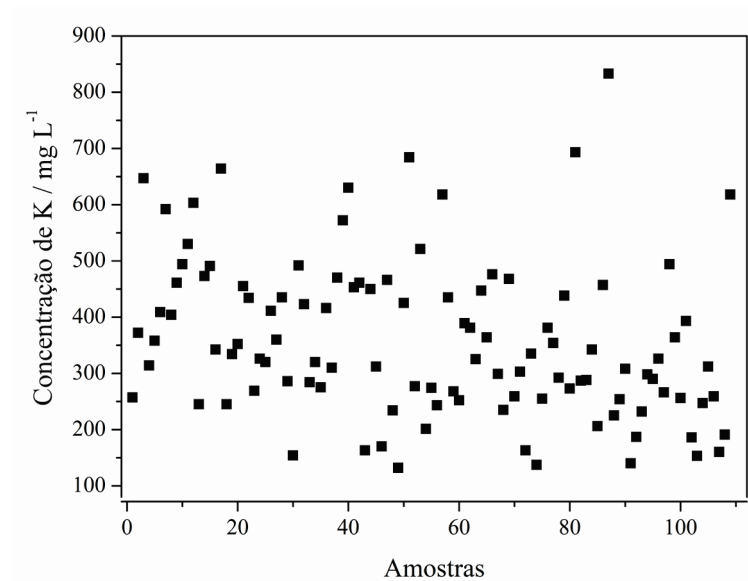
Gráfico 14 – Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de Na determinados para as 109 amostras



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



Gráfico 15 – Gráfico de dispersão com todos os valores de concentração de K determinados para as 109 amostras

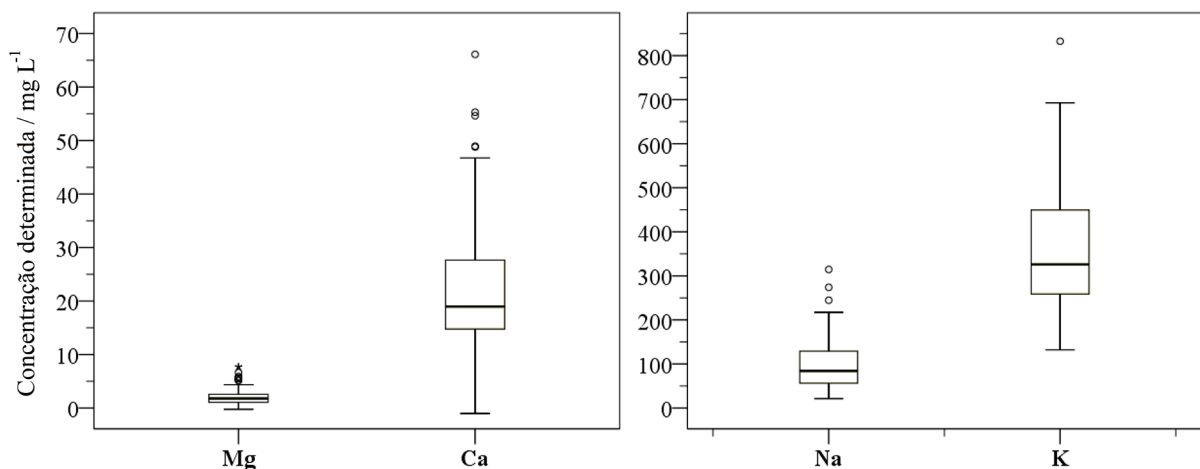


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os gráficos de dispersão mostram que os valores estão distribuídos em suas respectivas faixas sem qualquer tipo de padrão ou tendência aparentes. Além disso, pôde-se perceber que a maior parte das amostras se acumulam dentro de uma certa faixa de valores, com poucas em regiões extremas inferiores ou superiores.

Para melhor visualização dos dados, eles serão também apresentados em forma de gráficos *boxplot*. Todos os resultados para Mg, Ca, Na e K estão apresentados no Gráfico 16.

Gráfico 16 – Gráficos *boxplot* apresentando os valores de concentração de Mg, Ca, Na e K para as 109 amostras



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Gráficos *boxplot*, também chamados de diagramas de caixa, são ferramenta gráficas que mostram a distribuição dos dados, assim como os valores discrepantes do conjunto, também chamados de *outliers*. Eles fornecem uma perspectiva sobre o caráter dos dados, além de permitirem comparações entre grupos de dados selecionados (OLIVEIRA, 2019).

Um gráfico *boxplot* é formado pelas seguintes medidas de estatísticas descritivas: mínimo, máximo, primeiro quartil, segundo quartil ou mediana e terceiro quartil. Os valores mínimo e máximo são os próprios mínimo e máximo do conjunto de dados, a não ser que haja *outliers*. Os *outliers* são os valores que estão abaixo ou acima dos limites de detecção de *outliers*, que são calculados através de uma equação que leva em consideração a distância entre o primeiro e o terceiro quartis.

Primeiro, segundo e terceiro quartis representam, respectivamente, os percentis 25, 50 e 75. O percentil 25, por exemplo, é o valor tal que 25% dos dados do conjunto são menores ou iguais a ele. De forma análoga, os percentis 50 e 75 são os valores tais que, respectivamente, 50 e 75% dos dados são menores ou iguais a eles. Por isso o segundo quartil corresponde exatamente à mediana do conjunto de dados.

Além disso, gráficos *boxplot* permitem uma análise visual da simetria do conjunto de dados. Há uma distribuição simétrica no conjunto de dados quando a linha da mediana (segundo quartil) está no centro do retângulo formado entre primeiro e terceiro quartis. Quando a linha da mediana está mais próxima do primeiro quartil, diz-se que os dados são assimétricos positivos. Caso ela esteja mais próxima ao terceiro quartil, diz-se que os dados são assimétricos negativos.

O gráfico apresentado no Gráfico 16 mostra que os valores de concentração de Ca, Na e K são assimétricos negativos, já que as medianas estão mais próximas do primeiro quartil. Ou seja, a maior parte dos valores se concentram em regiões de menores concentrações em suas respectivas faixas.

Os níveis de concentração de K são significativamente maiores que os de Na em todas as amostras, assim como outros estudos já mostraram (APS; MARTENS, 2005; KALK; VISSINK; STEGENGA; BOOTSMA *et al.*, 2002; MORI; HU; HASEBE; TANAKA *et al.*, 2002) e já foi discutido anteriormente na introdução desta tese. Os níveis de Na e K na saliva são relacionados e o aumento da concentração de K é em decorrência da diminuição da concentração de Na (GUYTON; HALL; ESBÉRARD; CIPOLLA NETO *et al.*, 1997). Entretanto, este comportamento é oposto ao encontrado para estes eletrólitos no plasma humano, onde os níveis de Na são, geralmente, maiores que os de K (FELDMAN; DICKSON, 2017).

Apesar da composição da saliva ser influenciada pela dieta, é necessária uma mudança substancial nos hábitos alimentares, por vários meses, para que uma variação expressiva na composição, devido a esse fator, seja observada. Johansson e Birkhed estudaram as mudanças na composição e secreção da saliva em pessoas transicionando lentamente de uma dieta mista para uma dieta lactovegetariana. Em relação à composição, o estudo mostrou que as concentrações de Na e K aumentaram dentro de um período de 12 meses, no qual a maioria das pessoas estudadas atingiu consumo zero de carnes, peixes e ovo. Depois de 48 meses do início, os participantes voltaram para uma dieta mista, embora diferente da inicial, e as concentrações de Na e K diminuíram. Entretanto, como foi um estudo de longo período com pessoas, não foi possível mudar um tipo de alimento por vez e não foi possível concluir firmemente sobre os efeitos de tipos de alimentos específicos na composição da saliva (JOHANSSON; BIRKHED, 1994). Outros estudos na literatura apresentam correlações entre dieta e componentes orgânicos na saliva, mas dados em relação a tipos de comida consumidos e suplementos alimentares são escassos (MORZEL; TRUNTZER; NEYRAUD; BRIGNOT *et al.*, 2017).

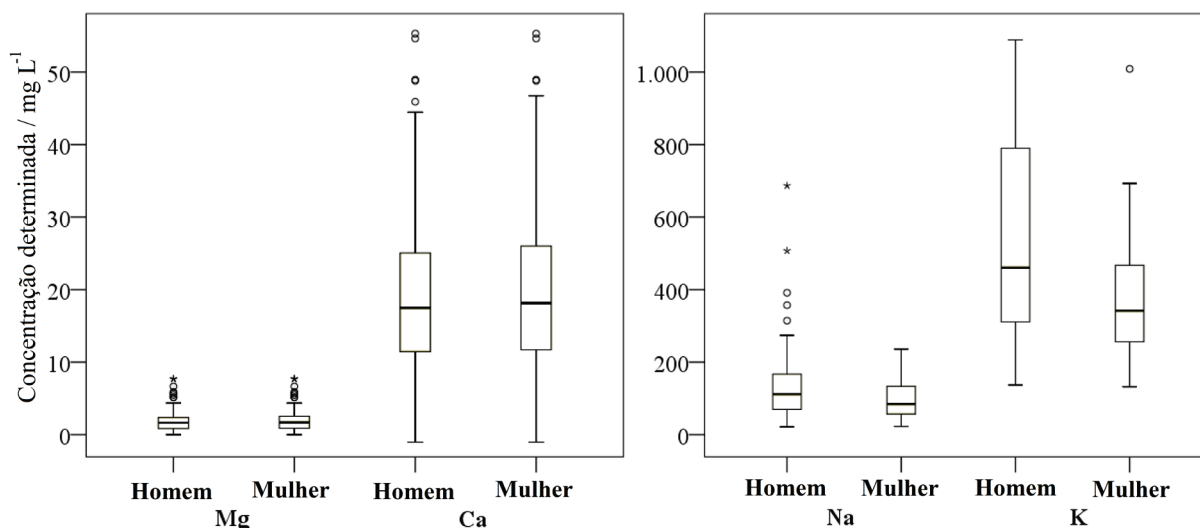
Algumas informações sobre saúde e condições fisiológicas dos pacientes estavam disponíveis em suas fichas. Essas fichas foram de preenchimento próprio dos doadores, onde eles informavam características pessoais e também sintomas ou doenças já diagnosticadas. Nesse contexto, foram escolhidas seis características ou condições para uma investigação mais sistemática: sexo, distúrbios de glicose no sangue, osteoporose, palpitações cardíacas, diminuição de massa muscular e perda de peso não intencional. Essa escolha se deu em função das informações disponíveis sobre cada doador e sua relevância para os objetivos do estudo. Além dessas seis características ou condições, as outras informações disponíveis estavam relacionadas a sensações ou emoções do que estado clínico propriamente dito.

É importante notar que é possível haver doadores assintomáticos em relação às condições investigadas. Caso haja, os dados obtidos para esses casos não refletem sua real condição em relação a uma condição específica. Isso mostra a complexidade envolvida em uma avaliação como a proposta no estudo e também pode explicar porque as tendências encontradas não levam a um perfil bem definido, como será discutido a seguir. Apesar disso, ainda assim foi possível verificar como a composição da saliva é influenciada por processos que ocorrem não somente na boca, mas também em outros sistemas do organismo.

Para essa investigação, os resultados de concentração obtidos foram separados em grupos convenientes e plotados em forma de *boxplot*. Esse tipo de gráfico foi escolhido para estas comparações porque, caso os intervalos de concentração dos grupos sendo comparados se sobrepusessem, não haveria diferenças significativas entre eles.

Inicialmente, foi feita a comparação das concentrações dos analitos entre homens e mulheres biológicos, como apresentado no Gráfico 17.

Gráfico 17 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração de Mg, Ca, Na e K entre homens e mulheres nas 109 amostras



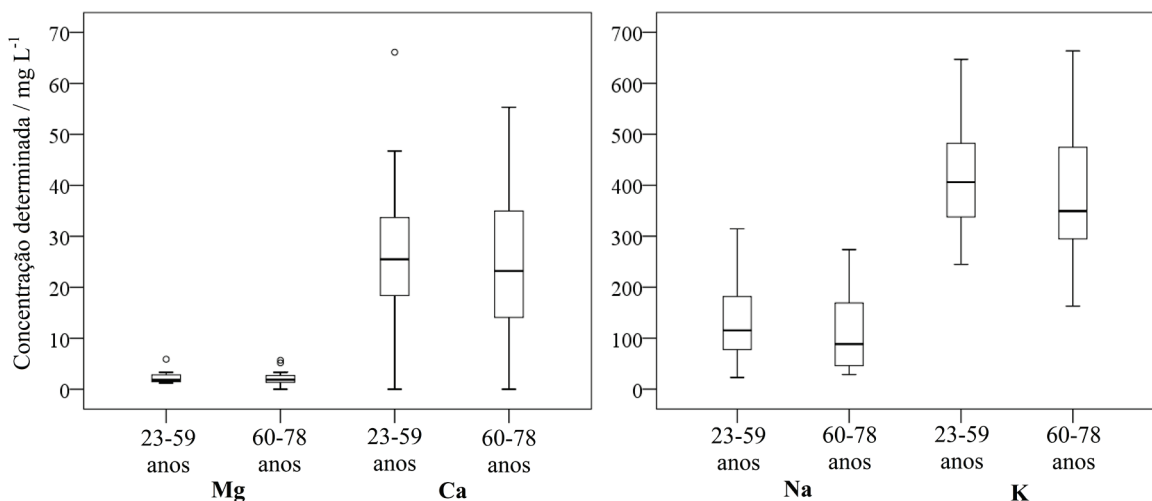
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foi possível perceber que a faixa de variação de K é significativamente maior para os homens do que para as mulheres, assim como a mediana dos homens é maior que das mulheres (respectivamente 461 e 391 mg L<sup>-1</sup>). Além disso, pode-se perceber que os dados de K são assimétricos negativos, com as medianas mais próximas do primeiro quartil, especialmente para os homens. Ou seja, os valores têm a tendência de se agruparem em uma região de menores concentrações dentro da faixa.

O K desempenha muitos papéis no organismo humano, sendo a manutenção da força muscular um dos mais importantes (CHEN; CHEN; MA; ZHOU *et al.*, 2013; CHEN; GUO; ZHANG; CHEN, 2013; SU; RUAN; YE; LIU *et al.*, 2016). O conjunto formado por homens apresentar concentrações mais elevadas que o conjunto formado por mulheres pode ser reflexo do fato de que K<sup>+</sup> é o cátion intracelular predominante (YU; CANZONIERO; CHOI, 2001) e a massa muscular em homens é, geralmente, maior que em mulheres (DANNESKIOLD-SAMSØE; BARTELS; BÜLOW; LUND *et al.*, 2009; HERDA; TREVINO; STERCZALA; MILLER *et al.*, 2019; LEE; BAXTER; EISCHER; GAGE *et al.*, 2017). Entretanto, diferenças nos níveis de K não foram encontradas entre pessoas com diminuição de massa muscular e com massa muscular regular, como será discutido a frente.

A faixa de idades das pessoas que doaram amostras foi de 23 a 78 anos. O Gráfico 18 mostra os dados separando os doadores entre pessoas com até 59 anos e pessoas de 60 anos em diante. As faixas de variação entre os grupos foram semelhantes para todos os analitos e nenhuma diferença significativa em relação à idade foi encontrada. Entretanto, as medianas para Ca, Na e K são ligeiramente menores para idosos do que para as pessoas de até 59 anos. As mudanças degenerativas normais nos órgãos de maneira geral e, especialmente, nos rins, levam a anormalidades nos eletrólitos em idosos. A severidade dessas anormalidades depende de muitos fatores além da má função de órgãos, como também de demais doenças e uso de medicamentos (SCHLANGER; BAILEY; SANDS, 2010). A leve tendência a menores teores de Ca, Na e K observada no Gráfico 18 pode ser reflexo de um desses fatores.

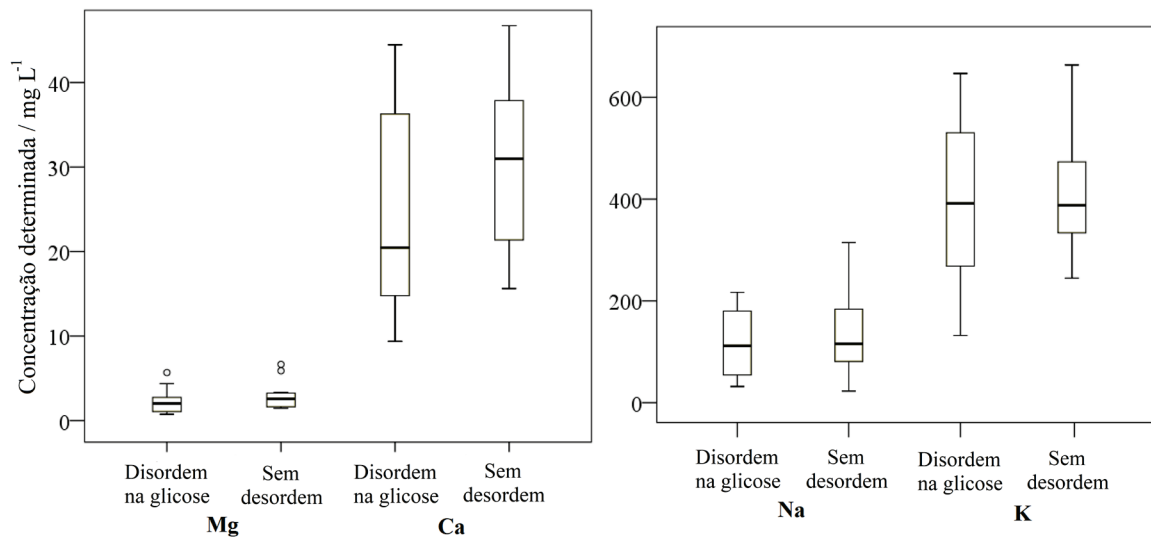
Gráfico 18 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas até 59 anos e de 60 em diante



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Estudos na literatura reportam que os níveis de Ca no sangue são maiores em pessoas com diabetes, em relação a pessoas sem essa doença (LEVY; STERN; GUTMAN; NAPARSTEK *et al.*, 1986; SORVA; TILVIS, 1990). O Gráfico 19 mostra o gráfico *boxplot* comparando pacientes com e sem desordens de glicose no sangue.

Gráfico 19 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem desordens de glicose no sangue

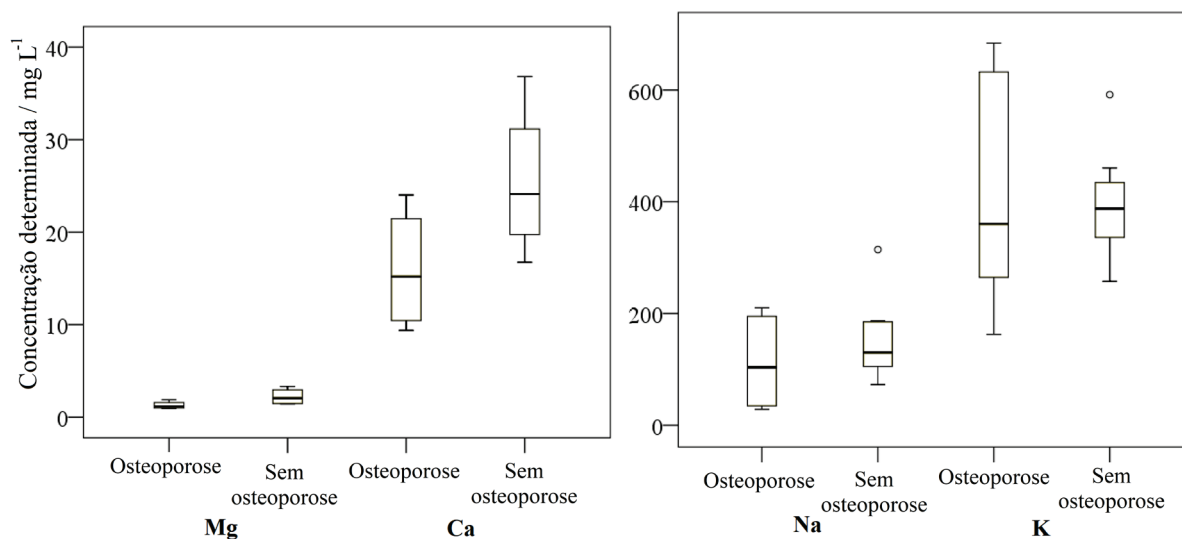


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Como pode ser visto, há uma discreta tendência de concentrações maiores de Ca nas amostras de pessoas sem desordem de glicose no sangue, como pode ser visto através da mediana das pessoas desse grupo, que é maior que das pessoas com a desordem. Portanto, a concentração de Ca na saliva apresenta comportamento diferente ao apresentado no sangue e investigações mais profundas precisam ser realizadas para compreender isso. Entretanto, é possível que o fato de haver maiores concentrações de Ca no sangue de pessoas diabéticas tenha como consequência a diminuição das concentrações em outros fluidos e tecidos. Uma possível forma de se avaliar isso seria através da quantificação do nível de glicose no sangue no dia da coleta da saliva. Isso seria importante porque os níveis de glicose no sangue de pessoas diabéticas também podem estar em faixas consideradas normais, caso elas estejam submetidas a um tratamento adequado.

O Gráfico 20 mostra o gráfico para pessoas com e sem osteoporose. Os resultados mostraram que as pessoas com osteoporose apresentaram variação de concentração de Ca em uma faixa menor que as pessoas sem osteoporose. Isso está dentro do que era esperado já que essa doença causa fragilidade óssea, o que está diretamente relacionado aos níveis de Ca em sua composição (GROUP, 1994).

Gráfico 20 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem osteoporose

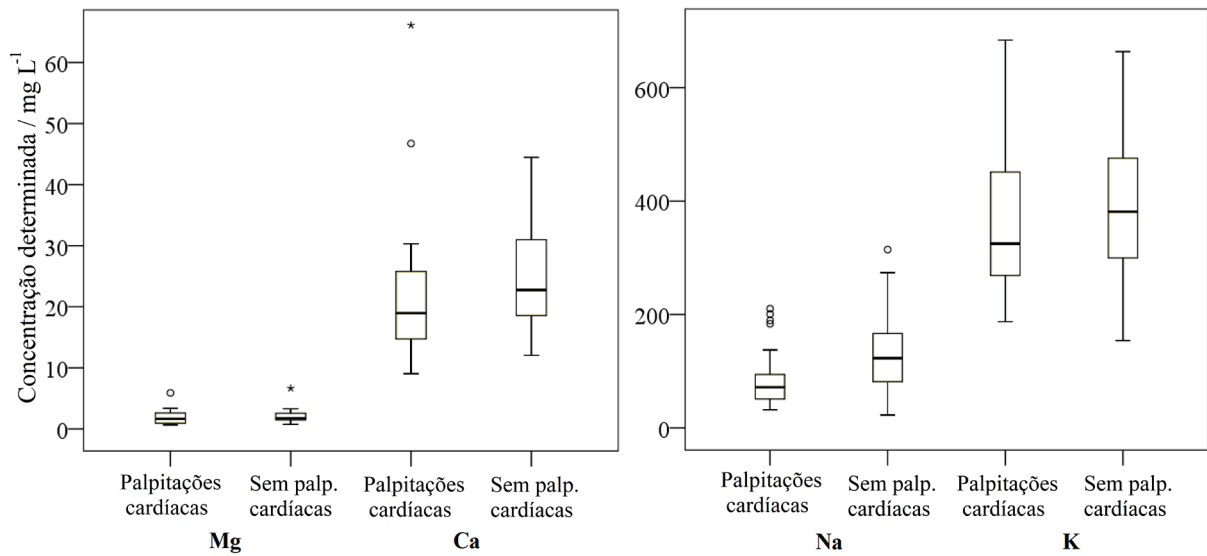


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Estudos na literatura mostram que o K desempenha um importante papel na prevenção da osteoporose e a redução na sua ingestão aumenta o risco de fraturas ósseas devidas à essa doença (HEANEY, 1996; LUTZ, 1984). Entretanto, os resultados presentes mostraram incidência de maiores concentrações de K em pessoas com osteoporose, o que indica que os níveis desse mineral na saliva podem não ser representativos dessa condição.

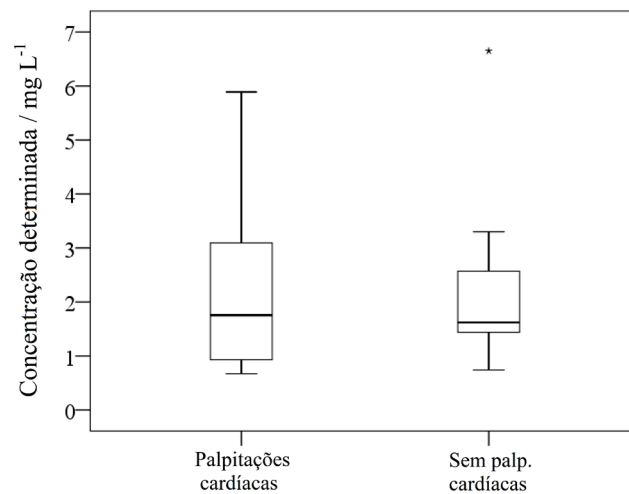
O Gráfico 21 mostra que os níveis de Na e Ca têm variações em faixas de concentração menores em pessoas com palpitações cardíacas. Embora o consumo elevado de Na geralmente esteja relacionado a doenças cardíacas (MARTENS; DUPONT; VERBRUGGE; DAMMAN *et al.*, 2019), as pessoas nessas condições geralmente reduzem o consumo em função de recomendações médicas, o que pode explicar a tendência de valores menores de Na em pessoas com palpitações cardíacas. O Gráfico 22 mostra os dados para Mg em uma escala diminuída, de forma a se obter um *zoom* para melhor visualização de detalhes. Pode ser percebido que a faixa para pessoas com palpitações cardíacas se estende até quase o dobro da faixa das pessoas sem palpitação cardíaca. Entretanto, grande porcentagem dos valores está concentrada em faixas semelhantes nos dois grupos, como pode ser confirmado pelas posições dos quartis.

Gráfico 21 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem palpitações cardíacas



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Gráfico 22 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg entre pessoas com e sem palpitações cardíacas

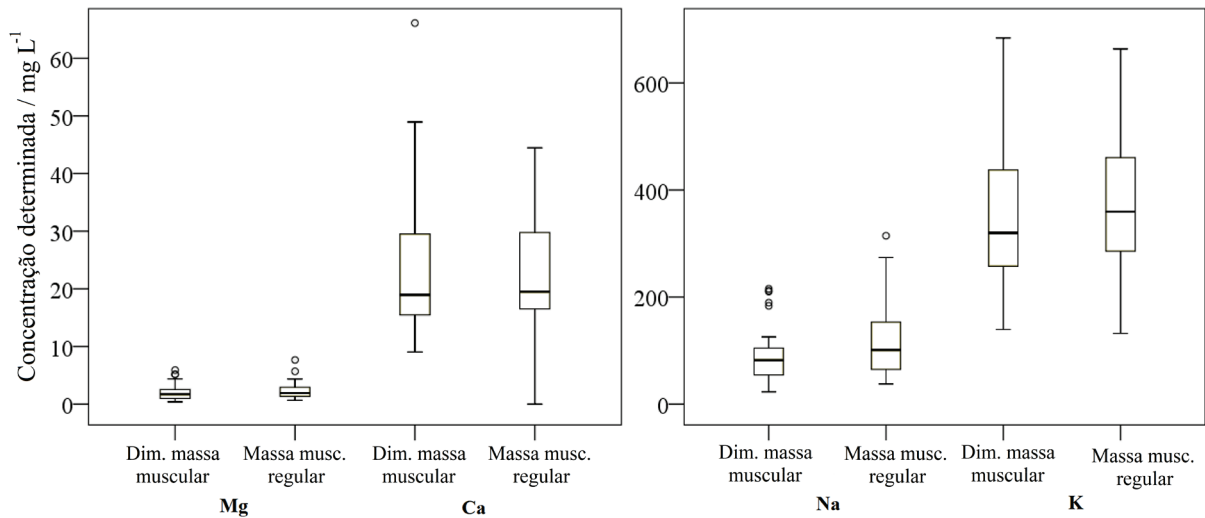


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O Gráfico 23 mostra os gráficos para pessoas com e sem diminuição de massa muscular. Apesar do papel importante do K nos músculos, não foram encontradas tendências diferentes nos dados para pessoas que descreveram ter diminuição de massa muscular. Entretanto, pessoas com a massa muscular sem alterações apresentaram tendência a maiores concentrações de Na.



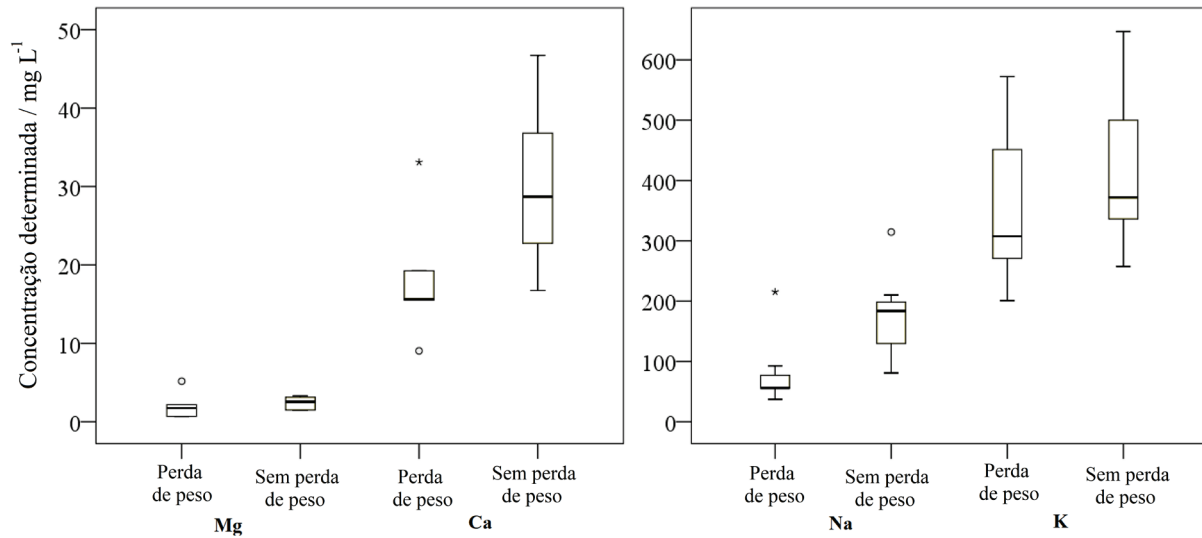
Gráfico 23 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem diminuição de massa muscular



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O Gráfico 24 mostra os gráficos para comparação dos resultados entre pessoas com e sem perda de peso não intencional. Nesse caso, os níveis de Na e Ca tenderam para menores valores para pacientes que relataram perda de peso. Um estudo na literatura discute várias possibilidades de causas de perda de peso não intencional, como problemas gastrointestinais, renais, endócrinos, neurológicos, psiquiátricos, uso de medicações e drogas ilícitas e outros. Esse estudo sugere um algoritmo para identificação da causa que tem, em uma de suas etapas, um exame para dosagem do nível de Ca no organismo (WONG, 2014). Há estudos na literatura que correlacionam aumento na ingestão de Ca (na forma de produtos lácteos) com perda de peso e de gordura corporal (ZEMEL, 2005; ZEMEL; THOMPSON; MILSTEAD; MORRIS *et al.*, 2004). Embora tenha havido questionamentos em relação a alguns dados de um desses trabalhos (KALMAN, 2005), essa correlação entre consumo de Ca e perda de peso pode ser discutida. Para os dados obtidos no presente projeto, foi observada a tendência de menores valores de Ca em pessoas que relataram perda de peso, o que mostra que a correlação na saliva pode não existir ou necessita de ser avaliada em função do tipo de alimentação.

Gráfico 24 – Gráficos *boxplot* comparando os níveis de concentração das 109 amostras para Mg, Ca, Na e K entre pessoas com e sem perda de peso não intencional



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 4.4.2 Amostras coletadas no Hospital Universitário

Esses dois estudos foram escolhidos para testar a aplicabilidade do método em procedimentos de rotinas, já que um número alto de amostras foi analisado, e para investigar se a composição de Mg, Ca, Na e K na saliva é influenciada por fatores fisiológicos do organismo.

O segundo estudo de caso foi realizado também para testar a aplicabilidade do método desenvolvido. Além disso, tem o objetivo de avaliar possíveis mudanças nas concentrações dos analitos em decorrência do procedimento de hemodiálise. A composição da saliva é mais próxima da urina do que do sangue, portanto alterações em sua composição são observadas depois da realização de hemodiálise. Estudos na literatura que avaliam a composição da saliva de pacientes renais crônicos mostraram que pessoas com essa doença têm maiores concentrações de Na e K do que pessoas sem. Além disso, eles relatam decréscimo nas concentrações de Na e K após o procedimento (BOTS; BRAND; VEERMAN; VALENTIJN-BENZ *et al.*, 2007; MANLEY, 2014).

Para esse estudo de caso, amostras de pacientes renais foram coletadas no Hospital Universitário da Universidade de Juiz de Fora, com a devida autorização dos responsáveis pelo setor de hemodiálise.

Os pacientes, ao chegarem no hospital para o procedimento, eram abordados pelo discente e convidados a doarem uma amostra antes e uma depois do procedimento. Muitos dos pacientes eram bastante debilitados, o que dificultou suas participações. Alguns dos que

concordaram inicialmente e doaram uma amostra antes do procedimento de hemodiálise, depois se recusaram a doar após o procedimento. Outros, embora desejassem doar depois do procedimento, não conseguiram produzir volumes necessários (de 2 a 3 mL), já que a condição de “boca seca” é uma declaração geral dos pacientes que realizam hemodiálise (MANLEY, 2014).

Assim, depois de cerca de 5 dias de coletas, 15 pacientes forneceram amostras antes e depois do procedimento. Entretanto, muitas dessas não puderam ser utilizadas devido ao pequeno volume ou grande quantidade de sólidos que não puderam ser separados por centrifugação. Então, foram analisadas 14 amostras no total, vindas de 7 pacientes.

As amostras foram chamadas de S<sub>x</sub>, com X variando de 1 a 7. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Concentrações determinadas de Mg, Ca, Na e K para amostras dos pacientes renais, coletadas antes e depois da hemodiálise

		Concentração determinada (mg L <sup>-1</sup> )						
		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>
<b>Mg</b>	Antes	< LOD	12.7	4.1	3.0	3.1	5.5	6.7
	Depois	3.7	8.0	<LOD	4.0	5.7	6.1	9.5
	<b>Variação (%)</b>	–	<b>-37</b>	–	<b>+31</b>	<b>+85</b>	<b>+10</b>	<b>+42</b>
<b>Ca</b>	Antes	8.4	66.0	47.3	24.1	69.2	54.7	84.9
	Depois	57.1	70.2	77.7	45.9	55.4	50.1	91.7
	<b>Variação (%)</b>	<b>+578</b>	<b>+6</b>	<b>+64</b>	<b>+90</b>	<b>-20</b>	<b>-8</b>	<b>+8</b>
<b>Na</b>	Antes	< LOD	330	312	190	62	275	196
	Depois	171	263	480	108	70	306	165
	<b>Variação (%)</b>	–	<b>-20</b>	<b>+54</b>	<b>-43</b>	<b>+13</b>	<b>+11</b>	<b>-16</b>
<b>K</b>	Antes	156	816	750	753	998	781	653
	Depois	543	795	1512	643	931	714	894
	<b>Variação (%)</b>	<b>+247</b>	<b>-2</b>	<b>+102</b>	<b>-15</b>	<b>-7</b>	<b>-9</b>	<b>+37</b>

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os resultados apresentaram variações percentuais grandes em alguns casos e discretas em outros. A menor variação encontrada foi a diminuição de 2% na concentração de K para o paciente S<sub>2</sub> e a maior foi o aumento de 578% na concentração de Ca para o paciente S<sub>1</sub>.

As porcentagens de variação de Mg e Na para o paciente S<sub>1</sub> não puderam ser calculadas, já que seus valores de concentração estavam abaixo do limite de detecção antes do

procedimento de hemodiálise. Entretanto, ficou evidenciado o aumento nessas concentrações depois do procedimento.

De maneira semelhante, a variação de Mg não pôde ser calculada para o paciente S<sub>3</sub>, já que sua concentração após o procedimento de hemodiálise está abaixo do limite de detecção, o que mostra sua diminuição.

O paciente S<sub>1</sub> foi o único que apresentou aumento na concentração de todos os analitos depois do procedimento de hemodiálise. Todos os outros, no entanto, apresentaram alterações variadas entre aumento e diminuição de forma aleatória entre todos os analitos.

Para a maioria dos pacientes foi observado aumento nas concentrações de Mg, Ca e Na depois da hemodiálise. A porcentagem de pacientes que apresentaram aumento foi de 71% para Mg e Ca e 57% para Na. Para K, no entanto, o oposto foi observado, já que 57% dos pacientes apresentaram diminuição em sua concentração. Ou seja, apenas o K mostrou o resultado esperado de acordo com os estudos da literatura citados.

É necessário considerar que o número de amostras é bastante modesto e nenhuma afirmação específica pode ser sugerida em termos de impactos biológicos do procedimento de hemodiálise, se forem avaliados apenas os dados obtidos. Os padrões que não foram encontrados aqui podem ser observados caso o número de amostras analisadas seja maior. Além disso, a quantificação de substâncias orgânicas na saliva pode auxiliar na interpretação de todos os resultados obtidos e facilitar a investigação de correlações. Contudo, o método desenvolvido pôde ser aplicado a esse conjunto de amostras, mostrando potencial para ser aplicado a diferentes situações de investigações clínicas, ainda que as informações a serem extraídas ainda são pouco específicas ou conclusivas.

## 5 CONCLUSÕES

Neste projeto foi realizado o desenvolvimento de um método de preparo de amostra de saliva humana, visando a determinação de íons metálicos por técnicas espectrométricas. Os resultados mostraram que a digestão ácida das amostras, considerada um método de referência, não foi necessária, já que o método proposto apresentou desempenho analítico estatisticamente equivalente. Este método proposto consistiu na centrifugação das amostras em uma etapa de pré-tratamento, seguida apenas por diluição em água deionizada, com fator de diluição igual para a determinação de todos os analitos. Este método de preparo apresentou vários benefícios, como menos etapas e manipulação das amostras, o que favoreceu a frequência analítica. Contando com todas as partes do processo, desde a retirada das amostras da refrigeração até a análise, calculou-se ser possível analisar 20 amostras por hora. Além disso, não foi necessário o uso de reagentes químicos, o que diminuiu os custos envolvidos e está de acordo com os princípios da Química Verde.

Dois estudos de caso foram realizados visando a aplicação do método e a obtenção de dados que pudessem ser úteis para a área da saúde. Um deles foi a análise de 109 amostras, cedidas pelo Lemos Laboratório<sup>®</sup>, para determinação de Mg e Ca por F AAS e Na e K por F AES. Os resultados tiveram grande variação entre os doadores. As faixas de concentrações foram bastante diferentes entre os analitos, sendo a menor faixa para o Mg (com valor máximo encontrado de 7,72 mg L<sup>-1</sup>) e a maior para o K (com valor máximo encontrado de 833 mg L<sup>-1</sup>). Ainda assim, o método se mostrou eficiente para as determinações, o que demonstra boa detectabilidade. Além disso, o método apresentou precisões e exatidões dentro do requerido, de acordo com as literaturas consultadas. Deste modo, as determinações puderam ser realizadas com bastante confiabilidade.

Foi possível encontrar algumas tendências nos dados e correlações entre eles e algumas condições fisiológicas dos organismos dos doadores. Tendências em diferenciação de sexo foram encontradas, assim como diferenciação entre pessoas com osteoporose, desordens de glicose no sangue, palpitação cardíaca e perda de peso não intencional, em comparação com pessoas sem essas condições, pelo menos do ponto de vista de diagnósticos conhecidos. Os dados obtidos, no entanto, mostraram a grande complexidade envolvida em avaliações do tipo, já que pode haver doadores assintomáticos para as condições investigadas. Isso pode ter contribuído para que não fosse encontrado um perfil bem definido de acordo com os grupos avaliados. Ainda assim, mesmo sem um controle rigoroso baseado em exames detalhados sobre

a condição clínica de cada doador, foi possível verificar o potencial apresentado pela determinação desses íons metálicos em saliva humana.

O segundo estudo de caso foi a análise de amostras de pacientes renais e os resultados mostraram a possibilidade de interferência da hemodiálise nas concentrações dos analitos na saliva dos pacientes. Entretanto, para qualquer afirmação nesse sentido, mais amostras precisam ser analisadas, visto que, devido a circunstâncias na coleta dessas amostras, no Hospital Universitário, apenas uma pequena porção de um conjunto modesto pôde ser utilizada. Ainda assim, a avaliação dos dados analíticos mostrou que há uma alteração significativa nos teores dos analitos na saliva, após a hemodiálise. Logo, isso indica que a composição mineral da saliva está sim relacionada à homeostase do organismo.

Os constituintes em nível traço também foram investigados por GF AAS. No nível de detecção alcançado através dessa técnica, apenas Mn foi identificado. A literatura indica a presença de outros constituintes traço na saliva, mas não foram detectados nas amostras obtidas por meio dessa técnica. Apesar de não ter sido possível finalizar o desenvolvimento de um método para determinação de Mn por GF AAS, as condições ótimas para as temperaturas de secagem, pirólise e atomização foram avaliadas e podem ser utilizadas em estudos futuros, por outros pesquisadores.

O presente projeto, então, envolveu um estudo sistemático de preparo de amostras de saliva humana para a determinação de metais por técnicas espectrométricas, além do desenvolvimento de um método analítico com características analíticas adequadas, como boas linearidade, detectabilidade, precisão e exatidão dentro das faixas de trabalho indicadas pela literatura. A aplicação do método levou a resultados de complexa avaliação, mas promissores do ponto de vista biológico.

Os resultados obtidos abrem caminho para investigações mais profundas, tanto em termos de outros constituintes, quanto de outras doenças e condições fisiológicas. Investigações de teores de íons metálicos na saliva e também em outros fluidos biológicos podem levar a um melhor entendimento dos fatores que influenciam a composição da saliva, assim como de seu papel como um reflexo do organismo como um todo.

## 5.1 PERSPECTIVAS

O estudo realizado deixou margem para algumas investigações que podem ser realizadas em estudos futuros. Entre elas pode-se citar:

- a) desenvolvimento de um método para a análise de suspensões, ou seja, sem a separação das partículas sólidas;
- b) realizar fracionamento para investigar em qual parte da amostra está determinado constituinte;
- c) completar o desenvolvimento de um método para determinação de Mn por GF AAS e desenvolver método para determinação de outros elementos-traço;
- d) investigação de outros fluidos biológicos e comparação dos níveis dos analitos entre eles e a saliva;
- e) analisar um maior número de amostras de pacientes submetidos à hemodiálise para melhor entendimento dos perfis encontrados nesse estudo;
- f) analisar amostras de outros doadores que apresentem outras condições clínicas e buscar mais correlações entre a composição da saliva e as condições fisiológicas.

## REFERÊNCIAS

ADOLFO, F. R.; DO NASCIMENTO, P. C.; LEAL, G. C.; BOHRER, D. *et al.* Simultaneous determination of Fe and Ni in guarana (*Paullinia cupana* Kunth) by HR-CS GF AAS: Comparison of direct solid analysis and wet acid digestion procedures. **Journal of Food Composition and Analysis**, 88, p. 1-9, 2020.

ÁLVAREZ, M. A.; CARRILLO, G. Simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper, chromium, nickel, lead and thallium in total digested sediment samples and available fractions by electrothermal atomization atomic absorption spectroscopy (ET AAS). **Talanta**, 97, p. 505-512, 2012.

ANASTAS, P. T.; ZIMMERMAN, J. B. Peer Reviewed: Design Through the 12 Principles of Green Engineering. **Environmental Science & Technology**, 37, n. 5, p. 94A-101A, 2003.

APS, J. K. M.; MARTENS, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, 150, n. 2, p. 119-131, 2005.

BERTON, P.; LANA, N. B.; RÍOS, J. M.; GARCÍA-REYES, J. F. *et al.* State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, 905, p. 24-41, 2016.

BHOWMICK, S.; KUNDU, A. K.; ADHIKARI, J.; CHATTERJEE, D. *et al.* Assessment of toxic metals in groundwater and saliva in an arsenic affected area of West Bengal, India: A pilot scale study. **Environmental Research**, 142, p. 328-336, 2015.

BÍBLIA, N. T. Romanos. In BÍBLIA. Português. **Bíblia de estudo desafios de todo homem**. Tradução de Emerson Justino. São Paulo: Mundo Cristão, 2018. p. 1289.

BOTS, C. P.; BRAND, H. S.; VEERMAN, E. C. I.; VALENTIJN-BENZ, M. *et al.* Acute effects of hemodialysis on salivary flow rate and composition. **Clinical nephrology**, 67, n. 1, p. 25-31, 2007.

BRITO, N. M.; DE AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 13, p. 129-146, 2003.

BURGUERA P, E.; SANCHEZ DE BRICEÑO, A.; RONDON, C. E.; BURGUERA, J. L. *et al.* Determination of Nickel in Saliva by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Using Various Chemical Modifiers with Zeeman-effect Background Correction. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 12, n. 2, p. 115-120, 1998.

CASTAGNOLA, M.; PICCIOTTI, P. M.; MESSANA, I.; FANALI, C. *et al.* Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, 31, n. 11, p. 2012-2021, 2011.



CHEN, C.-H.; BAIR, M.-J.; HSU, C.-W.; CHIU, T.-C. *et al.* Analysis of steroid hormones in human saliva by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, 7, n. 2, p. 486-489, 2015.

CHEN, Z.; CHEN, L.; MA, H.; ZHOU, T. *et al.* Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of potassium ion based on DNA G-quadruplex conformation. **Biosensors and Bioelectronics**, 48, p. 108-112, 2013.

CHEN, Z.; GUO, J.; ZHANG, S.; CHEN, L. A one-step electrochemical sensor for rapid detection of potassium ion based on structure-switching aptamer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 188, p. 1155-1157, 2013.

CHIAPPIN, S.; ANTONELLI, G.; GATTI, R.; DE PALO, E. F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, 383, n. 1-2, p. 30-40, 2007.

COSTA DE ALMEIDA, G. R.; UMBELINO DE FREITAS, C.; BARBOSA, F.; TANUS-SANTOS, J. E. *et al.* Lead in saliva from lead-exposed and unexposed children. **Science of The Total Environment**, 407, n. 5, p. 1547-1550, 2009.

CROWCROFT, N. S.; VYSE, A.; BROWN, D. W.; STRACHAN, D. P. Epidemiology of Epstein-Barr virus infection in pre-adolescent children: application of a new salivary method in Edinburgh, Scotland. **Journal of Epidemiology and Community Health**, 52, n. 2, p. 101-104, 1998.

DA SILVA CAMPOS ALMEIDA, N.; ALMEIDA PESSANHA, P. V.; SANT'ANA, A. C.; SANTOS SIMÕES, B. E. *et al.* Chemical characterization of different gourmet table salts by atomic spectrometry and FT-Raman spectroscopy. **Analytical Methods**, 11, n. 6, p. 774-782, 2019.

DANNESKIOLD-SAMSØE, B.; BARTELS, E. M.; BÜLOW, P. M.; LUND, H. *et al.* Isokinetic and isometric muscle strength in a healthy population with special reference to age and gender. **Acta Physiologica**, 197, n. s673, p. 1-68, 2009.

DE LA GUARDIA, M.; RUZICKA, J. Guest editorial. Towards environmentally conscientious analytical chemistry through miniaturization, containment and reagent replacement. **Analyst**, 120, n. 2, p. 17N-17N, 1995.

DE PAULA, C. E. R.; CRUZ, G. F. B.; REZENDE, C. M. S. P.; CASSELLA, R. J. Determination of Cr and Mn in moisturizing creams by graphite furnace atomic absorption spectrometry through direct introduction of the samples in the form of emulsions. **Microchemical Journal**, 127, p. 1-6, 2016.

DOS SANTOS, J. M.; DE ANDRADE, J. K.; GALVÃO, F.; FELSNER, M. L. Optimization and validation of ultrasound-assisted extraction for the determination of micro and macro minerals in non-centrifugal sugar by F AAS. **Food Chemistry**, 292, p. 66-74, 2019.

ELLOUMI, M.; MASO, F.; MICHAUX, O.; ROBERT, A. *et al.* Behaviour of saliva cortisol [C], testosterone [T] and the T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days. **European Journal of Applied Physiology**, 90, n. 1, p. 23-28, 2003.

FELDMAN, M.; DICKSON, B. Plasma Electrolyte Distributions in Humans—Normal or Skewed? **The American Journal of the Medical Sciences**, 354, n. 5, p. 453-457, 2017.

FRIEDMAN, B. J.; FREELAND-GRAVES, J. H.; BALES, C. W.; BEHMARDI, F. *et al.* Manganese Balance and Clinical Observations in Young Men Fed a Manganese-Deficient Diet. **The Journal of Nutrition**, 117, n. 1, p. 133-143, 1987.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 50, p. 78-84, 2013.

GIL, F.; HERNÁNDEZ, A. F.; MÁRQUEZ, C.; FEMIA, P. *et al.* Biomonitorization of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally exposed population. **Science of The Total Environment**, 409, n. 6, p. 1172-1180, 2011.

GONCALVES, A. C.; MORCILLO, A. M.; LOMAZI, E. A.; RIBEIRO, J. D. *et al.* WS10.3 Chloride in saliva and sweat in age-matched individuals with and without CF. **Journal of Cystic Fibrosis**, 16, p. S18, 2017.

GROUP, W. H. O. S. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, 843, p. 1-129, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; ESBÉRARD, C. A.; CIPOLLA NETO, J. *et al.* **Tratado de Fisiologia Médica**. 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan S.A., 1997.

HARDY, I. J.; GILLANDERS, L.; HARDY, G. Is manganese an essential supplement for parenteral nutrition? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, 11, n. 3, p. 289-296, 2008.

HEANEY, R. P. Bone Mass, Nutrition, and Other Lifestyle Factors. **Nutrition Reviews**, 54, n. 4, p. S3-S10, 1996.

HERDA, T. J.; TREVINO, M. A.; STERCZALA, A. J.; MILLER, J. D. *et al.* Muscular strength and power are correlated with motor unit action potential amplitudes, but not myosin heavy chain isoforms in sedentary males and females. **Journal of Biomechanics**, 86, p. 251-255, 2019.

HODINKA, R. L.; NAGASHUNMUGAM, T.; MALAMUD, D. Detection of Human Immunodeficiency Virus Antibodies in Oral Fluids. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 5, n. 4, p. 419-426, 1998.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2<sup>a</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

JENSDOTTIR, T.; NAUNTOFTE, B.; BUCHWALD, C.; BARDOW, A. Effects of Sucking Acidic Candy on Whole-Mouth Saliva Composition. **Caries Research**, 39, n. 6, p. 468-474, 2005.

JOHANSSON, G.; BIRKHED, D. Effect of a long-term change from a mixed to a lactovegetarian diet on human saliva. **Archives of Oral Biology**, 39, n. 4, p. 283-288, 1994.

KALIČANIN, B.; AJDUKOVIĆ, Z. Influence of saliva medium on freeing heavy metal ion from fixed dentures. **Science of The Total Environment**, 397, n. 1-3, p. 41-45, 2008.

KALK, W. W. I.; VISSINK, A.; STEGENGA, B.; BOOTSMA, H. *et al.* Sialometry and sialochemistry: a non-invasive approach for diagnosing Sjögren's syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 61, n. 2, p. 137-144, 2002.

KALMAN, D. S. Calcium and weight loss. **International Journal of Obesity**, 29, n. 11, p. 1392-1393, 2005.

KIM, Y. J.; KIM, Y. K.; KHO, H. S. Effects of smoking on trace metal levels in saliva. **Oral Diseases**, 16, n. 8, p. 823-830, 2010.

KUBALA, E.; STRZELECKA, P.; GRZEGOCCA, M.; LIETZ-KIJAK, D. *et al.* A Review of Selected Studies That Determine the Physical and Chemical Properties of Saliva in the Field of Dental Treatment. **BioMed Research International**, p. 13, 2018.

KURBAN, S.; MEHMETOGLU, I.; YERLIKAYA, F. Y.; GÖNEN, S. Investigation of Zinc Concentrations in Saliva of Patients with Thyroid Diseases. **Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism**, 17, p. 1-4, 2013.

LEE, A.; BAXTER, J.; EISCHER, C.; GAGE, M. *et al.* Sex differences in neuromuscular function after repeated eccentric contractions of the knee extensor muscles. **European Journal of Applied Physiology**, 117, n. 6, p. 1119-1130, 2017.

LEMOS, V. A.; DOS SANTOS, L. O. A new method for preconcentration and determination of mercury in fish, shellfish and saliva by cold vapour atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, 149, p. 203-207, 2014.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F. *et al.* "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, 26, p. 123-129, 2003.

LEVY, J.; STERN, Z.; GUTMAN, A.; NAPARSTEK, Y. *et al.* Plasma calcium and phosphate levels in an adult noninsulin-dependent diabetic population. **Calcified Tissue International**, 39, n. 5, p. 316-318, 1986.

LIMA, D. P.; DINIZ, D. G.; MOIMAZ, S. A. S.; SUMIDA, D. H. *et al.* Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**, 14, n. 3, p. e184-e188, 2010.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

LOURDES, A. M. F. O. M., A. M. S.; Sousa, R. A.; Silva, J. C. J. Ultrasound-assisted Extraction of Cr, K, Na, Pb and Zn in NPK Fertilizers and Determination by FAAS and FAES. **Atomic Spectroscopy**, 37, n. 3, p. 120-124, 2016.

LUTZ, J. Calcium balance and acid-base status of women as affected by increased protein intake and by sodium bicarbonate ingestion. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 39, n. 2, p. 281-288, 1984.

M<sup>a</sup>, Â.; LOURDES, F.; MIMURA, A.; SOUSA, R. *et al.* Ultrasound-assisted Extraction of Cr, K, Na, Pb, and Zn in NPK Fertilizers and Determination by FAAS and FAES. **Atomic Spectroscopy**, 37, p. 120-124, 2016.

MANLEY, K. J. SALIVA COMPOSITION AND UPPER GASTROINTESTINAL SYMPTOMS IN CHRONIC KIDNEY DISEASE. **Journal of Renal Care**, 40, n. 3, p. 172-179, 2014.

MAROTO, A.; RIU, J.; BOQUÉ, R.; XAVIER RIUS, F. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. **Analytica Chimica Acta**, 391, n. 2, p. 173-185, 1999.

MARTENS, P.; DUPONT, M.; VERBRUGGE, F. H.; DAMMAN, K. *et al.* Urinary Sodium Profiling in Chronic Heart Failure to Detect Development of Acute Decompensated Heart Failure. **JACC: Heart Failure**, 7, n. 5, p. 404-414, 2019.

MAZON, E. M. A. **Vinhos brasileiros**: teores totais e bioacessibilidade de As, Cd, Cu e Pb, teores de polifenóis totais e avaliação da rotulagem. 2013. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, São Paulo, 2013.

MCGEER, P. L.; LEE, M.; KENNEDY, K.; MCGEER, E. G. Saliva Diagnosis as a Disease Predictor. **J. Clin. Med.**, 9, p. 377-386, 2020.

MEDIOUNI, M.; KACZOR-URBANOWICZ, K. E.; MADIOUNI, R. Suggestions for creating the International Scientific Foundation of Saliva Diagnosis (ISFSD): New research strategies, development, and technologies. **Oral Science International**, 16, n. 3, p. 138-146, 2019.

MIKULEWICZ, M.; CHOJNACKA, K.; WOŹNIAK, B.; DOWNAROWICZ, P. Release of Metal Ions from Orthodontic Appliances: An In Vitro Study. **Biological Trace Element Research**, 146, n. 2, p. 272-280, 2011.

MIMURA, A. M. S.; FERREIRA, C. C. M.; SILVA, J. C. J. Fast and feasible sample preparation methods for extraction of trace elements from deposited particulate matter samples. **Analytical Methods**, 9, n. 3, p. 490-499, 2017.

MORI, M.; HU, W.; HASEBE, K.; TANAKA, S. *et al.* Use of phosphobetaine-type zwitterionic surfactant for the determination of alkali and alkaline earth metal ions and ammonium ion in human saliva by capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 374, n. 1, p. 75-79, 2002.

MORZEL, M.; TRUNTZER, C.; NEYRAUD, E.; BRIGNOT, H. *et al.* Associations between food consumption patterns and saliva composition: Specificities of eating difficulties children. **Physiology & Behavior**, 173, p. 116-123, 2017.

NIEMINEN, T.; ESKOLA, J.; KÄYHTY, H. Pneumococcal conjugate vaccination in adults: circulating antibody secreting cell response and humoral antibody responses in saliva and in serum. **Vaccine**, 16, n. 6, p. 630-636, 1998.

NRIAGU, J.; BURT, B.; LINDER, A.; ISMAIL, A. *et al.* Lead levels in blood and saliva in a low-income population of Detroit, Michigan. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 209, n. 2, p. 109-121, 2006.

NTIHABOSE, R.; SURETTE, C.; FOUCHER, D.; CLARISSE, O. *et al.* Assessment of saliva, hair and toenails as biomarkers of low level exposure to manganese from drinking water in children. **NeuroToxicology**, 64, p. 126-133, 2018.

OLIVEIRA, B. **Boxplot: como interpretar?**, 2019. Disponível em: <https://operdata.com.br/blog/como-interpretar-um-boxplot/>. Acesso em: 01-04-2020.

OLMEDO, P.; PLA, A.; HERNÁNDEZ, A. F.; LÓPEZ-GUARNIDO, O. *et al.* Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 659, n. 1, p. 60-67, 2010.

PENDLETON, M. Descriptions of melissopalynological methods involving centrifugation should include data for calculating Relative Centrifugal Force (RCF) or should express data in units of RCF or gravities (g). **Grana**, 45, n. 1, p. 71-72, 2006.

PFAFFE, T.; COOPER-WHITE, J.; BEYERLEIN, P.; KOSTNER, K. *et al.* Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. **Clinical Chemistry**, 57, n. 5, p. 675-687, 2011.

PIERZAK, M. Chromium and its role in the human body including the antidiabetic action. **Journal of Education, Health and Sport**, 8, n. 9, p. 1740-1746, 2018.

PINK, R.; SIMEK, J.; VONDRAKOVA, J.; FABER, E. *et al.* SALIVA AS A DIAGNOSTIC MEDIUM. **Biomedical papers**, 153, n. 2, p. 103-110, 2009.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Fundamentos do preparo de amostras. *In: Métodos de preparo de amostras para análise elementar*: Sociedade Brasileira de Química, p. 572, 2016.

SAAR-REISMAA, P.; VAHER, M.; KALJURAND, M.; KULP, M. *et al.* Simultaneous determination of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, ibotenic acid and psilocybin in saliva samples by capillary electrophoresis coupled with a contactless conductivity detector. **Analytical Methods**, 9, n. 21, p. 3128-3133, 2017.

SANTOS, D.; BATOREU, C.; MATEUS, L.; MARREILHA DOS SANTOS, A. P. *et al.* Manganese in human parenteral nutrition: Considerations for toxicity and biomonitoring. **NeuroToxicology**, 43, p. 36-45, 2014.

SCHLANGER, L. E.; BAILEY, J. L.; SANDS, J. M. Electrolytes in the Aging. **Advances in Chronic Kidney Disease**, 17, n. 4, p. 308-319, 2010.

SHIGEMI, T.; TANAKA, T.; HAYASHIDA, Y.; MAKI, K. Study of Salivary Strontium and Silver Concentrations in Primary School Children Related to Dental Caries. **Biological Trace Element Research**, 123, n. 1, p. 80-90, 2008.

SIQUEIRA, W. L.; DE OLIVEIRA, E.; MUSTACCHI, Z.; NICOLAU, J. Electrolyte concentrations in saliva of children aged 6-10 years with Down syndrome. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, 98, n. 1, p. 76-79, 2004.

SORVA, A.; TILVIS, R. S. Low Serum Ionized to Total Calcium Ratio: Association with Geriatric Diabetes mellitus and with Other Cardiovascular Risk Factors? **Gerontology**, 36, n. 4, p. 212-216, 1990.

STAFF, J. F.; HARDING, A.-H.; MORTON, J.; JONES, K. *et al.* Investigation of saliva as an alternative matrix to blood for the biological monitoring of inorganic lead. **Toxicology Letters**, 231, n. 2, p. 270-276, 2014.

SU, H.; RUAN, W.; YE, S.; LIU, Y. *et al.* Detection of physiological potassium ions level in human serum by Raman scattering spectroscopy. **Talanta**, 161, p. 743-747, 2016.

SUZUKI, M.; FURUHASHI, M.; SESOKO, S.; KOSUGE, K. *et al.* Determination of creatinine-related molecules in saliva by reversed-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry and the evaluation of hemodialysis in chronic kidney disease patients. **Analytica Chimica Acta**, 911, p. 92-99, 2016.

TAAHERI, J.; BAKHSHI, M.; ARYANKIA, A.; NOORMOHAMMADI, R. Use of Saliva for Diagnosis of Diseases. **Journal of Islamic Dental Association of IRAN**, 26, n. 2, p. 136-147, 2014.

TALIO, M. C.; LUCONI, M. O.; MASI, A. N.; FERNÁNDEZ, L. P. Cadmium monitoring in saliva and urine as indicator of smoking addiction. **Science of The Total Environment**, 408, n. 16, p. 3125-3132, 2010.

THOMPSON, M.; ELLISON STEVEN, L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P. *et al.* Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, 71, n. 2, p. 337-348, 1999.

TIMERBAEV, A. R. Inorganic analysis of biological fluids using capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, 31, n. 11, p. 2012-2021, 2008.

WANG, D.; DU, X.; ZHENG, W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. **Toxicology Letters**, 176, n. 1, p. 40-47, 2008.

WATANABE, K.; TANAKA, T.; SHIGEMI, T.; HAYASHIDA, Y. *et al.* Mn and Cu concentrations in mixed saliva of elementary school children in relation to sex, age, and dental caries. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 23, n. 2, p. 93-99, 2009.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Wile-VCH, 1999.

WONG, C. J. Involuntary Weight Loss. **Medical Clinics of North America**, 98, n. 3, p. 625-643, 2014.

YAARI, A.; TOVBIN, D.; ZLOTNICK, M.; MOSTOSLAVSKY, M. *et al.* Detection of HCV salivary antibodies by a simple and rapid test. **Journal of Virological Methods**, 133, n. 1, p. 1-5, 2006.

YU, J.; ZHANG, X.; LU, Q.; WANG, X. *et al.* Determination of calcium and zinc in gluconates oral solution and blood samples by liquid cathode glow discharge-atomic emission spectrometry. **Talanta**, 175, p. 150-157, 2017.

YU, S. P.; CANZONIERO, L. M.; CHOI, D. W. Ion homeostasis and apoptosis. **Curr Opin Cell Biol**, 13, n. 4, p. 405-411, 2001.

ZAMANI POZVEH, E.; SEIF, A.; GHALAYANI, P.; MALEKI, A. *et al.* The Effect of Mustard Gas on Salivary Trace Metals (Zn, Mn, Cu, Mg, Mo, Sr, Cd, Ca, Pb, Rb). **PLoS ONE**, 10, n. 5, p. 1-9, 2015.

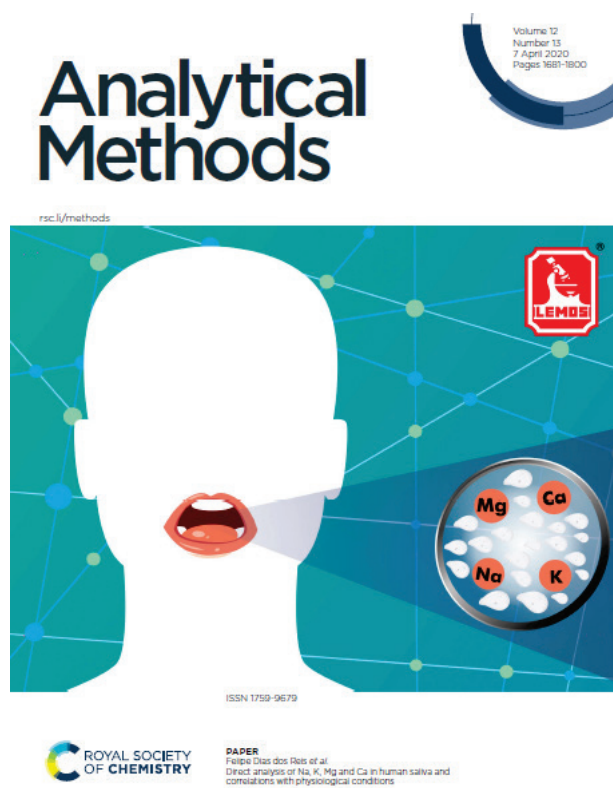
ZEMEL, M. B. Dairy augmentation of weight and fat loss. **International Journal of Obesity**, 29, n. 11, p. 1393-1394, 2005.

ZEMEL, M. B.; THOMPSON, W.; MILSTEAD, A.; MORRIS, K. *et al.* Calcium and Dairy Acceleration of Weight and Fat Loss during Energy Restriction in Obese Adults. **Obesity Research**, 12, n. 4, p. 582-590, 2004.

## ANEXO A – Artigo publicado

O artigo científico publicado com os dados do presente projeto foi escolhido como capa da edição de Abril da revista *Analytical Methods*. A Figura 3 apresenta a capa da revista e a Figura 4 apresenta parte da primeira página do artigo, onde aparecem informações que permitem que ele seja encontrado no *site* da revista.

Figura 3 – Capa da edição de Abril da revista *Analytical Methods*, que apresenta uma arte gráfica baseada no presente projeto



Fonte: *Analytical Methods* (2020)



Figura 4 – Parte da primeira página do artigo, onde aparecem informações que permitem que ele seja encontrado no site da revista

Analytical  
Methods



PAPER



Cite this: *Anal. Methods*, 2020, 12, 1702

## Direct analysis of Na, K, Mg and Ca in human saliva and correlations with physiological conditions†

Felipe Dias dos Reis, <sup>\*,a</sup> Olavo dos Santos Pereira Júnior<sup>b</sup> and Rafael Arromba de Sousa<sup>a</sup>

Saliva is a biological fluid composed of several organic and inorganic compounds. Its rich composition, due to a complex formation process, allows saliva to be an important biological fluid for collecting information from an organism. Organic compounds have been largely studied and the correlation of their levels with physiological conditions are well reported in the literature. In this context, the aim of the present study was to investigate the mineral composition of saliva (Mg, Ca, Na and K in 109 individuals) in order to discover correlations with physiological conditions, such as biological gender, blood glucose disorders, osteoporosis, heart palpitations, decreased muscular mass and unintentional weight loss. A sample preparation study was carried on and direct analysis was chosen due to its many advantages over acid digestion. The results showed that the levels of the analytes varied largely and presented no identified patterns. However, through boxplot analysis, some statistical differences and correlations with physiological conditions could be found. In addition, 30 saliva samples of renal patients were collected in order to investigate variations in the levels of the analytes before and after hemodialysis. The results showed that the variations tended to form a pattern, which indicated a possible correlation between the hemodialysis procedure and these specific ions in human saliva.

Received 31st January 2020  
Accepted 19th February 2020

DOI: 10.1039/d0ay00203h

rsc.li/methods

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

## ANEXO B – Determinação de Cloreto em parte das amostras

O ânion  $\text{Cl}^-$  é um dos constituintes inorgânicos da saliva humana (CASTAGNOLA; PICCIOTTI; MESSANA; FANALI *et al.*, 2011) e, como já mencionado, tem sua concentração intimamente ligada à dos íons  $\text{Na}^+$  (GUYTON; HALL; ESBÉRARD; CIPOLLA NETO *et al.*, 1997). Devido à essa relação com os íons  $\text{Na}^+$  e ao potencial de sua quantificação para diagnóstico de uma condição fisiológica do organismo (no caso, a fibrose cística) (GONCALVES; MORCILLO; LOMAZI; RIBEIRO *et al.*, 2017), houve interesse também na determinação de  $\text{Cl}^-$  nas amostras disponíveis.

Entretanto,  $\text{Cl}^-$  não pode ser determinado pelas técnicas de F AAS e F AES, que foram utilizadas neste projeto. Então, levando-se em consideração equipamentos e técnicas disponíveis no laboratório de trabalho, escolheu-se a titulação condutimétrica para uma outra aplicação do preparo de amostra desenvolvido e para determinação de  $\text{Cl}^-$ . Nesta técnica, o ponto final da titulação é encontrado a partir de medidas de condutividade das soluções.

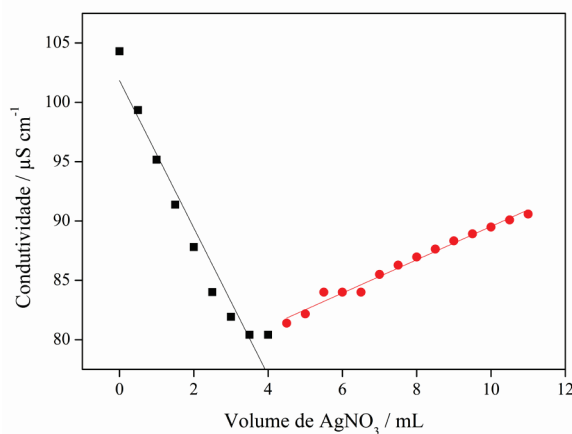
Essa titulação é possível utilizando-se  $\text{AgNO}_3$  como titulante, já que o íon  $\text{Ag}^+$  forma com o íon  $\text{Cl}^-$  o  $\text{AgCl}$ , um sólido branco e insolúvel em água. A condutividade da solução com amostra decresce conforme  $\text{AgNO}_3$  é adicionado, já que os íons cloreto em solução começam a ser precipitados. Entretanto, depois do ponto final da titulação, íons prata em excesso ficam em solução, o que faz a condutividade aumentar. O ponto onde a condutividade começa a aumentar é, então, tido como o ponto final da titulação.

Essa técnica é relativamente simples e com custo associado relativamente baixo, já que condutivímetros são equipamentos considerados baratos. Entretanto, o processo é extremamente demorado, o que faz a frequência analítica ser muito baixa. Por isso, esse estudo foi realizado com um número reduzido de amostras, selecionadas de forma a abranger homens e mulheres de diferentes idades.

Inicialmente, para testar o procedimento, uma solução de  $\text{NaCl}$  foi preparada, de forma a se obter concentração de  $0,008 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cl}^-$ . Essa concentração foi escolhida pois está dentro da faixa de concentração de cloreto esperada para as amostras, de acordo com resultados anteriores apresentados por Kalk *et al.* (KALK; VISSINK; STEGENGA; BOOTSMA *et al.*, 2002). Depois de uma série de testes, a concentração de  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  foi escolhida como titulante. Um volume de 1mL dessa solução de  $\text{NaCl}$  foi, então, titulado com solução de  $\text{AgNO}_3$ . Esse procedimento foi realizado em triplicata.

O Gráfico 25 mostra o perfil do gráfico obtido para uma das amostras analisadas. O ponto final da titulação é o ponto de intercessão das retas decrescente e crescente. A Tabela 14 mostra os dados obtidos para a triplicata da determinação de  $\text{Cl}^-$  na solução de NaCl preparada.

Gráfico 25 – Perfil de uma curva de titulação condutimétrica de  $\text{Cl}^-$  com  $\text{AgNO}_3$  obtida para uma das amostras de saliva analisada



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Tabela 14 – Valores de  $\text{Cl}^-$  determinados em triplicata na solução de NaCl preparada

Réplica	Concentração de $\text{Cl}^-$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	RSD (%)	Erro relativo médio (%)
1	0,0081		
2	0,0081	9,4	7,1
3	0,0095		

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Os resultados obtidos para a solução de NaCl preparada foram satisfatórios. O RSD foi de 9,4% e o erro relativo médio foi de 7,1%. O erro relativo é uma estimativa da exatidão, já que compara os valores de concentração obtidos com os valores reais.

Ao todo, 25 amostras de saliva foram analisadas empregando as condições experimentais conforme descrito. Os valores de concentração de  $\text{Cl}^-$  obtidos estão apresentados na Tabela 15. A faixa de concentração foi de 81 a 806  $\text{mg L}^{-1}$ , o que é compatível com valores reportados no estudo citado acima.

Tabela 15 – Concentrações de Cl<sup>-</sup> determinadas por titulação condutimétrica para 25 amostras

Amostra	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
A1	167
A2	123
A3	170
A4	81
A5	415
A6	464
A7	317
A8	248
A9	271
A10	174
A11	778
A12	221
A13	189
A14	107
A15	283
A16	570
A17	539
A18	806
A19	449
A20	415
A21	360
A22	329
A23	781
A24	318
A25	706

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Os resultados obtidos apresentaram variação entre si de aproximadamente 60%, o que mostra grande dispersão entre eles e reflete a variação nos níveis desse analito entre os doadores. É interessante notar que a faixa de concentrações do Cl<sup>-</sup> ( $2,28 \times 10^{-3} - 0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ) nas amostras englobou grande parte das faixas encontradas para Na<sup>+</sup> ( $9,57 \times 10^{-4} - 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) e para K<sup>+</sup> ( $3,38 \times 10^{-3} - 0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ). Portanto, foram encontrados valores para Cl<sup>-</sup> maiores do que os esperados na saliva, já que é comum estes valores serem semelhantes aos de Na<sup>+</sup> e menores que os de K<sup>+</sup> (GONCALVES; MORCILLO; LOMAZI; RIBEIRO *et al.*, 2017). Entretanto, observando-se individualmente os resultados obtidos, percebe-se que apenas algumas amostras forneceram valores de concentração que ultrapassaram os valores para o Na<sup>+</sup> e podem refletir alguma condição fisiológica, não identificada, específica de alguns doadores. Os valores restantes estão em uma faixa semelhante à do íon Na<sup>+</sup>.

Apesar de ser uma técnica relativamente simples, a titulação condutimétrica demonstrou ter detectabilidade adequada para o analito nas amostras em questão, principalmente por este

ser um constituinte que pode ser considerado majoritário. Entretanto, essa titulação demanda o uso elevado de soluções de  $\text{AgNO}_3$ , o que não é ambientalmente amigável. Além disso, por se tratar de um processo extremamente laborioso, não é adequado para análises de grandes quantidades de amostras.

Nesse sentido, técnicas espectrométricas que utilizam plasma indutivamente acoplado (ICP) se mostram bastante interessantes para quantificação do íon  $\text{Cl}^-$ , principalmente quando a detecção é por massa, tanto pela detectabilidade que atingem (níveis muito abaixo do que é possível por titulação condutimétrica) quanto pela frequência analítica que é bastante superior. Além desses, técnicas baseadas em métodos de separação (como eletroforese capilar e cromatografia iônica) também se mostram interessantes.

Os resultados apresentados para a determinação de  $\text{Cl}^-$  por titulação condutimétrica mostram o potencial do método de preparo de amostras desenvolvido também para a determinação de analitos por outras técnicas que não sejam espectrométricas, o que expande sua aplicabilidade para muitas outras possibilidades. A titulação condutimétrica tem princípios de funcionamento completamente diferentes das técnicas espectrométricas, o que demonstra a versatilidade do método desenvolvido.

Além disso, foi possível confirmar a relação entre as concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , apesar de alguns poucos doadores terem apresentado valores acima da média dos demais. Essa relação entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  é um aspecto fisiológico importante e característico da saliva, que pode ser explorado futuramente em novos estudos.