



Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM MEL
APÓS DECOMPOSIÇÃO COM PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO USANDO SISTEMA DE ALTA
PRESSÃO**

Juliana Pinheiro de Souza

PPGQ

Santa Maria, RS - Brasil

2016

DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM MEL APÓS DECOMPOSIÇÃO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO USANDO SISTEMA DE ALTA PRESSÃO

por

Juliana Pinheiro de Souza

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Santa Maria, RS - Brasil
2016

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM MEL APÓS
DECOMPOSIÇÃO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
USANDO SISTEMA DE ALTA PRESSÃO**

elaborada por

Juliana Pinheiro de Souza

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Irineu Müller - Orientador (UFSM - RS)

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte (UFSM - RS)

Prof. Dr. Sérgio Roberto Mortari (UNIFRA - RS)

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2016.

Declaração

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

Juliana Pinheiro de Souza

“Insanidade é continuar fazendo
sempre a mesma coisa e esperar
resultados diferentes”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Santa Maria** e ao **Programa de Pós-graduação em Química** que tornaram possível a execução desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Edson Irineu Müller**, pela orientação durante esses anos, pela amizade, pela paciência em transmitir seus conhecimentos, pela total disponibilidade em discutir as tarefas desenvolvidas durante o mestrado e, principalmente por ser um exemplo de profissional.

Ao **Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte**, por fazer parte da banca examinadora, por suas valiosas contribuições para esse trabalho, por todos os ensinamentos compartilhados durante o mestrado e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Mortari**, por fazer parte da banca examinadora e pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cordeiro Bolzan e Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler** por participarem da banca de qualificação e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento final do trabalho.

Aos demais professores do Setor de Química Industrial e Ambiental, **Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi, Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, Prof. Dr. José Neri Gottfried Paniz, Prof^a. Dr^a. Paola de Azevedo Mello e Prof^a. Dr^a. Rochele Sogari Picoloto**, pelas oportunidades de crescimento profissional que foram concebidas a mim, por todos os ensinamentos compartilhados e exemplo de profissionalismo.

Aos colegas do Setor de Química Industrial e Ambiental, especialmente à **Kéllen** pela ajuda direta na realização desse trabalho. À **Flávia, Lisarb, Michele, Mônica, Paula e Tássia** pela amizade, compreensão e companhia ao longo do mestrado.

Aos meus pais, **Paulo Sérgio e Maribel**, pelo apoio nas horas difíceis e por todo o amor de sempre. Sem vocês eu não estaria aqui.

Ao **Ademir** da secretaria do PPGQ pela atenção e disponibilidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Mel: Propriedades e características	4
2.2 Halogênios: Aspectos gerais	6
2.3 Técnicas analíticas de determinação de halogênios	7
2.3.1 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado	7
2.3.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ..	9
2.3.3 Potenciometria	9
2.3.4 Cromatografia de íons	10
2.3.5 Análise por ativação neutrônica	10
2.4 Métodos de preparo de amostra para posterior determinação de	
halogênios.....	11
2.4.1 Piroidrólise	12
2.4.2 Extração em meio alcalino	12
2.4.3 Combustão.....	13
2.4.4 Decomposição por via úmida.....	14
2.4.4.1 Decomposição utilizando H ₂ O ₂	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Instrumentação.....	21
3.2 Reagentes e Amostras	23
3.3 Preparo de amostra.....	24

3.3.1 Decomposição utilizando H ₂ O ₂ em meio alcalino assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara de reação única de alta pressão (MAD-SRC)	24
3.3.2 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC).....	27
3.4 Determinação da concentração de carbono	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Amostras	32
4.2 Avaliação dos parâmetros no método de decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em sistema de câmara de reação única de alta pressão (MAD-SRC)	32
4.2.1 Avaliação da temperatura de decomposição	33
4.2.2 Avaliação do volume de H ₂ O ₂	35
4.2.3 Avaliação da massa de mel	36
4.2.4 Avaliação do volume de NH ₄ OH	37
4.3 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas.....	40
4.4 Efeito da concentração de carbono na determinação de Cl, Br e I por ICP-MS	42
4.5 Determinação de F por IC e ISE	44
4.6 Avaliação da exatidão do método.....	46
4.6.1 Ensaio de recuperação	46
4.6.2 Decomposição de material de referência (RM).....	47
4.6.3 Combustão iniciada por micro-ondas – MIC	49
4.7 Quantificação de F, Cl, Br e I em diferentes amostras de mel.....	50
4.8 Limites de quantificação para F, Cl, Br e I.....	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Possível mecanismo para a degradação oxidativa de aldoses e cetoses utilizando H_2O_2 e NH_4OH18
- Figura 2.** Procedimento para a decomposição de mel em sistema de câmara de reação única (SRC) de alta pressão. (Figura 2A) Sistema Ultrawave, (Figura 2B) frasco reacional de PTFE onde são adicionados 120 mL de H_2O e 5 mL de H_2O_2 , (Figura 2C) a amostra é pesada diretamente nos frascos de quartzo, e são adicionados H_2O_2 e NH_4OH , (Figura 2D e 2E) os frascos são fixados no rotor e esse é inserido na cavidade do sistema e (Figura 2F e 2G) o sistema é fechado e pressurizado com 40 bar de Ar.....26
- Figura 3.** 500 mg de mel misturados a 200 mg de celulose microcristalina e 50 μL de NH_4NO_3 , envolvidas em um filme de polietileno..... 27
- Figura 4.** Fluxograma das variáveis avaliadas para a decomposição das amostras de mel.30
- Figura 5.** Perfil de temperatura e pressão para a decomposição de 500 mg de mel e 6 mL de H_2O_2 em meio alcalino na temperatura final de 250 °C. .34
- Figura 6.** Variação da concentração de C nas temperaturas avaliadas para decomposição de 500 mg de mel I e 6 mL H_2O_2 em meio alcalino (400 μL de NH_4OH)..... 35
- Figura 7.** Variação da concentração de C nos volumes de H_2O_2 avaliados para decomposição de 500 mg de mel em meio alcalino (400 μL de NH_4OH) na temperatura de 250 °C.36
- Figura 8.** Concentração de C para as diferentes massas de amostras avaliadas para decomposição de mel com 8 mL de H_2O_2 em meio alcalino na temperatura de 250 °C.37
- Figura 9.** Variação do valor de pH nos diferentes volumes de NH_4OH avaliados para a decomposição de mel com 500 mg de amostra, 8 mL de H_2O_2 e temperatura de 250 °C.38
- Figura 10.** Perfil de temperatura e pressão no sistema Ultrawave, onde é mostrada (-) temperatura da cavidade interna, (-) pressão na

cavidade interna e (–) temperatura na cavidade externa.....	40
Figura 11. Avaliação da recuperação de Cl, Br e I quando diferentes concentrações de C foram utilizadas na determinação por ICP-MS.	44
Figura 12. Cromatogramas obtidos na verificação de interferências para fluoreto. (–) solução de referência de 100 µg L ⁻¹ de F, (–) 100 µg L ⁻¹ de acetato, (–) 100 µg L ⁻¹ de formiato, (–) amostra de mel A sem fortificação (10 vezes diluída).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química do mel. ^{1,2}	5
Tabela 2.	Propriedades físico-químicas dos halogênios. ^{5,18}	8
Tabela 3.	Rendimento da degradação oxidativa de carboidratos à formiato de amônio na presença de H ₂ O ₂ e NH ₄ OH. ³⁷	19
Tabela 4.	Condições operacionais para a determinação da concentração de C por ICP-OES e Cl, Br e I por ICP-MS.....	23
Tabela 5.	Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de mel em sistema Ultrawave.	27
Tabela 6.	Programa de aquecimento utilizado para a combustão de amostras de mel.	28
Tabela 7.	Concentração encontrada para F, Cl, Br e I na amostra A utilizando o método da MIC.....	42
Tabela 8.	Resultados obtidos para a quantificação de F, Cl, Br e I após fortificação e decomposição da amostra A utilizando a decomposição com H ₂ O ₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão.....	47
Tabela 9.	Resultados obtidos para a determinação de Cl, Br e I em RM de <i>Corn Bran</i> após decomposição com H ₂ O ₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão.....	48
Tabela 10.	Resultados obtidos para a determinação de Cl, Br e I em RM de <i>Rice Flour</i> após decomposição com H ₂ O ₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão.....	48
Tabela 11.	Resultados obtidos para a determinação de F, Cl, Br e I utilizando MIC e MAD com H ₂ O ₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão. Resultados expressos em µg g ⁻¹	49
Tabela 12.	Resultados para a determinação de F, Cl, Br e I para diferentes amostras de mel usando a decomposição com H ₂ O ₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão como método de preparo de amostras. Resultados expressos em µg g ⁻¹	50
Tabela 13.	Limites de quantificação obtidos para F por ISE e IC, para Cl por ICP-MS e IC e para Br e I por ICP-MS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*

IC, cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*

ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ISE, eletrodo íon seletivo, do inglês *ion selective electrode*

LOD, limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

MAD, digestão assistida por micro-ondas, do inglês *microwave-assisted digested*

MIC, combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave-induced combustion*

NAA, análise por ativação neutrônica, do inglês *neutron activation analysis*

NIST, do inglês *National Institute of Standards e Technology*

PTFE, politetrafluoretileno

RM, material de referência, do inglês *reference material*

RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

SD, desvio padrão, do inglês *standard deviation*

TISAB, tampão de ajuste de força iônica total, do inglês *Total Ionic Strength Adjuster Buffer*

WHO, Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

Título: Determinação de halogênios em mel após decomposição com peróxido de hidrogênio usando sistema de alta pressão

Autor: Juliana Pinheiro de Souza

Orientador: Edson Irineu Müller

Neste trabalho foi avaliado um sistema de câmara de reação única (SRC) de alta pressão para a decomposição de mel onde se buscou utilizar um reagente que atendesse aos princípios da química verde. Dentre os agentes oxidantes estudados, optou-se pela utilização do H_2O_2 , pois este não gera resíduos tóxicos e tem como principal produto de sua decomposição a água. Dessa maneira, foi utilizado o H_2O_2 em meio alcalino para a decomposição de mel e posterior determinação de F, Cl, Br e I. Foram avaliados parâmetros como temperatura de decomposição, volume de H_2O_2 , massa de amostra e volume de NH_4OH . Essas avaliações objetivaram a redução da concentração de C nos digeridos visando à minimização das possíveis interferências causadas na etapa de determinação. Após as otimizações dos parâmetros para a decomposição, foi avaliada a interferência de C na determinação de Cl, Br e I por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A determinação de F foi feita por eletrodo íon seletivo (ISE). Nas decomposições utilizando H_2O_2 em meio alcalino em SRC de alta pressão (199 bar), massas de 500 mg de mel foram decompostas com 8 mL de H_2O_2 , 550 μ L de NH_4OH , temperatura de 250 °C e tempo de decomposição de 30 min. Os digeridos obtidos pelo método proposto apresentaram concentrações inferiores a 200 mg L⁻¹ de C em solução o que não causa interferências na determinação de Cl, Br e I por ICP-MS. Concentrações inferiores a 200 mg L⁻¹ nos digeridos, totalizam cerca de 3% do C total presente no mel. A exatidão do método proposto foi avaliada utilizando ensaios de recuperação, decomposição de dois materiais de referência (NIST 8433 - *corn bran* e NIST 1568a - *rice flour*), e por comparação dos resultados com os obtidos por combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Os resultados obtidos através de todos os ensaios de exatidão não apresentaram diferença significativa quando comparados. Os limites de quantificação (LOQ) para cada elemento obtidos pelas técnicas utilizadas, F por ISE e Cl, Br e I por ICP-MS, foram de 8, 23, 0,07 e 0,01 μ g g⁻¹ para F, Cl, Br e I, respectivamente.

ABSTRACT

Title: Halogens determination in honey after decomposition with hydrogen peroxide using high pressure system

Author: Juliana Pinheiro de Souza

Advisor: Edson Irineu Müller

In this work the sample preparation method for honey decomposition using H_2O_2 in alkaline medium at high pressure system for further determination of F, Cl, Br and I was evaluated. In this way, some parameters such as temperature, volume of H_2O_2 , sample mass and volume of NH_4OH were evaluated to produce digests with the minimum concentration of residual carbon. After optimization of the parameters for decomposition, the C interference by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) were evaluated for further determination of Cl, Br and I. Fluorine was determined by ion selective electrode. Decomposition with H_2O_2 in alkaline medium using high pressure system was carried out using masses up to 500 mg of honey, 8 mL of H_2O_2 , 550 μL of NH_4OH and temperature of 250 °C. The final digests obtained by the proposed method have shown a concentration of C lower than 200 mg L^{-1} which represent approximately 3% of total C in honey. The accuracy of the proposed method was evaluated using recovery, two reference materials (NIST 8433 - corn bran reference material and NIST 1568a - rice flour reference material) and by comparison between values obtained using proposed method and those obtained by MIC. The obtained results by accuracy tests were considered. Limits of quantification (LOQ) obtained for halogens by the proposed method were 8 $\mu\text{g g}^{-1}$, 23 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0,07 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ for F by ISE, Cl, Br and I by ICP-MS, respectively.

1. INTRODUÇÃO

O mel é definido como um produto natural elaborado por abelhas a partir do néctar de flores, nectários extraflorais e exsudatos sacarínicos das plantas. Pode ser caracterizado por ser um produto complexo visto que já foram encontradas diversas substâncias em sua composição. Os principais componentes podem ser divididos em três grupos principais: açúcares, água e diversos. Os principais açúcares encontrados na composição do mel são os monossacarídeos glicose e frutose, totalizando aproximadamente 70% da composição média do mel.¹⁻³

O mel pode ser originado de diversas fontes florais o que pode acarretar em uma variação na concentração de alguns elementos. Devido a isso, o mel pode ser considerado um importante indicador ambiental, sendo possível relacionar a concentração de alguns elementos com a região de origem de cada mel.^{1,2,4,5}

A determinação de elementos como F, Cl, Br e I é de grande importância devido aos principais problemas desses elementos relacionados à saúde humana. Diante dessa importância de determinação, algumas técnicas analíticas estão disponíveis para a determinação de halogênios, tais como a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE) e a cromatografia de íons (IC), ambas para a determinação de F, e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para a determinação de Cl, Br e I. Entretanto, essas técnicas necessitam de uma etapa prévia de preparo de amostra para que os analitos estejam em solução para serem quantificados. Além disso, um método adequado deve proporcionar uma completa remoção/degradação da matriz, recuperação quantitativa dos analitos, permitir sua implantação como análise de rotina nos laboratórios e mínima utilização de reagentes.^{6,7}

¹ Camargo, R. C. R., *et al.*, Mel: Características e propriedades (2006).

² Agriculture Handbook Number 335 (1980).

³ ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, <http://www.anvisa.gov.br/> (2013).

⁴ Pisani, A., *et al.*, *Food Chemistry* 107 (2008) 1553-1560.

⁵ Pohl, P., *et al.*, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 117-128.

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁷ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras (2010).

Devido às características e particulares dos halogênios, a etapa de preparo de amostra envolve algumas dificuldades. Alguns métodos de preparo de amostra como a piroidrólise, a extração em meio alcalino e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) estão disponíveis para posterior determinação de F, Cl, Br e I. Entretanto, são escassos os trabalhos que relatam a utilização da decomposição por via úmida utilizando agentes oxidantes, devido ao risco de perda por volatilização de F, Cl, Br e I.⁷

Em consequência disso, este trabalho tem por objetivo propor um método de decomposição de amostras de mel com H₂O₂ em meio alcalino utilizando sistema de câmara de reação única (MAD-SRC) de alta pressão para posterior determinação de F, Cl, Br e I. Foram avaliados parâmetros que influenciam a decomposição do mel por esse método, tais como temperatura de decomposição, volume de H₂O₂, massa de amostra e volume de NH₄OH. Após as otimizações do método em função da concentração de C nos digeridos finais, as amostras de mel foram submetidas à decomposição com H₂O₂ em meio alcalino utilizando MAD-SRC. Além disso, foi avaliada a interferência de C na determinação de Cl, Br e I por ICP-MS. Algumas determinações foram feitas utilizando a cromatografia de íons para comparação com os resultados obtidos de F por ISE.

Para avaliação da exatidão do método proposto, foram realizados ensaios de recuperação, decomposição de materiais de referência (RMs) e comparação de resultados obtidos pela decomposição por MIC.

⁷ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras (2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão apresentadas as características químicas e propriedades do mel. Posteriormente serão abordadas as técnicas utilizadas na determinação de F, Cl, Br e I, bem como os métodos de preparo de amostra comumente utilizados. Finalmente, serão abordadas também as características da utilização de H₂O₂ em meio alcalino para decomposição de mel e posterior determinação de halogênios.

2.1 Mel: Propriedades e características

Há muitos anos o mel é utilizado pelo homem como alimento não só por suas características adoçantes, mas também devido a suas propriedades terapêuticas. Além disso, sua rápida absorção pelo organismo é resultante da composição química do mel, constituído, principalmente por açúcares.¹

O mel é caracterizado por ser uma substância viscosa, aromática e açucarada, definido como um produto natural elaborado por abelhas a partir do néctar de flores, nectários extraflorais e exsudatos sacarínicos das plantas. É um produto biológico considerado de grande complexidade visto que foram encontradas inúmeras substâncias em sua composição. De uma forma geral, os três componentes principais são os açúcares, água e outros. A composição média do mel está mostrada na Tabela 1.^{1,2} A concentração de alguns elementos varia devido às inúmeras fontes florais das quais o mel se originou. Assim, ele se tornou um importante indicador ambiental, permitindo a descoberta da região da qual se originou, apenas correlacionando a concentração de determinados elementos às características de algumas áreas.^{1,3-5,8}

¹ Camargo, R. C. R., *et al.*, Mel: Características e propriedades (2006).

² Agriculture Handbook Number 335 (1980).

³ ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, <http://www.anvisa.gov.br/> (2013).

⁴ Pisani, A., *et al.*, *Food Chemistry* 107 (2008) 1553-1560.

⁵ Pohl, P., *et al.*, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 117-128.

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁸ Tuzen, M., *et al.*, *Food Chemistry* 103 (2007) 325-330.

Tabela 1. Composição química do mel.^{1,2}

Substância	Concentração média (% m/m)
Frutose	38,4
Glicose	30,3
Água	17,2
Outros açúcares (sacarose, maltose, etc)	10,0
Ácidos orgânicos	0,5
Minerais	0,2
Proteínas	< 0,01
Vitaminas	< 0,01
Enzimas	Não informado

Os principais componentes do mel, responsáveis por aproximadamente 70% de sua composição, são os açúcares, sendo na sua maioria os monossacarídeos frutose e glicose. Alguns dissacarídeos como a sacarose e a maltose estão presentes em menores concentrações. Os monossacarídeos são aldeídos e cetonas que contêm um ou mais grupos hidroxila em sua estrutura. No caso da glicose e da frutose, são monossacarídeos que contêm seis átomos de carbono e cinco grupos hidroxila. O monossacarídeo é considerado uma aldose (como é o caso da glicose) se o grupo carbonila está em uma das extremidades da cadeia carbônica. Por outro lado, se o grupo carbonila estiver em qualquer outra posição, o monossacarídeo é uma cetose, como é o caso da frutose.^{1,9}

Algumas propriedades físicas como viscosidade, densidade, higroscopicidade, cristalização e valores calóricos são dependentes da concentração dos diferentes açúcares no mel.¹

¹ Camargo, R. C. R., *et al.*, Mel: Características e propriedades (2006).

² Agriculture Handbook Number 335 (1980).

⁹ Nelson, D. L., Cox, M. M., Princípios de bioquímica de Lehninger (2011).

2.2 Halogênios: Aspectos gerais

Em comparação aos metais que possuem rotas biológicas já bem definidas, os halogênios ainda possuem lacunas, como sua toxicidade e seu mecanismo de ação no organismo humano.⁶

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO), os valores diários para ingestão de F variam de 0,46 a 5,4 mg dia⁻¹, dependendo da idade do indivíduo. O excesso de F no organismo humano pode acarretar na formação de HF devido às condições ácidas do estômago. O coeficiente de permeabilidade do HF é similar ao da água nas bicamadas lipídicas. Quando absorvido, o F é facilmente distribuído e pode ser acumulado principalmente nas áreas ricas em Ca, como dentes e ossos. Nesses casos, a exposição excessiva pode levar ao desenvolvimento da fluorose. Por outro lado, quantidades adequadas desse elemento auxiliam em uma boa saúde oral.^{6,10,11}

Devido a seus efeitos benéficos e/ou tóxicos, o Cl e o Br também têm sido estudados nos sistemas biológicos, sendo que seu excesso ou deficiência estão relacionados com diversos e graves efeitos adversos à saúde humana. O íon cloreto geralmente está presente em elevadas concentrações na maioria dos alimentos, sendo que, quando associado ao Na, o excesso desse sal poderá causar problemas com a pressão arterial. Os valores recomendados para a ingestão diária de Cl estão compreendidos entre 125 e 500 mg dia⁻¹, segundo a WHO.^{6,11,12}

Na literatura, há poucas informações referentes à função fisiológica e ao mecanismo de ação do Br. Alguns estudos indicam que ele interfere no transporte de I até a glândula da tireoide prejudicando, a produção do hormônio.⁶

No caso do I, a presença desse elemento no organismo humano está relacionada com a funcionalidade da glândula tireoide. Em elevadas concentrações, pode causar o hipertireoidismo, que é o excesso de produção de hormônio pela glândula tireoide. Por outro lado, em baixas concentrações podem acarretar problemas no crescimento e desenvolvimento humano além de causar o hipotireoidismo, que é caracterizado pela deficiência na produção do hormônio da

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

¹⁰ Prystupa, J., *Toxicology Mechanisms and Methods* 2 (2011) 103-170.

¹¹ World Health Organization, *A guide for programme managers* (2007).

¹² Joint FAO/WHO Expert consultation on human vitamin and mineral requirements in human nutrition (2004).

tireoide. O excesso de I é um dos principais problemas atuais, visto que esse é adicionado no sal de cozinha que é regularmente utilizado nas principais refeições, podendo aumentar os níveis de ingestão diária. Dessa forma, os valores diários recomendados estão entre 90 e 250 $\mu\text{g dia}^{-1}$ segundo a WHO.^{6,11,13}

2.3 Técnicas analíticas de determinação de halogênios

As principais técnicas analíticas utilizadas na determinação de halogênios são as técnicas de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE), cromatografia de íons (IC) e análise por ativação neutrônica (NAA), cujas principais características serão discutidas nas próximas seções.

2.3.1 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado tem sido amplamente utilizada para a determinação de metais e não metais em uma grande variedade de amostras.^{14,15} Em menor escala, tem sido aplicada para a determinação de halogênios devido aos potenciais de ionização relativamente elevados desses elementos que prejudicam a sensibilidade da técnica. O flúor, por exemplo, devido ao seu elevado potencial de ionização, é muito pouco ionizado em plasmas de Ar, que praticamente inviabilizam a sua determinação por ICP-MS. Na Tabela 2 estão mostrados os valores dos potenciais de ionização dos halogênios, assim como a razão massa carga (m/z) e a abundância isotópica desses elementos.¹³⁻¹⁷

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

¹¹ World Health Organization, *A guide for programme managers* (2007).

¹³ Costa, V. C., *et al.*; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

¹⁴ Mesko, M. F., *et al.*, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

¹⁵ Pereira, J. S. F., *et al.*, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

¹⁶ Muller, A. L. H., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

¹⁷ Bu, X., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 1443-1451.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos halogênios.^{6,18}

Halogênio	Isótopo (<i>m/z</i>)	Abundância (%)	1º potencial de ionização (eV)
F	19	100	17,42
Cl	35	75,76	12,97
	37	24,24	
Br	79	50,69	11,81
	81	49,31	
I	127	100	10,45

Outro problema para a determinação de Cl, Br e I por ICP-MS está relacionado com o efeito de memória, principalmente quando utilizada a nebulização pneumática. Essa limitação pode ser minimizada com a utilização de soluções alcalinas diluídas, como o NH₄OH 50 mmol L⁻¹.⁶ Além disso, cabe salientar que a baixa razão *m/z* para o Cl, pode possibilitar a formação de interferências isobáricas e poliatômicas em ICP-MS que prejudicam a exatidão na determinação desse elemento. Neste sentido, para minimizar as interferências isobáricas, a determinação de Cl é feita utilizando o isótopo ³⁵Cl. Adicionalmente, a concentração de C nos digeridos também afeta a exatidão dos resultados, principalmente na determinação de I, uma vez que o C dos digeridos afeta a ionização de alguns elementos no plasma.^{6,15}

Apesar dos problemas descritos acima, a utilização da técnica de ICP-MS fornece limites de detecção (LODs) adequados (da ordem de ng L⁻¹), ampla faixa linear e capacidade de determinação multielementar (Cl, Br e I).^{6,16}

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

¹⁵ Pereira, J. S. F., *et al.*, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

¹⁶ Muller, A. L. H., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

¹⁸ Montaser, A., *Inductively coupled plasma spectrometry* (1998).

2.3.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado tem sido utilizada para a determinação de Cl, Br e I, porém essa é suscetível a interferências devido a absorção da luz principalmente pelo oxigênio e vapor de água nos comprimentos de onda próximos as linhas de emissão dos halogênios. Para minimizar essas interferências devem ser utilizados espectrômetros que apresentem a parte óptica purgada ou selada para expulsar os concomitantes que absorvem a radiação durante a análise de halogênios por ICP-OES. As principais linhas de emissão atômicas dos halogênios são 134,720, 154,070 e 178,270 nm para Cl, Br e I, respectivamente. A determinação de F não pode ser feita, mesmo utilizando espectrômetros com óptica isenta de interferentes devido ao baixo comprimento de linha de emissão. A principal desvantagem da ICP-OES frente a ICP-MS é a menor sensibilidade da técnica, gerando piores LODs, especialmente para Br e I.⁶

2.3.3 Potenciometria

A potenciometria utilizando ISE é amplamente aplicada para a determinação de halogênios, em especial para F e Cl.^{19,20} Também tem sido aplicada para a determinação de Br e I em diversos materiais, porém com menor sensibilidade quando comparada com F e Cl.²¹

O ISE difere fundamentalmente dos eletrodos metálicos, pois a utilização de ISE não envolve um processo redox. A determinação por ISE está baseada no potencial de junção que se estabelece na membrana seletiva aos íons dos halogênios. Na determinação de F por ISE, é utilizado um eletrodo de membrana cristalina de LaF₃ dopado com európio, onde ocorre uma diferença de potencial na superfície dessa membrana. A magnitude da diferença de potencial depende da concentração desses íons em solução.^{21,22}

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

¹⁹ Dressler, V. L., *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 466 (2002) 117-123.

²⁰ Krishna, M. V. B., *et al.*, *Analytical Methods* 4 (2012) 1565-1572.

²¹ Holler, F. J., *et al.*, *Princípios de Análise Instrumental* (2009).

²² Harris, D. C., *Análise Química Quantitativa* (2008).

Essa técnica apresenta como desvantagem os elevados LODs para os halogênios quando comparado com as demais técnicas, o que dificulta a determinação quando esses elementos estão em baixas concentrações. Além disso, é necessário o uso de soluções de ajuste da força iônica, uma vez que a resposta do eletrodo é diretamente proporcional à atividade dos íons. Além disso, o uso da solução de ajuste da força iônica também minimiza as interferências causadas por outros íons. Por exemplo, na determinação de F, pode ser utilizado um tampão de ajuste de força iônica total (TISAB), o qual é regulador da força iônica do meio, tampão de pH e complexante de alguns metais. Essa técnica tem por vantagem o baixo custo de instrumentação, sendo então acessível para análise de rotina.^{21,22}

2.3.4 Cromatografia de íons

A IC permite a separação, identificação e quantificação dos halogênios. A IC está baseada na separação através da interação dos halogênios na forma de íons com a fase móvel e estacionária através do mecanismo de troca iônica. O principal detector utilizado na determinação de halogênios é o condutométrico que permite análise multielementar do halogênio com os melhores LODs quando comparada com as demais técnicas analíticas.^{6,23}

2.3.5 Análise por ativação neutrônica

A técnica NAA consiste na incidência de uma fonte de nêutrons que irá ocasionar reações nucleares com produção de radioisótopos quantificados por um detector de raios- γ , ou seja, consiste na medida da radiação produzida pelas amostras quando elas são irradiadas com nêutrons. A NAA tem por vantagem ser uma técnica absoluta, uma vez que não é necessária a calibração. A determinação da concentração do analito está relacionada com a probabilidade de reação e o fluxo de nêutrons incidentes, o que muitas vezes pode variar de acordo com a energia desses nêutrons, sendo um dos motivos que a análise absoluta não é amplamente

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

²¹ Holler, F. J., *et al.*, *Princípios de Análise Instrumental* (2009).

²² Harris, D. C., *Análise Química Quantitativa* (2008).

²³ Wang, J., *Analytical Electrochemistry* (2000).

empregada. Devido a isso, faz-se necessária uma comparação com materiais de referência certificados (CRMs).^{6,21}

A NAA pode ser considerada como uma técnica adequada para a determinação do Cl, Br e I, fornecendo LODs adequados para diferentes amostras biológicas. Em comparação com outras técnicas, a maior desvantagem é a instrumentação de uso restrito, uma vez que ela requer o uso de um reator nuclear como fonte de nêutrons.^{6,21}

2.4 Métodos de preparo de amostra para posterior determinação de halogênios

Dentre as técnicas analíticas disponíveis para a determinação dos halogênios, a grande maioria necessita de uma etapa prévia de preparo de amostra para que os analitos estejam em solução.

Devido à complexidade de algumas matrizes e as particularidades químicas dos halogênios, a etapa do preparo de amostra envolve algumas dificuldades. Um procedimento adequado deve permitir a completa remoção/degradação da matriz, recuperação quantitativa dos analitos, custo acessível e deve ser adequada para implantação como análise de rotina nos laboratórios. Além disso, a quantidade dos reagentes utilizados durante o preparo de amostra deve ser mínima, e esses devem ter elevada pureza quando é necessária a posterior determinação em nível traço.^{6,7}

Dentre os métodos de preparo de amostra utilizados para a posterior determinação de F, Cl, Br e I, destacam-se a piroidrólise, os métodos de extração em meio alcalino e os métodos de combustão. Cabe salientar que a piroidrólise é um método empregado comumente para amostras inorgânicas, enquanto que os demais métodos são particularmente empregados para amostras orgânicas. Por fim, são escassos os relatos na literatura que propõem a utilização da decomposição por via úmida com a utilização de agentes oxidantes, uma vez que há o risco da perda de halogênios na forma de espécies voláteis geradas durante a etapa de oxidação da matriz da amostra.^{7,24,25}

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁷ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras* (2010).

²¹ Holler, F. J., *et al.*, *Princípios de Análise Instrumental* (2009).

²⁴ Flores, E. M. M., *Microwave – assisted sample preparation for Trace Element Determination* (2014).

²⁵ Arruda, M. A. Z., *Trends in Sample Preparation* (2006).

2.4.1 Piroidrólise

Esse método de preparo de amostra é aplicado, geralmente para materiais inorgânicos. A piroidrólise consiste da hidrólise de alguns elementos sob elevadas temperaturas, da ordem de 1000 °C, e na presença de vapor d'água. Durante a reação, os analitos são volatilizados da matriz e, no caso dos halogênios, são convertidos em seus respectivos ácidos voláteis. Na presença de vapor d'água, estes ácidos são hidrolisados e carregados por um gás até um condensador, onde posteriormente os analitos serão absorvidos em uma solução adequada.^{7,24}

Alguns trabalhos tem relatado o uso da piroidrólise como método de preparo de amostra para posterior determinação de F, Cl, Br e I em amostras geológicas.²⁶ A temperatura de reação foi de 1100 °C e o gás utilizado para carregar o vapor contendo os analitos até o condensador foi o oxigênio. Os halogênios foram separados da matriz e coletados em uma única solução absorvedora adequada para posterior determinação por ICP-MS e IC.²⁶

2.4.2 Extração em meio alcalino

Esse método consiste na extração dos halogênios utilizando soluções alcalinas como, por exemplo, soluções de amônia, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e hidróxido de sódio. A extração em meio alcalino possibilita a utilização de temperaturas menores e grandes quantidades de massa de amostra, o que possibilita a obtenção de melhores limites de detecção (LOD). Entretanto, uma importante desvantagem diz respeito a possíveis interferências na etapa de determinação devido aos altos teores de carbono presente na solução, pois esse método não possibilita total eliminação da matriz.^{6,27}

⁶ Mello, P. A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁷ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras* (2010).

²¹ Holler, F. J., *et al.*, *Princípios de Análise Instrumental* (2009).

²⁴ Flores, E. M. M., *Microwave – assisted sample preparation for Trace Element Determination* (2014).

²⁶ Schnetger, B., Muramatsu, Y., *Analyst* 121 (1996) 1627-1631.

²⁷ Romarís-Hortas, V., *et al.*, *Talanta* 70 (2009) 947-952.

Alguns trabalhos propõem o uso da extração em meio alcalino com aquecimento por radiação micro-ondas para a posterior determinação de Br e I por ICP-MS em amostras de algas comestíveis.²⁵ Romarís-Hortas *et al* avaliaram alguns parâmetros como volume de TMAH, temperatura e tempo de aquecimento por radiação micro-ondas. Os autores observaram que a extração pode ser aplicada para diversas amostras de algas secas, comestíveis e enlatadas. Com o objetivo de avaliar a exatidão do método proposto, os autores utilizaram um CRM de matriz biológica para a extração nas condições otimizadas e observaram que não houve diferenças significativas entre os valores informados no CRM e os valores obtidos.²⁷

2.4.3 Combustão

Os métodos de combustão são adequados para a decomposição de diversas matrizes orgânicas. No procedimento da combustão, o oxigênio atua como único agente oxidante, convertendo a matéria orgânica em CO₂ e H₂O. Os gases liberados na queima são absorvidos em uma solução adequada, na qual os analitos ficam retidos. A escolha dessa solução é dependente das características dos analitos e, para a determinação dos halogênios, são utilizadas soluções alcalinas com o objetivo de minimizar o risco de perdas por volatilização.^{7,24}

Inicialmente, a combustão era realizada em sistemas abertos, como a combustão por via seca em forno tipo mufla. Contudo, para minimizar possíveis perdas de analitos voláteis, começaram a ser utilizados os métodos convencionais de combustão, como a bomba de combustão e o frasco de Schöniger.^{7,24,25}

Um dos métodos de preparo de amostra mais empregados atualmente para posterior determinação de halogênios é a combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Dentre as principais vantagens da MIC estão os baixos valores de brancos, elevada frequência analítica, baixos teores de C no digerido, baixo consumo de reagentes, além de permitir uma etapa de refluxo após a combustão, a qual não é disponível nos métodos que utilizam a bomba de combustão e/ou o frasco de

⁷ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras (2010).

²⁴ Flores, E. M. M., Microwave – assisted sample preparation for Trace Element Determination (2014).

²⁵ Arruda, M. A. Z., Trends in Sample Preparation (2006).

²⁷ Romarís-Hortas, V., *et al.*, *Talanta* 70 (2009) 947-952.

Schöniger. A MIC utiliza a ação direta do oxigênio como oxidante da matéria orgânica, onde a etapa de ignição é feita através da radiação micro-ondas. Nesse método, a amostra é prensada na forma de comprimido, posicionada sobre a base de um suporte de quartzo sobre um disco de papel filtro, o qual é umedecido com um agente de ignição.^{7,24}

Para a determinação de halogênios, após a combustão, os analitos são absorvidos em soluções alcalinas, como por exemplo, o NH_4OH e o NH_4CO_3 . Além disso, uma etapa de refluxo pode ser aplicada para garantir recuperação quantitativa desses elementos.^{7,28-32}

2.4.4 Decomposição por via úmida

Esse método de preparo de amostra consiste no aquecimento da amostra na presença de um ácido oxidante, uma mistura de ácidos oxidantes ou até mesmo mistura de um ácido oxidante com H_2O_2 . Se o ácido for suficientemente oxidante e o aquecimento for feito sob elevadas temperaturas, é possível oxidar completamente a maior parte das amostras orgânicas, deixando os analitos na solução ácida em formas inorgânicas simples. Assim, torna-se possível a introdução dos digeridos em diversos equipamentos de análise que, na maioria dos casos, requer que a amostra esteja na forma de solução. O método mais antigo e mais utilizado para a decomposição de amostras orgânicas de mais fácil decomposição pode ser feito sob pressão atmosférica, entretanto, esse pode ter como limitação a temperatura de ebulição do ácido. Por outro lado, em sistemas fechados, que possibilitam atingir elevadas pressões, a temperatura de ebulição do ácido será conseqüentemente aumentada, proporcionando uma maior eficiência na oxidação das matrizes orgânicas.^{7,24,25}

⁷ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras (2010).

²⁴ Flores, E. M. M., Microwave – assisted sample preparation for Trace Element Determination (2014).

²⁵ Arruda, M. A. Z., Trends in Sample Preparation (2006).

²⁸ Picoloto, R. S., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

²⁹ Mesko, M. F., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.

³⁰ Flores, E. M. M., *et al.*, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.

³¹ Moraes, D. P., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 563-570.

³² Flores, E. M. M., *et al.*, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 374-380.

Os principais ácidos empregados na decomposição por via úmida de amostras orgânicas são o HNO_3 , H_2SO_4 e HClO_4 . Algumas amostras são difíceis de serem decompostas com um único ácido, por esse motivo, uma combinação desses ácidos é frequentemente empregada.^{7,25}

Nas decomposições com HNO_3 cerca de 2 a 50% do teor de carbono original permanece como material não decomposto, pois esse ácido não é suficientemente oxidante para degradar completamente alguns componentes orgânicos. Se a oxidação do carbono não for total, a determinação do analito poderá sofrer interferência em menor ou maior grau pelos produtos da decomposição incompleta.^{7,33}

A decomposição por via úmida em sistema fechado é muitas vezes utilizada para a posterior determinação de elementos em níveis traço (na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$). Esse método em sistemas fechados apresentam diversas vantagens na decomposição de amostras orgânicas, onde podem ser destacadas a diminuição do risco de contaminação e a redução de perdas por volatilização. Entretanto, para alguns elementos como os halogênios, o meio ácido pode levar a formação de seus respectivos ácidos voláteis (HF , HCl , HBr e HI) podendo acarretar em perdas por volatilização. Além dos halogênios, As, B, Hg, Se e Sb, também podem ser perdidos por volatilização dependendo do procedimento utilizado. Desta forma, a decomposição de amostras orgânicas com ácidos concentrados não é recomendada para a determinação de halogênios.^{7,34}

2.4.4.1 Decomposição utilizando H_2O_2

O H_2O_2 possui potencial padrão de redução de 1,77 V e é comumente utilizado combinado com outros ácidos, como o HNO_3 , com a finalidade de melhorar a eficiência de decomposição de amostras orgânicas.³⁵ As aplicações utilizando somente H_2O_2 para a oxidação de amostras orgânicas são escassas na literatura.

⁷ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras (2010).

²⁵ Arruda, M. A. Z., Trends in Sample Preparation (2006).

³³ Wurfels, M., et al., *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 1-16.

³⁴ Di Narda, F., et al., *Analytica Chimica Acta* 436 (2001) 245-252.

³⁵ Mattos, I. L., et al., *Quimica Nova* 26 (2003) 373-380.

Dentre as vantagens da utilização do H₂O₂, pode-se salientar que a água é um dos únicos produtos de decomposição, como mostrado na Equação 1.^{7,35,36}



A primeira aplicação reportada na literatura usando somente H₂O₂ foi proposta por Denbsky³⁷ na digestão de amostras orgânicas. Massas de até 15 g de diferentes matrizes orgânicas (leite, carne, etc) foram decompostas com 150 mL de H₂O₂ na concentração de 30% (m/m). De acordo com o autor, a taxa de reação das substâncias orgânicas com H₂O₂ aumenta sob elevadas temperaturas (até 370 °C) e pressão, sendo necessária a construção de frascos que suportem estas condições extremas. A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação utilizando isótopos radioativos (⁸⁵Sr, ¹⁰⁶Ru, ¹³¹I e ¹³⁷Cs) e recuperações superiores a 96% foram obtidas.³⁷

O mesmo autor anos mais tarde propôs a decomposição de amostras ricas em gordura (azeite de oliva, manteiga de cacau, etc), onde temperaturas de até 450 °C foram necessárias para garantir a eficiência da decomposição.³⁸

Matusiewicz e Barnes³⁹ propuseram a decomposição de amostras de madeira com a utilização de H₂O₂ como agente oxidante para posterior determinação de 21 elementos. Para a decomposição foi empregado H₂O₂ 50%, e as decomposições foram feitas em frascos de PTFE, os quais foram aquecidos a 125 °C em um forno durante 4 h. Alcock⁴⁰ propôs a decomposição de fígado bovino utilizando H₂O₂ 30% em frascos de polietileno aquecidos em um forno a 75 °C para posterior determinação de Zn, Se, As, Cu e Mn.

Alguns trabalhos na literatura relatam que o H₂O₂ pode promover a oxidação de carboidratos em meio alcalino. Jin et al.⁴¹ propuseram a conversão hidrotérmica de carboidratos em ácido fórmico em temperaturas de até 250 °C. Nesse trabalho,

⁷ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras (2010).

³⁵ Mattos, I. L., et al., *Quimica Nova* 26 (2003) 373-380.

³⁶ Chang, R., Goldsby, K. A., *Química* (2013).

³⁷ Denbsky G., *Zeitschrift für Analytische Chemie* 267 (1973) 350-355.

³⁸ Denbsky G., *Zeitschrift für Analytische Chemie* 277 (1975) 375-375.

³⁹ Matusiewicz, H., Barnes, R. M., *Analytical Chemistry* 57 (1985) 406-411.

⁴⁰ Alcock, N. W., *Biological Trace Element Research* 13 (1987) 363-370.

⁴¹ Jin, F., et al., *Green Chemistry* 10 (2008) 612-615.

moléculas de glicose foram convertidas a ácido fórmico através da oxidação hidrotérmica utilizando H_2O_2 na presença e na ausência de bases alcalinas. Foi observado que na ausência de bases alcalinas obtinha-se um baixo rendimento na produção de ácido fórmico, provavelmente decorrente da total oxidação, descarboxilação ou desidratação deste composto. Através da análise dos gases formados, a hipótese da descarboxilação e desidratação do ácido fórmico foram eliminadas, então esse composto foi totalmente oxidado. Posteriormente, foram feitos alguns estudos onde foi observado que com a adição de uma base alcalina, a decomposição do ácido fórmico era minimizada e o rendimento da formação desse ácido era aumentado. Então, foi apresentado um rendimento de 75% na reação de oxidação dos carboidratos com H_2O_2 na presença de bases alcalinas a uma temperatura de 250 °C.⁴¹

Contudo, a utilização dessas bases alcalinas pode acarretar problemas na etapa de determinação, devido principalmente a elementos facilmente ionizáveis, como Na e K, que podem causar interferências não espectrais, suprimindo o sinal de alguns analitos. A supressão do sinal é causada principalmente para analitos que possuam elevados potenciais de ionização, que é o caso dos halogênios. Elementos como o Na podem promover um aumento da densidade eletrônica no plasma, ocasionando uma diminuição do grau de ionização dos analitos e, conseqüentemente, uma resposta errônea da concentração dos elementos.⁴²⁻⁴⁴ Desta forma, alguns trabalhos propõem a utilização de NH_4OH para garantir o pH alcalino durante a oxidação dos carboidratos.

Neste sentido, Pullanikat⁴⁵ investigou a fundo as reações entre carboidratos redutores e H_2O_2 na presença de NH_4OH . Nesse trabalho é apresentado o mecanismo que consiste na adição nucleofílica do grupamento HOO^- na carbonila do aldeído ou da cetona, deslocando a carga para o oxigênio. O NH_4^+ atua como contra íon. Após, a OH^- do NH_4OH desprotona o álcool vizinho que irá formar um grupamento carbonila liberando o HCOONH_4 . O mecanismo é apresentado na Figura 1.⁴⁵

⁴¹ Jin, F., *et al.*, *Green Chemistry* 10 (2008) 612-615.

⁴² Olivares, J. A., Houk, R. S., *Analytical Chemistry* 58 (1986) 20-25.

⁴³ Rodushkin, I., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 159-166.

⁴⁴ Agatemor, C., Beauchemin, D., *Analytica Chimica Acta* 706 (2011) 66-83.

⁴⁵ Pullanikat, P., *et al.*, *Tetrahedron Letters* 51 (2010) 6192-6194.

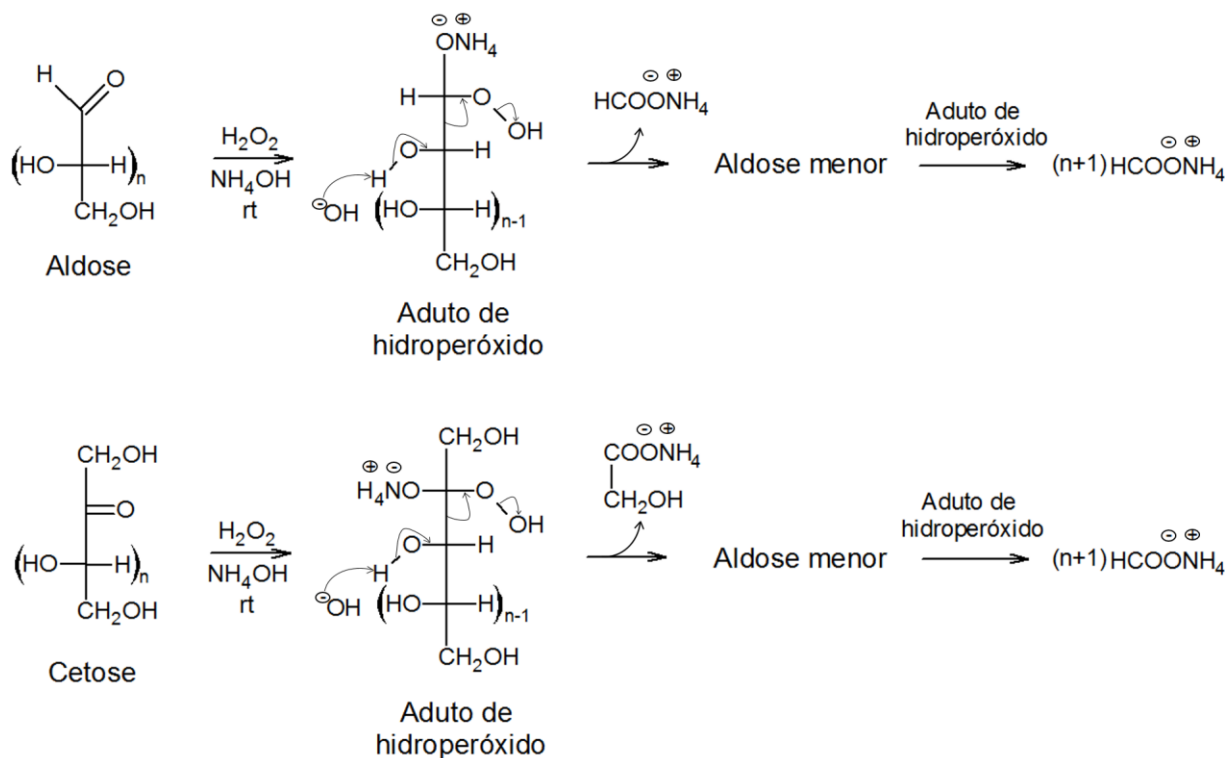


Figura 1. Possível mecanismo para a degradação oxidativa de aldoses e cetoses utilizando H_2O_2 e NH_4OH .

Na Tabela 3 são mostrados os rendimentos das conversões à formiato de diferentes carboidratos redutores na presença de H_2O_2 e NH_4OH com temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h.⁴⁵ Os dissacarídeos redutores, como a α -D-lactose, a maltose e D-(+)-celobiose, foram completamente convertidos à formiato de amônio após 24 h de reação, enquanto que a sacarose (carboidrato não redutor), não reagiu nas condições propostas pelo autor. Dessa maneira, a oxidação de carboidratos redutores torna-se viável para a conversão à formiato de amônio na presença de H_2O_2 e NH_4OH .

Neste sentido, provavelmente torna-se possível a decomposição de matrizes ricas em carboidratos redutores como o mel na presença de H_2O_2 e NH_4OH . Além disso, o pH alcalino assegurado pela a presença de NH_4OH pode minimizar as perdas de halogênios durante a decomposição de amostras orgânicas.

⁴⁵ Pullanikat, P., et al., *Tetrahedron Letters* 51 (2010) 6192-6194.

Tabela 3. Rendimento da degradação oxidativa de carboidratos à formiato de amônio na presença de H₂O₂ e NH₄OH.⁴⁵

Carboidratos	Conversão à formiato (%)
D-Eritrose	32
D-Xilose	92
D-(-)-Ribose	96
D-Glicose	99
D-Galactose	93
Dihidroxiacetona	99
D-Tagatose	83
D-Frutose	46
Sacarose	00
α-D-Lactose	99
Maltose	99
D-(+)-Celobiose	70
Rafinose	00
Melzitose	26

⁴⁵ Pullanikat, P., et al., *Tetrahedron Letters* 51 (2010) 6192-6194.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho, assim como os reagentes e as amostras. Serão apresentados os procedimentos realizados na avaliação de alguns parâmetros na decomposição de mel com H_2O_2 em meio alcalino utilizando sistema de câmara de reação única (SRC) de alta pressão e, posteriormente será descrito o método da MIC, a qual foi utilizada como método comparativo.

3.1 Instrumentação

Neste trabalho foi avaliada a decomposição de mel utilizando H_2O_2 em meio alcalino em sistema de câmara de reação única (SRC) de alta pressão para posterior determinação de F, Cl, Br e I. O método de preparo de amostra foi realizado em sistema Ultrawave e como método comparativo foi feita a MIC em sistema Multiwave.

As decomposições em sistema de alta temperatura e pressão foram feitas em um forno de micro-ondas (modelo Ultrawave[®] Milestone, Sorisole, Itália) equipado com uma câmara única de reação de aço inoxidável, revestida com uma câmara de politetrafluoretileno (PTFE) com capacidade de 1 L, que possibilita utilizar um rotor com capacidade máxima para 5 frascos de quartzo (capacidade individual de 40 mL). O sistema possui temperatura, pressão e potência máximas de trabalho de 300 °C, 199 bar e 1500 W, respectivamente. O resfriamento do sistema é feito através de passagem forçada de água.

O método da MIC em sistema fechado foi feito utilizando um forno de micro-ondas (modelo Multiwave 3000[®], *Microwave Sample Preparation System*, Anton Paar, Graz, Áustria), equipado com um rotor com capacidade máxima de 8 frascos de quartzo com capacidade individual de 80 mL. O sistema possui temperatura, pressão e potência máximas de trabalho de 280 °C, 80 bar e 1400 W, respectivamente. Um suporte de quartzo foi utilizado para a decomposição das amostras.

A pesagem das amostras foi feita em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Filipinas) com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

Após as decomposições, as soluções foram transferidas para frascos volumétricos e diluídas a 25 mL com água. A eficiência de decomposição foi avaliada através da determinação da concentração de carbono nos digeridos utilizando um equipamento de ICP-OES (modelo Optima 4300 DV, Perkin Elmer, Shelton, Estados Unidos) com configuração axial, câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e nebulizador pneumático do tipo GemCone.

Para a determinação de Cl, Br e I foi utilizado um equipamento de ICP-MS (modelo ELAN[®] DRC II, Perkin Elmer-SCIEX, Waltham, Estados Unidos) equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard tipo A, Golden, Estados Unidos) e câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Austrália). As

determinações utilizando ICP-OES e ICP-MS foram feitas utilizando argônio de alta pureza (99,996%, White Martins, São Paulo, Brasil).

A determinação de F foi feita utilizando um potenciômetro digital (modelo 781 pH/Ion Meter, Metrohm, Suíça) equipado com um ISE para fluoreto com membrana de fluoreto de lantânio dopado com európio (modelo 6.0502.150, Metrohm, Suíça) e com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (modelo 6.0726.100, Metrohm, Suíça). A faixa de calibração foi de 0,15 a 10 mg L⁻¹ de F. As soluções de referência e os digeridos foram apropriadamente diluídos com um tampão de ajuste da força iônica total (TISAB), conforme recomenda o fabricante.

Além da determinação por ISE, F foi também determinado por cromatografia de íons utilizando um cromatógrafo equipado com um sistema de supressão química (modelo 850 Professional IC, Metrohm, Suíça), uma pré-coluna (modelo Metrosep A supp 4/5 Guard, 5 X 4 mm de diâmetro, 5 µm de diâmetro de partícula, Metrohm), uma coluna de troca iônica com grupos de amônio quarternário suportados em poli(álcool vinílico) com 250 x 4 mm de d. i. e 5 µm de diâmetro de partícula (modelo Metrosep A Supp 5, Metrohm) e um detector de condutividade. A fase móvel utilizada foi uma solução de Na₂CO₃ 3,2 mmol L⁻¹ e NaHCO₃ 1 mmol L⁻¹ com uma vazão de 0,7 mL min⁻¹, sendo usada uma alça de amostragem de 100 µL.

Na Tabela 4, estão mostradas as condições operacionais utilizadas para a determinação de Cl, Br, I e concentração de carbono por ICP-MS e ICP-OES.

Tabela 4. Condições operacionais para a determinação da concentração de C por ICP-OES e Cl, Br e I por ICP-MS.

Parâmetros	ICP-OES	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400	1300
Vazão do gás principal (L min ⁻¹)	15,0	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,20	1,20
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70	1,15
Câmara de nebulização	Ciclônica	Ciclônica
Nebulizador	GemCone	Concêntrico
Vista	Axial	-
Analitos	Linha de emissão*, nm	Isótopos
C	193,030 (I)	-
Cl	-	³⁵ Cl
Br	-	⁷⁹ Br
I	-	¹²⁷ I

*(I) linha de emissão atômica.

3.2 Reagentes e Amostras

A água utilizada passou por um processo de destilação e deionização em uma coluna de troca iônica (condutividade máxima de 0,6 $\mu\text{S cm}^{-1}$) e, posteriormente, purificada em um sistema Milli-Q (modelo Milli-Q[®], Millipore, Billerica, Estados Unidos) com resistividade mínima final de 18,2 M Ω cm. Para a decomposição das amostras foi utilizado H₂O₂ 50% (m/m) (Vetec, Brasil) e solução de amônia 14,8 mol L⁻¹. Para a decomposição por MIC, foi utilizado como iniciador de combustão uma solução de 6 mol L⁻¹ de NH₄NO₃ (P.A., Merck), preparado a partir da dissolução do respectivo sal em água ultrapura. Como solução absorvedora, foi utilizada uma solução de NH₄OH 50 mmol L⁻¹ (Merck). Foi utilizada celulose

microcristalina misturada à amostra para o método de MIC, a qual foi utilizada como auxiliar de combustão.¹³

Para a determinação da concentração de carbono por ICP-OES foi utilizada uma solução de estoque de C preparada em HNO₃ 5%, a partir da dissolução de massa adequada de ácido cítrico monohidratado (Vetec, Brasil). Para a determinação de F por ISE e IC, e Cl, Br e I por ICP-MS, foram utilizadas soluções de referência monoelementares preparadas a partir dos sais NaF, NaCl, KBr e KI (Merck) dissolvidos em água.

Foram utilizadas quatro amostras de mel de diferentes regiões dos estados de RS e SC. As amostras A, B, C e D foram obtidas nas regiões de Santa Maria - RS, São Bonifácio - SC, Cerro Largo - RS e Crissiumal - RS, respectivamente. A amostra A foi caracterizada de acordo com sua concentração de C total, utilizando análise elementar e, obteve-se o valor de 33% de C total.

Para avaliação da exatidão do método proposto foram utilizados os materiais de referência (RM) NIST 8433 - *Corn Bran* e NIST 1568a - *Rice Flour* que apresentaram matriz rica em carboidratos, os quais foram submetidos aos procedimentos de decomposição. Também, para avaliação da exatidão, foram feitos ensaios de recuperação, onde concentrações conhecidas de F, Cl, Br e I foram adicionadas à amostra antes da decomposição pelo método proposto.

3.3 Preparo de amostra

As amostras de mel foram submetidas à decomposição utilizando sistema Ultrawave com H₂O₂ em meio alcalino e MIC conforme será descrito a seguir.

3.3.1 Decomposição utilizando H₂O₂ em meio alcalino assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara de reação única de alta pressão (MAD-SRC)

Na decomposição utilizando H₂O₂ em meio alcalino assistida por radiação micro-ondas em sistema de câmara de reação única de alta pressão (MAD-SRC) foram avaliados parâmetros tais como temperatura de decomposição, volume de

¹³ Costa, V. C., et al.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

H₂O₂, massa de amostra e volume de NH₄OH. Foram avaliadas temperaturas de decomposição de 190, 210, 230, 250 e 270 °C. Após a otimização da temperatura foi avaliado o volume de H₂O₂, compreendido entre 4 e 10 mL. Foram avaliadas também, massas de 100 a 700 mg de mel e volumes de NH₄OH entre 400 e 600 µL.

Na Figura 2 é mostrado o sistema Ultrawave (Figura 2A), onde foram adicionados 120 mL de H₂O e 5 mL de H₂O₂ no frasco reacional de PTFE como recomenda o fabricante do equipamento e este foi introduzido na cavidade do forno (Figura 2B). Após, a amostra foi pesada diretamente nos frascos de quartzo, onde posteriormente foram adicionados H₂O₂ e NH₄OH (Figura 2C). Os frascos foram fixados no rotor e esse foi colocado na cavidade do sistema (Figura 2D e 2E). Posteriormente, o sistema foi fechado manualmente e pressurizado com 40 bar de Ar (Figura 2F e 2G).

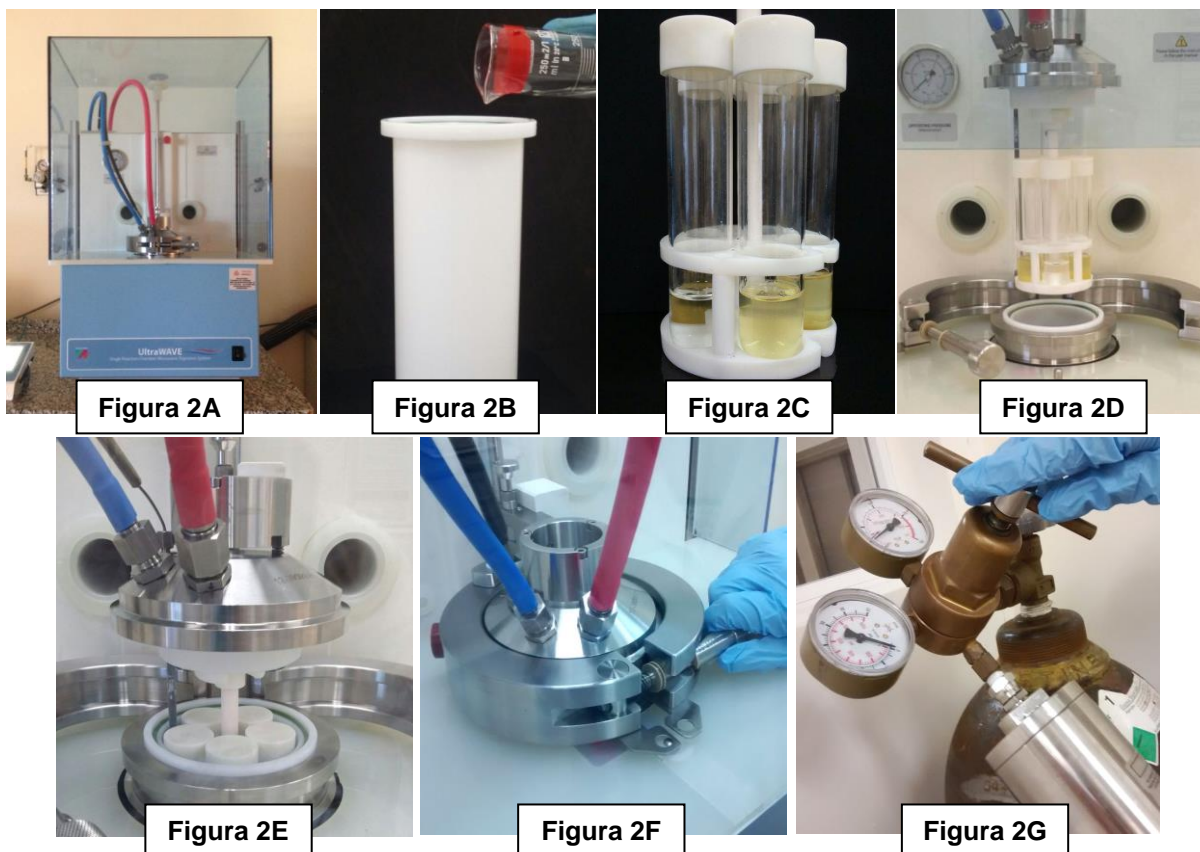


Figura 2. Procedimento para a decomposição de mel em sistema de câmara de reação única (SRC) de alta pressão. (Figura 2A) Sistema Ultrawave, (Figura 2B) frasco reacional de PTFE onde são adicionados 120 mL de H_2O e 5 mL de H_2O_2 , (Figura 2C) a amostra é pesada diretamente nos frascos de quartzo, e são adicionados H_2O_2 e NH_4OH , (Figura 2D e 2E) os frascos são fixados no rotor e esse é inserido na cavidade do sistema e (Figura 2F e 2G) o sistema é fechado e pressurizado com 40 bar de Ar.

O programa de aquecimento utilizado foi: *i*) rampa de 20 min até 190, 210, 230, 250 ou 270 °C a 1500 W, *ii*) permanência de 10 min na temperatura de 190, 210, 230, 250 ou 270 °C e *iii*) resfriamento até atingir a temperatura de 50 °C, onde começa a despressurização automática do sistema (8 bar min^{-1}). O programa de aquecimento utilizado está mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de mel em sistema Ultrawave.

Etapa	Potência, W	Rampa, min	Tempo de permanência, min	Temperatura, °C
1	1500	20	10	190 a 270
2*	0	-	-	-

*Etapa de resfriamento.

Após a decomposição, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e diluídos a 25 mL. Os frascos utilizados na decomposição foram descontaminados com 6 mL de HNO_3 14 mol L^{-1} sob aquecimento por radiação micro-ondas por 10 min à 250 °C e com pressurização inicial de 30 bar.

Após a otimização das melhores condições para a decomposição (MAD-SRC), foram feitos ensaios de recuperação para F, Cl, Br e I, e decomposição de RM. O método foi aplicado a outras três amostras de mel.

3.3.2 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)

A decomposição das amostras de mel utilizando o método MIC foi feita com base em trabalho descrito na literatura para a decomposição de mel¹³, utilizando aproximadamente 200 mg de celulose microcristalina e 50 μL de solução de NH_4NO_3 misturados à 500 mg de mel em um envólucro de polietileno, como mostrado na Figura 3.



Figura 3. 500 mg de mel misturados a 200 mg de celulose microcristalina e 50 μL de NH_4NO_3 , envolvidas em um filme de polietileno.

¹³ Costa, V. C., et al.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

Após a confecção dos envólucros, esses foram posicionados sobre a base do suporte de quartzo contendo um disco de papel filtro umedecido com 50 μL de uma solução de NH_4NO_3 (6 mol L^{-1}). O suporte foi inserido dentro do frasco de quartzo que continha 6 mL de NH_4OH 50 mmol L^{-1} . O frasco foi então fechado, fixado no rotor e pressurizado com 20 bar de O_2 , durante 45 s. Em seguida, o rotor foi colocado dentro do forno de micro-ondas. O programa de aquecimento utilizado foi: i) 40 s na potência de 1400 W, ii) 3 min a 0 W, iii) 5 min a 1400 W e iv) resfriamento por 20 min, como mostrado na Tabela 6. Esse programa de aquecimento foi otimizado por Costa *et al.*¹³ devido a cinética de combustão das amostras de mel ser lenta. Dessa maneira, é necessária uma etapa de irradiação das micro-ondas para dar ignição a combustão, após é necessário um tempo para que a amostra entre totalmente em combustão, posteriormente uma etapa de refluxo e uma etapa de resfriamento do sistema.

Tabela 6. Programa de aquecimento utilizado para a combustão de amostras de mel.

Etapa	Potência, W	Tempo de permanência, s	Nível de exaustão
1	1400	40	1
2	0	180	1
3	1400	300	1
4*	0	1200	2

Taxa de aumento de pressão: $0,8 \text{ bar s}^{-1}$, temperatura máxima: $280 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão máxima: 80 bar. *Etapa de resfriamento.

Após a combustão, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e diluídos a 25 mL com água ultrapura. Posteriormente, os frascos de quartzos foram descontaminados com 6 mL de HNO_3 concentrado com o seguinte programa de aquecimento: i) 10 min a 1400 W e ii) 20 min de resfriamento a 0 W.

¹³ Costa, V. C., *et al.*; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

3.4 Determinação da concentração de carbono

Com o objetivo de avaliar a eficiência de decomposição do método proposto, foi determinada a concentração de C nos digeridos. Foi utilizado como padrão interno, tanto para soluções de referência quanto para digeridos, uma solução de Y na concentração final de 1 mg L^{-1} . Para eliminar a interferência do CO_2 dissolvido, as soluções foram submetidas ao borbulhamento de Ar por 2 min.

Na Figura 4 é mostrado um fluxograma que sintetiza todas as variáveis avaliadas para a decomposição das amostras de mel.

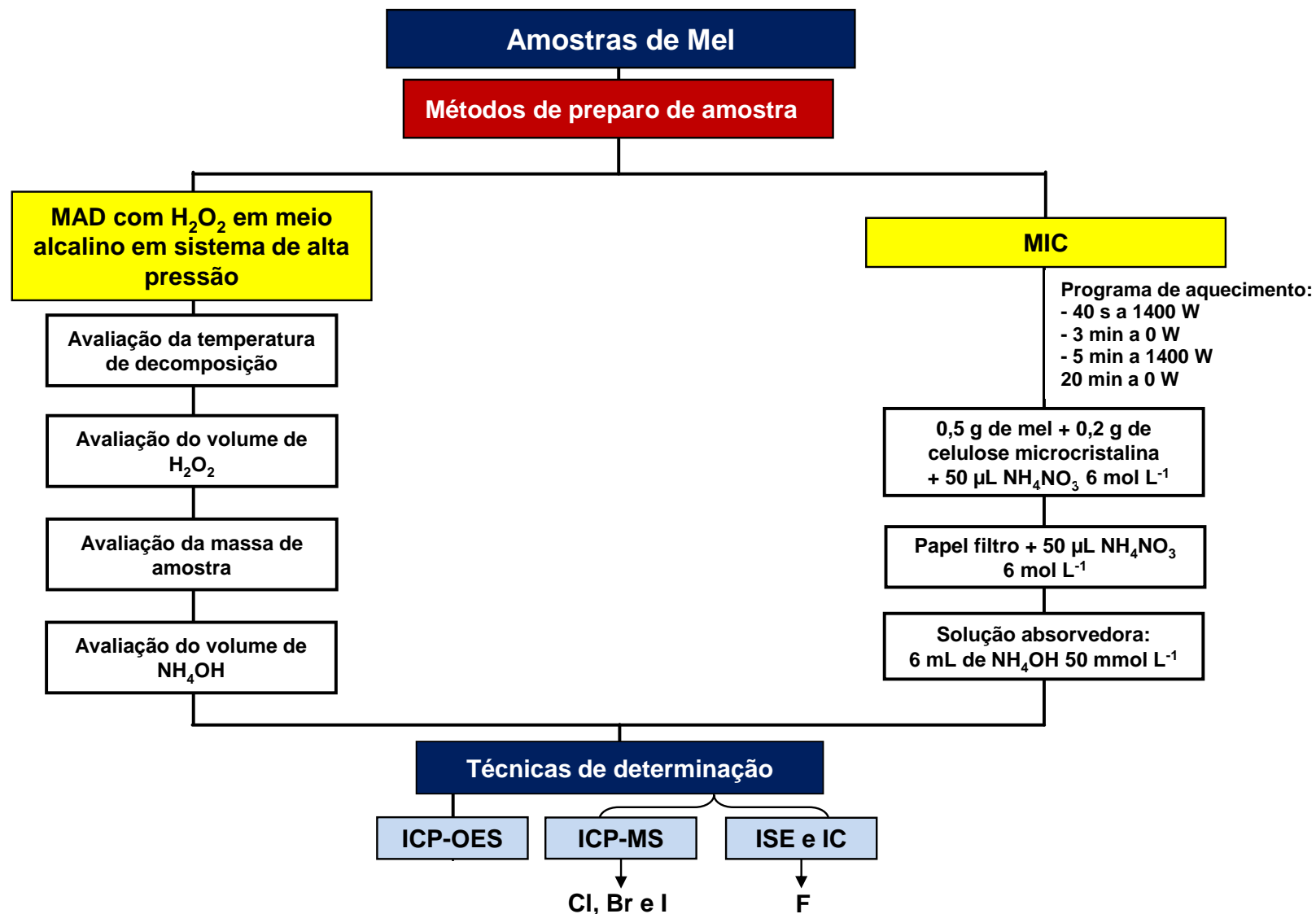


Figura 4. Fluxograma das variáveis avaliadas para a decomposição das amostras de mel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão mostrados e discutidos os resultados obtidos nos parâmetros avaliados na decomposição com H_2O_2 em meio alcalino utilizando sistema de câmara única de reação (SRC) de alta pressão. Posteriormente será discutido o estudo das interferências durante a etapa de determinação de Cl, Br e I por ICP-MS e, serão mostrados e discutidos os resultados obtidos na avaliação da exatidão do método. Por fim, será apresentada a aplicabilidade do método proposto para diferentes amostras de mel.

4.1 Amostras

Na primeira etapa deste trabalho foram selecionadas 4 amostras de mel obtidas de diferentes regiões do Rio do Grande do Sul e Santa Catarina, as quais não apresentavam material insolúvel e não apresentavam também, aspecto cristalizado. Cabe salientar que a seleção foi feita com o objetivo de escolher amostras que apresentassem concentrações diferentes de halogênios, uma vez que existem trabalhos na literatura que, através da avaliação da concentração de alguns metais, pode ser rastreada a região de origem do mel. Entretanto, para que se possa fazer esse estudo, seria necessária a análise de um maior número de amostras.

A amostra de mel A foi caracterizada pela concentração de C total o qual apresentou concentração de 33%.

4.2 Avaliação dos parâmetros no método de decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em sistema de câmara de reação única de alta pressão (MAD-SRC)

Posteriormente à escolha das amostras, o mel A foi selecionado para a avaliação de alguns parâmetros como temperatura de decomposição, volume de H₂O₂, massa de amostra e volume de NH₄OH.

Além disso, a avaliação desses parâmetros teve por objetivo a otimização das condições experimentais do método para permitir a decomposição de uma elevada massa de amostra com quantidades mínimas de H₂O₂ e volume adequado de NH₄OH para garantir o pH alcalino nos digeridos finais. A eficiência de decomposição relacionada a cada parâmetro foi avaliada através da determinação de carbono em solução por ICP-OES, com o objetivo de minimizar as possíveis interferências na etapa de determinação de Cl, Br e I por ICP-MS.

O método de decomposição com H₂O₂ em meio alcalino foi feito em sistema Ultrawave o qual utiliza uma câmara de reação onde a decomposição ocorre. O rotor é posicionado dentro da cavidade a qual foi pressurizada com 40 bar de Ar e as soluções foram aquecidas pela radiação micro-ondas.

Dentre as vantagens do sistema Ultrawave cabe salientar, primeiramente, a possibilidade de trabalhar em altas pressões (até 199 bar) o que permite a utilização de H₂O₂ como único agente oxidante. A decomposição do H₂O₂ gera um aumento significativo da pressão no sistema. O sistema permite ainda um controle de pressão

e temperatura em todos os frascos, o que diminui consideravelmente o risco de explosões no sistema.⁴⁶

Além dessas vantagens, tem-se também a possibilidade de decompor em uma mesma rodada diferentes amostras, assim como diferentes massas de amostra.⁴⁶

Neste trabalho, foi utilizado o sistema Ultrawave a fim de avaliar a eficiência de decomposição de amostras de mel utilizando H₂O₂ em meio alcalino através da variação alguns parâmetros.

4.2.1 Avaliação da temperatura de decomposição

Inicialmente, foi avaliada a influência da temperatura na eficiência da decomposição do mel. Foi utilizado um programa com uma rampa de aquecimento de 20 min e permanência de 10 min nas temperaturas de 190, 210, 230, 250 e 270 °C. Na avaliação da temperatura, foram utilizadas massas de mel de aproximadamente 500 mg, 6 mL de H₂O₂ e 400 µL de NH₄OH em frascos de quartzo de 40 mL. Quando utilizados esses frascos, foi possível a decomposição de até 5 amostras simultaneamente. Na Figura 5 é mostrado o perfil do programa de aquecimento e a variação da pressão para a temperatura de 250 °C, durante a decomposição com H₂O₂ em meio alcalino. Cabe destacar um aumento significativo da pressão em temperaturas de aproximadamente 120 °C, isso ocorre devido à decomposição do H₂O₂ e dos gases formados pela decomposição da amostra. Cabe destacar também, as pressões finais que são atingidas no sistemas, pressões de aproximadamente 100 bar.

⁴⁶ Milestone Srl, UltraWAVE, Operator Manual (2013).

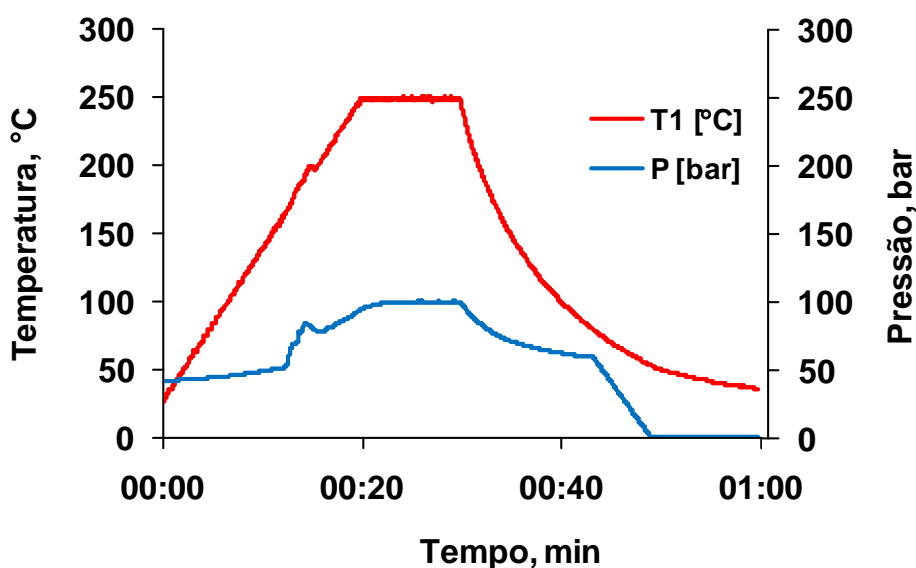


Figura 5. Perfil de temperatura e pressão para a decomposição de 500 mg de mel e 6 mL de H₂O₂ em meio alcalino na temperatura final de 250 °C.

A concentração de C foi determinada por ICP-OES nos digeridos após a variação das temperaturas de decomposição, sendo que os digeridos determinados por ICP-OES não apresentaram material insolúvel. Foi possível observar que, temperaturas de 190 °C não foram suficientes para a decomposição da amostra de mel visto que material insolúvel foi observado nos digeridos. Devido a isto, não foi determinada a concentração de C nesses digeridos.

Na Figura 6 é mostrada a influência da temperatura na eficiência de decomposição das amostras, onde cabe destacar que não houve diferença significativa nas concentrações de C utilizando as temperaturas de 210 e 230 °C (ANOVA, nível de confiança de 95%). Contudo, a concentração de C diminuiu cerca de 40% nas temperaturas de 250 e 270 °C, quando comparadas com as temperaturas de 210 °C. Por outro lado, a concentração de C em solução nos digeridos com temperaturas de decomposição de 250 e 270 °C não apresentou diferença significativa. Devido a isso e também para minimizar o desgaste do sistema Ultrawave quando utilizadas elevadas temperaturas, a temperatura escolhida foi de 250 °C para os experimentos futuros.

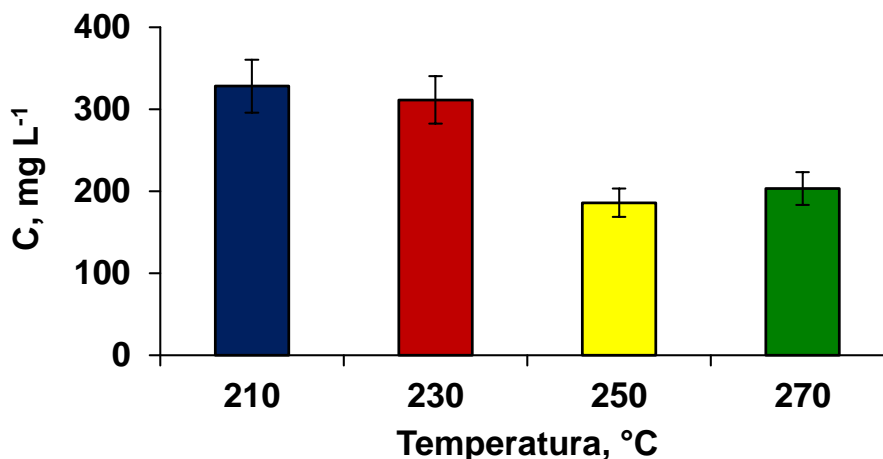


Figura 6. Variação da concentração de C nas temperaturas avaliadas para decomposição de 500 mg de mel I e 6 mL H₂O₂ em meio alcalino (400 µL de NH₄OH).

4.2.2 Avaliação do volume de H₂O₂

Posteriormente a otimização da temperatura de decomposição, os próximos experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a quantidade adequada de H₂O₂ como agente oxidante na decomposição de mel em meio alcalino. Os volumes utilizados nos experimentos foram 4, 6, 8 e 10 mL de H₂O₂, massas de mel de aproximadamente 500 mg e 400 µL de NH₄OH.

É possível observar na Figura 7 que a concentração de C nos digeridos utilizando diferentes volumes de H₂O₂ diminui consideravelmente com o aumento do volume de H₂O₂ utilizado. Obteve-se uma redução da concentração de C de 40% quando utilizado 6 mL comparado a utilização de 4 mL de H₂O₂. Quando utilizado 8 mL de H₂O₂ a concentração de C reduziu cerca de mais 25%, sendo essa redução estatisticamente significativa (ANOVA, nível de confiança de 95%). Entretanto, quando se utilizou 10 mL de H₂O₂ não houve diferença significativa na concentração de C comparado à utilização de 8 mL.

O volume de H₂O₂ escolhido para prosseguir com os experimentos foi então de 8 mL, devido a este não apresentar diferença significativa na concentração de C quando comparado com os valores obtidos com 10 mL de H₂O₂. A utilização de um menor volume de agente oxidante está de acordo com os princípios da química verde, bem como a preferência de utilização de reagentes que não gerem resíduo.

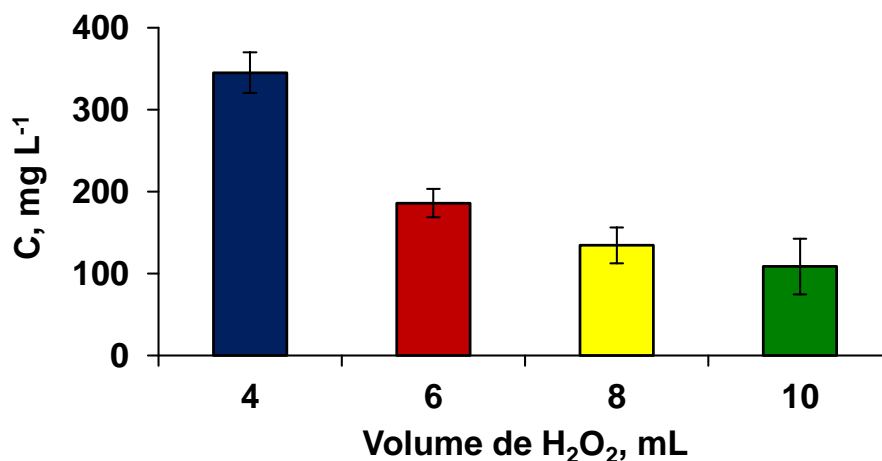


Figura 7. Variação da concentração de C nos volumes de H₂O₂ avaliados para decomposição de 500 mg de mel em meio alcalino (400 µL de NH₄OH) na temperatura de 250 °C.

4.2.3 Avaliação da massa de mel

Após a escolha do volume de 8 mL de H₂O₂, a eficiência de decomposição foi avaliada variando a massa de amostra utilizada. Para estes ensaios foram utilizadas massas de 100, 300, 500 e 700 mg de mel.

A avaliação da massa de amostra tem como finalidade a decomposição da maior massa de amostra possível, uma vez que o LOQ está relacionado com a máxima quantidade de amostra que pode ser decomposta. Contudo, deve-se levar em conta a concentração de C nos digeridos finais para que não ocorram interferências na etapa de determinação.

Quando avaliadas as massas entre 100 e 500 mg não foi observado material insolúvel nos digeridos finais e as soluções possuíam aspecto límpido. Entretanto quando avaliadas massas de 700 mg de mel, foi possível observar resíduos insolúveis nesses digeridos, indicando a decomposição incompleta das amostras. Em função dos resíduos observados, optou-se por não fazer a determinação de C por ICP-OES nos digeridos obtidos com 700 mg.

Para a avaliação da eficiência de decomposição, a concentração de C foi determinada nos digeridos finais obtidos após a decomposição de massas de 100, 300 e 500 mg. Na Figura 8 são mostrados os resultados para a determinação de C. As concentrações de C não apresentaram diferença significativa (ANOVA, nível de confiança de 95%) quando utilizadas massas de 100, 300 e 500 mg de mel.

Devido a isso, foi escolhida a massa de amostra de 500 mg para experimentos posteriores possibilitando a obtenção de melhores LOQs.

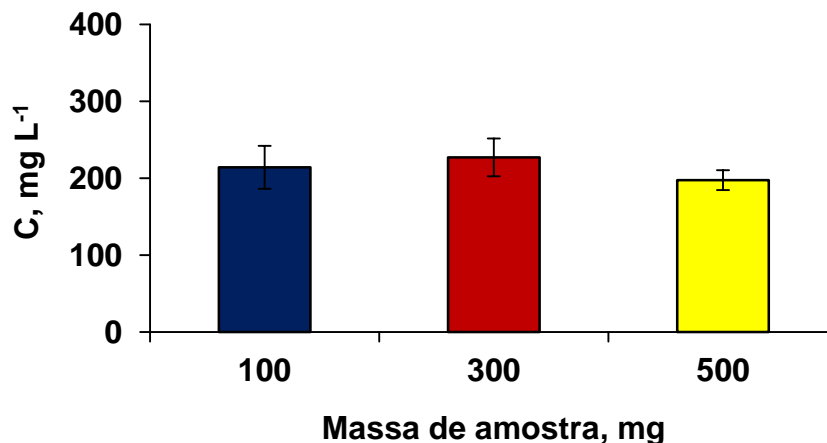


Figura 8. Concentração de C para as diferentes massas de amostras avaliadas para decomposição de mel com 8 mL de H₂O₂ em meio alcalino na temperatura de 250 °C.

4.2.4 Avaliação do volume de NH₄OH

Após a otimização dos parâmetros de temperatura, volume de H₂O₂ e massa de amostra para a decomposição de mel, foi avaliado o volume de NH₄OH. A utilização de NH₄OH é necessária para garantir que a solução final possua pH superior a 7, minimizando, dessa maneira, possíveis perdas de F, Cl, Br e I por volatilização durante a etapa de digestão.

Além disso, é importante destacar a escolha do NH₄OH em conjunto com H₂O₂ para a decomposição do mel, ao invés da escolha de outras bases alcalinas que poderiam ser utilizadas com a mesma função do NH₄OH. Jin et al.⁴¹ propôs a utilização de bases alcalinas, contudo devido aos problemas relacionados com a utilização de NaOH relatados, Pullanikat *et al.*⁴⁵ propuseram a degradação oxidativa de carboidratos em formiato de amônio na presença de H₂O₂ e NH₄OH.⁴⁵

⁴¹ Jin, F., *et al.*, *Green Chemistry* 10 (2008) 612-615.

⁴⁵ Pullanikat, P., *et al.*, *Tetrahedron Letters* 51 (2010) 6192-6194.

Na Figura 9 é possível observar o pH nos digeridos finais quando foram avaliados volumes de 400, 450, 500, 550 e 600 μL de NH_4OH . Todos os volumes avaliados forneceram digeridos com pH entre 7 e 8. Contudo, quando avaliado o volume de 600 μL de NH_4OH foi observado que a decomposição não era reprodutível, uma vez que alguns digeridos apresentavam material insolúvel. Dessa maneira, selecionou-se o volume de 550 μL de NH_4OH para garantir um excesso deste reagente e permitir que o pH final fosse superior a 7, minimizando as perdas dos halogênios por volatilização.

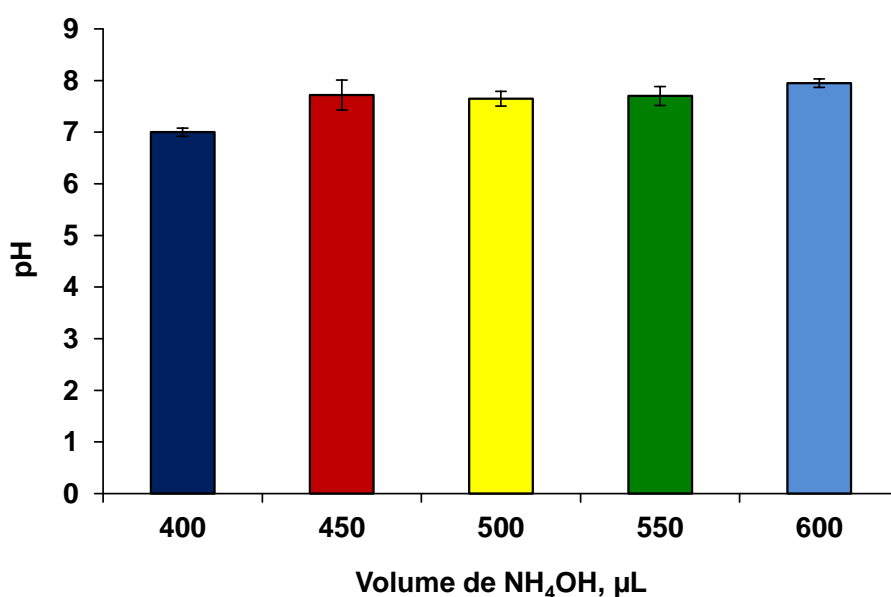


Figura 9. Variação do valor de pH nos diferentes volumes de NH_4OH avaliados para a decomposição de mel com 500 mg de amostra, 8 mL de H_2O_2 e temperatura de 250 $^\circ\text{C}$.

Após as avaliações no método de decomposição com H_2O_2 em meio alcalino para a decomposição de mel, foi possível obter digeridos finais que apresentaram concentração de C inferior a 200 mg L^{-1} , quando utilizada massa de mel de 500 mg com 8 mL de H_2O_2 como agente oxidante e 550 μL de NH_4OH . Essa concentração de C possibilita a minimização de interferências não espectrais na determinação de Cl, Br e I por ICP-MS. Além disso, a concentração de C de 200 mg L^{-1} corresponde a 3% do C total presente na amostra, de acordo com a quantidade de C obtida pela análise elementar.

Na Figura 10 é apresentado um gráfico extraído do equipamento Ultrawave para a decomposição nas condições otimizadas (500 mg de mel, 8 mL de H_2O_2 e

550 μL de NH_4OH) que mostra o comportamento da temperatura e pressão durante o aquecimento. Inicialmente, é possível observar um aumento significativo da pressão do sistema com obtenção de pressões finais superiores a 100 bar, devido provavelmente a decomposição do H_2O_2 e dos produtos gasosos formado durante a decomposição. Além disso, na temperatura de aproximadamente 120 °C observa-se um incremento significativo da pressão decorrente provavelmente da decomposição do H_2O_2 e, devido a esse incremento da pressão há um aumento na temperatura da cavidade interna do sistema. Dessa maneira, a utilização de um sistema de alta pressão é impreterivelmente necessária para a total decomposição de mel com H_2O_2 em meio alcalino.

Alguns experimentos foram feitos para reforçar a necessidade da utilização de sistemas de alta pressão, para garantir a eficiência de decomposição. Neste sentido, foram feitos experimentos ajustando a pressão máxima do sistema a 80 bar (pressão semelhante ao sistema Multiwave). Quando limitada a pressão a 80 bar, foi possível observar a interrupção na irradiação das micro-ondas na temperatura de 190 °C, o que resultou na digestão incompleta das amostras (onde haviam resíduos insolúveis no digerido final). Observou-se uma forte dependência da temperatura de decomposição, devido a isso é necessária a utilização de sistema de alta pressão que permita altas temperaturas para garantir a completa decomposição de mel com H_2O_2 em meio alcalino.

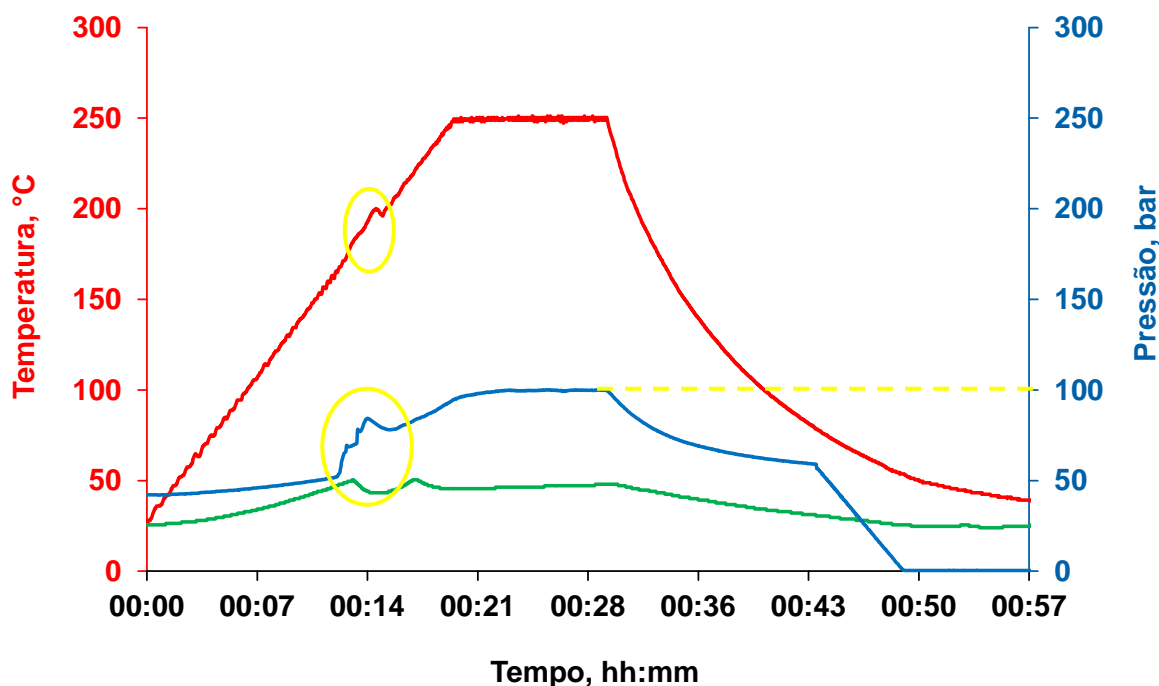


Figura 10. Perfil de temperatura e pressão no sistema Ultrawave, onde é mostrada (—) temperatura da cavidade interna, (—) pressão na cavidade interna e (—) temperatura na cavidade externa.

4.3 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas

Métodos baseados na combustão da amostra apresentam uma gama de vantagens, dentre as quais, a alta eficiência de decomposição. Isso é decorrente principalmente pela quase total conversão da matriz orgânica em CO_2 e H_2O . O método de preparo de amostra por MIC é amplamente empregado para amostras orgânicas e posterior determinação de halogênios. Esse método tem como vantagem a possibilidade de usar diferentes soluções para retenção dos analitos, podendo ser empregadas soluções ácidas e básicas.¹³⁻¹⁶ Em virtude dessa flexibilidade, esse método de preparo de amostra pode ser utilizado previamente a determinação de metais, não metais e halogênios por diferentes técnicas. Além disso, devido a alta eficiência de decomposição e conseqüentemente o baixo teor de carbono residual (menor que 1%) nos digeridos finais, o risco de possíveis

¹³ Costa, V. C., et al.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

¹⁴ Mesko, M. F., et al., *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

¹⁵ Pereira, J. S. F., et al., *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

¹⁶ Muller, A. L. H., et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

interferências na etapa de determinação quando utilizadas técnicas de plasma é amenizado.^{13-16,28-30,32,47,48}

Como método comparativo, com o intuito de avaliar a exatidão do método de decomposição de mel com H₂O₂ em meio alcalino utilizando SRC de alta pressão, o método de decomposição por combustão iniciada por radiação micro-ondas foi escolhido. Para isso, foi utilizado como base o trabalho proposto por Costa *et al.*¹³ no qual se utilizou a MIC como método de preparo de amostra previamente à determinação de Br e I em amostras de mel por ICP-MS. Cabe salientar que no estudo de Costa *et al.* foi necessário o aprimoramento do método para que uma maior massa de mel pudesse ser decomposta a fim de obter melhores LOQs. Utilizando celulose microcristalina como auxiliar de combustão, massas de até 1 g de mel acondicionadas em um envólucro de polietileno puderam ser totalmente decompostas. Para a retenção dos analitos provenientes da decomposição das amostras de méis, a solução absorvedora escolhida foi 50 mmol L⁻¹ de NH₄OH.¹³

Para comparação entre os métodos foi selecionada a amostra de mel I. Cerca de 500 mg de mel com 200 mg de celulose microcristalina e 50 µL de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹, foram envolvidos em um filme de polietileno. O envólucro foi posicionado sob um papel filtro umedecido com 50 µL de solução de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹ previamente posicionado no suporte de quartzo. Foram adicionados aos frascos de quartzo 6 mL de NH₄OH 50 mmol L⁻¹ como solução absorvedora, seguida da introdução do suporte contendo a amostra. O rotor, contendo os frascos, foi submetido ao programa de aquecimento descrito no item 3.3.2.

A etapa de determinação após o preparo de amostra por MIC foi feita por ISE e IC para F. Cloro, Br e I foram determinados por ICP-MS e os resultados

¹³ Costa, V. C., *et al.*; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

¹⁴ Mesko, M. F., *et al.*, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

¹⁵ Pereira, J. S. F., *et al.*, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

¹⁶ Muller, A. L. H., *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

²⁸ Picoloto, R. S., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

²⁹ Mesko, M. F., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.

³⁰ Flores, E. M. M., *et al.*, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.

³² Flores, E. M. M., *et al.*, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 374-380.

⁴⁷ Muller, A. L. H., *et al.*, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22 (2011) 1649-1655.

⁴⁸ Pereira, J. S. F., *et al.*, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.

obtidos são mostrados na Tabela 7. Não foi possível fazer a determinação de Br e I por IC devido a necessidade de diluição da amostra, para prevenir a saturação dos sítios de troca iônica da coluna cromatográfica com as altas concentrações de NO_3^- . Para Cl, preferiu-se a determinação por ICP-MS em função da elevada concentração desse analito nas amostras, uma vez que esta técnica apresenta maiores LOQs que os obtidos por IC, não sendo necessária a diluição prévia da amostra. Além disso, tem-se a possibilidade de determinação simultânea a Br e I.

Tabela 7. Concentração encontrada para F, Cl, Br e I na amostra A utilizando o método da MIC.

Elemento	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	ISE	IC	ICP-MS
F	< 8,0	< 0,80	-
Cl	-	-	338 ± 15
Br	-	-	$1,44 \pm 0,10$
I	-	-	< 0,01

4.4 Efeito da concentração de carbono na determinação de Cl, Br e I por ICP-MS

Quando as técnicas de determinação baseadas em plasma são utilizadas, a presença de altas concentrações de C nos digeridos podem causar interferências tanto de natureza espectral quanto não espectral. Relacionado a isso, alguns trabalhos relatam que a intensidade de sinal para elementos com elevado potencial de ionização são significativamente aumentadas em matrizes contendo C. O grau de ionização para elementos de difícil ionização é relativamente baixo, como por exemplo, para Cl, Br e I. Contudo, devido ao efeito de transferência de carga do C para o plasma, ocorre uma melhora na eficiência de ionização, que afeta diretamente na intensidade do sinal analítico, quando comparado com soluções aquosas para calibração sem a presença de C.⁴⁹

⁴⁹ Grindlay, G., et al., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

Com o objetivo de verificar possíveis interferências de C para a determinação de Cl, Br e I, foram feitos alguns experimentos utilizando soluções de referência de 5 mg L^{-1} de Cl, $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Br e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de I contendo concentrações crescentes de C de 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 mg L^{-1} em água.

Grindlay *et al.*⁴⁹ utilizaram um critério de avaliação da exatidão a partir da incerteza expandida calculada a partir da repetitividade das medidas por ICP-MS. Baseado nesse trabalho foi utilizado o cálculo da incerteza expandida para avaliar o efeito da concentração de C nas determinações de Cl, Br e I.

Para o procedimento, foi realizada a verificação da intensidade de sinal de um solução de referência de 5 mg L^{-1} de Cl, $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Br e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de I sem a adição de C, sendo essa determinada 10 vezes, obtendo a média de RSD de 4%. Posteriormente, o RSD foi multiplicado pelo fator de abrangência ($k=2,2$) para estimar a incerteza expandida. A incerteza expandida obtida foi de 9%, sendo portanto a faixa de aceitação para os ensaios de recuperação entre 91 e 109%.

Na Figura 11 é mostrado o gráfico da recuperação de Cl, Br e I durante a avaliação da interferência de C no plasma, quando soluções contendo esses analitos na presença de concentrações crescentes de C foram analisadas. A intensidade de sinal obtida na solução sem a adição de C foi considerada 100% e, a partir dessa, foi calculada a recuperação para as soluções com concentrações diferentes de C.

É possível observar que concentrações a partir de 750 mg L^{-1} de C estão fora da faixa de aceitação para I. Dessa maneira é possível concluir que houve uma diferença significativa na intensidade de sinal causada pela concentração de C na solução. A interferência de C para a determinação pode estar relacionada com a proximidade dos potenciais de ionização do C (11,26 eV) e do I (10,45 eV), ocasionando, dessa forma, transferências de carga do C para o analito influenciando e melhorando a eficiência de ionização do mesmo.⁴⁹ Contudo, para Br é possível observar que apenas soluções com concentrações na ordem de 2000 mg L^{-1} de C causam uma diferença significativa na intensidade do sinal quando comparada com soluções sem concentração de C, enquanto que para Cl não foi observado interferência até concentrações de 2000 mg L^{-1} de C.

⁴⁹ Grindlay, G., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

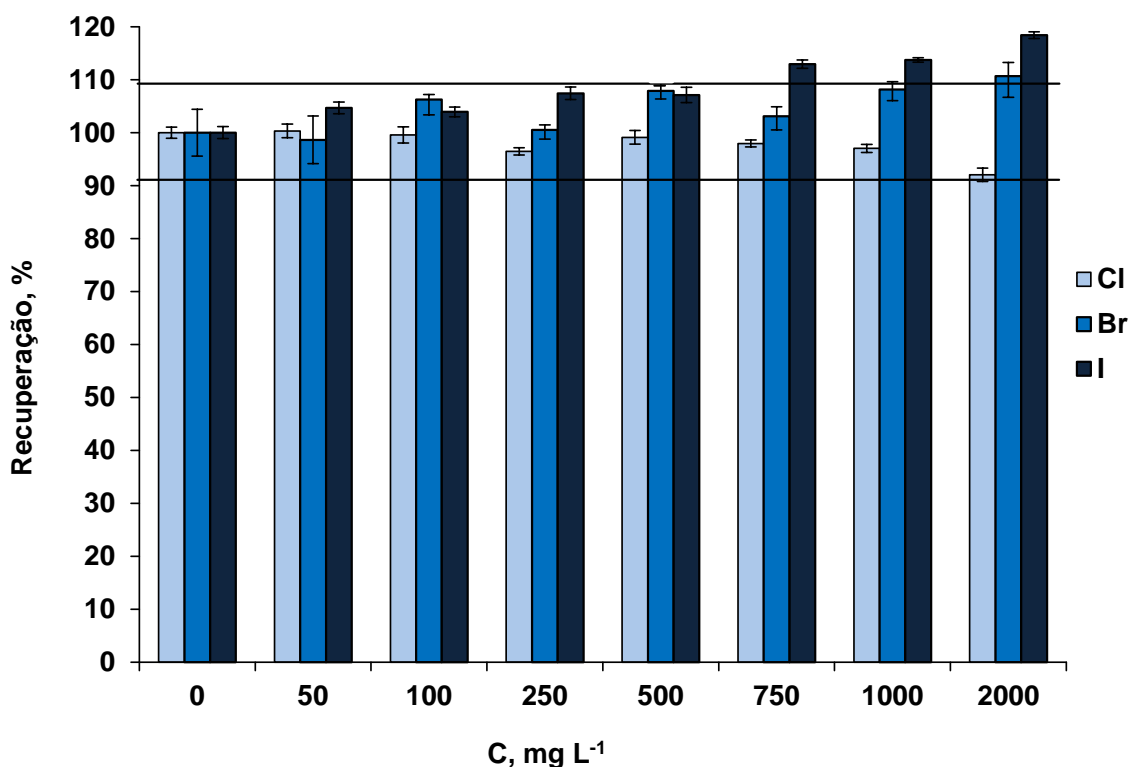


Figura 11. Avaliação da recuperação de Cl, Br e I quando diferentes concentrações de C foram utilizadas na determinação por ICP-MS.

Com base nos resultados obtidos durante a avaliação da concentração de C, foi possível estabelecer concentrações de C em que não afetassem a determinação de Cl, Br e I. Dessa maneira, após a decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em SRC de alta pressão foi feita a determinação da concentração de C nos digeridos os quais ficaram inferiores a 200 mg L⁻¹, não causando portanto, interferências durante a etapa de determinação por ICP-MS conforme foi observado.

4.5 Determinação de F por IC e ISE

Após a decomposição das amostras utilizando os métodos de decomposição com H₂O₂ em meio alcalino e MIC, foi feita a determinação de F nos digeridos finais por ISE e IC. Devido à baixa concentração do analito, não foi possível a quantificação nos digeridos das amostras de mel, pois foram inferiores ao LOQ das técnicas utilizadas.

Entretanto, quando feita a determinação de F por IC nos digeridos dos ensaios de recuperação de amostras fortificadas (adição de 5000 µg L⁻¹ de padrão

monoelementar de F na amostra de mel A), foi possível observar interferência na etapa de determinação de F, uma vez que o sinal do pico cromatográfico não retornou a linha base. Dessa maneira, a concentração obtida na determinação dos ensaios de recuperação para F por IC foi 25% inferior ao resultado esperado e ao resultado obtido por ISE. A interferência causada nesse sinal ocorreu devido à presença de outro pico cromatográfico próximo ao tempo de retenção do fluoreto.

É sabido que o tempo de retenção dos íons formiato e acetato é muito próximo ao do íon fluoreto quando a coluna de troca iônica Supp 5 é utilizada. Desta forma, foi feito um estudo utilizando soluções de referência de fluoreto, acetato e formiato. Na Figura 12 são mostrados os cromatogramas sobrepostos das soluções de referência de fluoreto, acetato e formiato, assim como o cromatograma da amostra de mel A sem fortificação (10 vezes diluída). É importante salientar a necessidade de diluição das amostras após a decomposição com H_2O_2 em meio alcalino devido à carga de outros ânions como nitratos, fosfatos, etc, os quais podem saturar a coluna diminuindo sua vida útil e eficiência de separação.

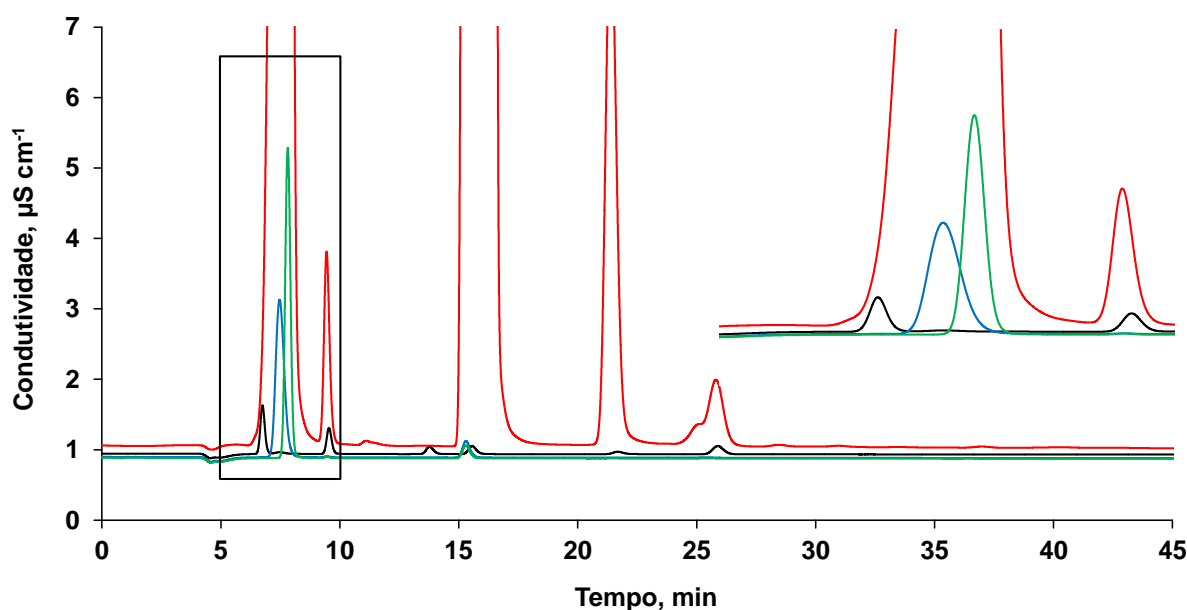


Figura 12. Cromatogramas obtidos na verificação de interferências para fluoreto. (—) solução de referência de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de F, (—) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de acetato, (—) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de formiato e (—) amostra de mel A sem fortificação (10 vezes diluída).

É possível observar no cromatograma da amostra de mel A (10 vezes diluída) um pico que se sobrepõem ao sinal dos íons fluoreto, formiato e acetato presentes

na solução de referência. Desta forma, para garantir a exatidão dos resultados preferiu-se fazer as medidas de F por ISE, pois com a utilização dessa técnica não é necessária a diluição prévia das soluções e o LOQ obtido foi de $8,0 \mu\text{g g}^{-1}$. Caso a IC fosse utilizada com diluição de 100 vezes, o LOQ obtido seria de $80 \mu\text{g g}^{-1}$.

4.6 Avaliação da exatidão do método

Após as avaliações dos parâmetros de temperatura de decomposição, volume de H_2O_2 , massa de amostra e volume de NH_4OH para a posterior decomposição das amostras de mel em SRC de alta pressão, foram feitos ensaios para verificação do método proposto. Para isso, foi avaliada a exatidão do método através de ensaios de recuperação e decomposição de RM com matriz rica em carboidratos. Também foi feita a comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com os resultados obtidos por MIC.

4.6.1 Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação foram feitos através da adição de quantidades conhecidas dos analitos na amostra A. Para esses experimentos, foram utilizadas soluções de referência monoelementares de cada analito e a concentração adicionada foi compatível com a concentração presente dos mesmos na amostra ou superior ao LOQ da técnica utilizada para quantificação. As adições das soluções monoelementares foram feitas diretamente na amostra. Após a fortificação da amostra, essa foi submetida a decomposição utilizando H_2O_2 em meio alcalino em sistema de SRC de alta pressão nas condições otimizadas anteriormente. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados obtidos para a quantificação de F, Cl, Br e I após fortificação e decomposição da amostra A utilizando MAD-SRC de alta pressão.

Elemento	Amostra A ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra A com fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
F ^a	< 150*	5000	5140 \pm 160	103
Cl ^b	5770 \pm 672	5000	10311 \pm 168	96
Br ^b	31 \pm 4	5	37 \pm 2	101
I ^b	0,20 \pm 0,01	0,50	0,76 \pm 0,06	109

*Valores menores que o LOQ

^aDeterminação por ISE

^bDeterminação por ICP-MS

Os resultados obtidos para os ensaios de recuperação de F, Cl, Br e I foram considerados satisfatórios, uma vez que estavam compreendidos no intervalo entre 96% e 109% de recuperação.

4.6.2 Decomposição de material de referência (RM)

A fim de avaliar a exatidão do método proposto, dois materiais de referência foram submetidos ao procedimento de decomposição utilizando H₂O₂ em meio alcalino em SRC de alta pressão para posterior determinação de Cl, Br e I. A avaliação da exatidão para F não foi feita utilizando RM, pois não havia disponibilidade de materiais com a concentração informada desse elemento. Nestes ensaios foram utilizados dois RMs com matrizes ricas em carboidratos, sendo eles *Corn Bran* e *Rice Flour*. Para as decomposições desses materiais foram utilizadas massas de 250 mg dos RMs, 8 mL de H₂O₂ e 550 μL de NH₄OH. Após a decomposição, as concentrações de Cl, Br e I foram determinadas utilizando a técnica de ICP-MS.

Na Tabela 9 estão mostrados os resultados obtidos para o RM de *Corn Bran* após a decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em SRC de alta pressão. É possível observar que após a decomposição de *Corn Bran* e quantificação por ICP-MS, os valores obtidos para Cl, Br e I não apresentaram diferença significativa com os valores de referência (Teste *t-student*, nível de confiança de 95%).

Tabela 9. Resultados obtidos para a determinação de Cl, Br e I em RM de *Corn Bran* após decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em SRC de alta pressão.

Elemento	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor de referência ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cl	24,6 \pm 2,2	31 \pm 21
Br	2,1 \pm 0,2	2,3 \pm 0,5
I	0,025 \pm 0,03	0,026 \pm 0,006

Na Tabela 10 são mostrados os valores determinados após a decomposição de *Rice Flour*. Os valores determinados para Cl e Br em RM *Rice Flour* utilizando o método proposto não apresentaram diferença significativa quando comparados com os valores informados no RM (Teste *t-student*, nível de confiança de 95%). Para I, não foi possível comparação entre os valores devido ao LOQ da técnica de ICP-MS ser superior ao valor informado do RM.

Tabela 10. Resultados obtidos para a determinação de Cl, Br e I em RM de *Rice Flour* após decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em SRC de alta pressão.

Elemento	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor informado ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cl	267 \pm 30	300
Br	6,9 \pm 1,2	8
I	< 0,01*	0,009

*Valores menores que o LOQ

Dessa maneira, após a decomposição dos dois RMs, é possível destacar que o método proposto apresentou exatidão apropriada quando comparados os valores de referência e informado para a concentração dos analitos nos RMs.

4.6.3 Combustão iniciada por micro-ondas – MIC

Após as avaliações nos ensaios de recuperação e decomposição de RMs, a amostra de mel A foi submetida a decomposição utilizando MIC.

Na Tabela 11 são mostrados os valores obtidos para a determinação de F (por ISE), Cl, Br e I (por ICP-MS) após decomposição utilizando o método de preparo de amostra por MIC e por MAD-SRC com H₂O₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão.

Tabela 11. Resultados obtidos para a determinação de F, Cl, Br e I utilizando MIC e MAD-SRC com H₂O₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão. Resultados expressos em µg g⁻¹.

Elemento	MIC	MAD-SRC com H ₂ O ₂ em meio alcalino em sistema de alta pressão
F	< 8,0*	< 8,0*
Cl	338 ± 15	321 ± 9
Br	1,44 ± 0,10	1,51 ± 0,12
I	< 0,01*	< 0,01*

*Valores menores que o LOQ

Pode-se observar que para F e I os valores obtidos tanto no método de MIC como na decomposição com H₂O₂ em meio alcalino ficaram abaixo do LOQ das técnicas de ISE e ICP-MS, respectivamente. Para Cl e Br foi possível observar os resultados obtidos pelos dois métodos de preparo de amostra os quais não apresentaram diferença significativa (Teste *t-student*, nível de confiança de 95%).

Após a avaliação de ensaios de recuperação, decomposição de RM e comparação a outro método de preparo de amostra já estabelecido, foi possível avaliar a exatidão do método proposto. Assim, a decomposição com H₂O₂ em meio alcalino utilizando SRC de alta pressão possui exatidão adequada para a decomposição de amostras de mel e posterior determinação de F, Cl, Br e I.

4.7 Quantificação de F, Cl, Br e I em diferentes amostras de mel

Após as otimizações, a decomposição com H₂O₂ em meio alcalino utilizando SRC de alta pressão foi aplicada para a decomposição de amostras de mel para posterior determinação de F, Cl, Br e I. Foram utilizadas para quantificação desses elementos 4 amostras de mel oriundas de diferentes regiões do RS e SC. Os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados para a determinação de F, Cl, Br e I para diferentes amostras de mel usando a decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em SRC de alta pressão como método de preparo de amostra. Resultados expressos em µg g⁻¹.

Amostra	F*	Cl	Br	I
Mel A	< 8,0**	321 ± 9	1,51 ± 0,12	< 0,01**
Mel B	< 8,0**	70 ± 1	0,26 ± 0,02	< 0,01**
Mel C	< 8,0**	161 ± 4	0,51 ± 0,05	< 0,01**
Mel D	< 8,0**	235 ± 2	0,81 ± 0,08	< 0,01**

*Valores obtidos por ISE

**Valores menores que o LOQ

É possível observar que a concentração de F e I ficaram abaixo dos LOQs obtidos para o método proposto nas amostras avaliadas. Enquanto que, para Cl e Br, as amostras apresentaram diferentes concentrações, o que pode estar relacionado às diferentes regiões de origem do mel ou até mesmo ao processo de extração ou embalagem ao qual o mel foi exposto. Cabe salientar que para que seja feito o estudo de correlacionar a concentração de determinado elemento à região de origem do mel, seria necessário a análise de um maior número de amostras de mel.

4.8 Limites de quantificação para F, Cl, Br e I

Na Tabela 13 são mostrados os valores dos LOQs para F por ISE e IC, para Cl por ICP-MS e IC, e para Br e I por ICP-MS. Como é possível observar, a utilização do método de decomposição com H₂O₂ em meio alcalino em SRC de alta pressão e as técnicas analíticas de determinação utilizadas, foram obtidos LOQs relativamente baixos.

Tabela 13. Limites de quantificação obtidos para F por ISE e IC, para Cl por ICP-MS e IC e para Br e I por ICP-MS.

Halogênio	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Técnica utilizada
F	8,0	ISE
	0,8	IC
Cl	23	ICP-MS
	1,6	IC
Br	0,07	ICP-MS
I	0,01	ICP-MS

O LOQ obtido para F por IC é melhor quando comparado ao LOQ obtido por ISE, entretanto com as interferências observadas na determinação por IC, para garantir a exatidão dos resultados preferiu-se fazer as medidas de F por ISE. Para Cl, o LOQ obtido para IC foi melhor que o LOQ obtido para ICP-MS, contudo devido a alta concentração desse analito na amostra e a possibilidade de determinação simultânea a Br e I, optou-se pela determinação por ICP-MS.

Não há legislação que trate dos limites para halogênios no mel, contudo os LOQs parecem ser apropriados para o controle de qualidade do mel.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de decomposição com H_2O_2 em meio alcalino utilizando sistema de câmara de reação única (MAD-SRC) de alta pressão mostrou-se aplicável à decomposição de mel para posterior determinação de F, Cl, Br e I. A complexidade da matriz e as particularidades dos halogênios, quanto à etapa de preparo de amostra, envolvem algumas dificuldades e, neste trabalho, o método utilizado apresentou exatidão adequada, praticidade, simplicidade e adequação às análises de rotina.

Dentre algumas vantagens do método proposto é possível destacar, principalmente, a utilização de H_2O_2 como agente oxidante. O uso desse reagente gera água como um dos únicos produtos de sua decomposição, o que está de acordo com os principais fundamentos da química verde devido à baixa toxicidade e baixa acidez dos digeridos finais. Além disso, apresenta frequência analítica adequada (podendo ser decompostas 5 amostras diferentes ao mesmo tempo), baixos LOQs e a concentração de C nos digeridos finais é adequada para determinação em técnicas baseadas em plasma (ICP-MS).

Portanto, a partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o método de decomposição com H_2O_2 em meio alcalino usando SRC de alta pressão para posterior determinação de halogênios em mel é aplicável e possui exatidão adequada quando ensaios de recuperação, decomposição de RMs e método comparativo foram empregados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camargo, R. C. R., Pereira, F. M., Lopes, M. T. R., Wolff, L. F. Mel: Características e propriedades, 1ª ed., Embrapa, Teresina, 2006, 30 p.
2. United States Department of Agriculture (USDA), Agriculture Handbook Number 335 - Beekeeping in the United States, 1980.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78_mel.htm. Acessado em: 15/01/2016.
4. Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy), *Food Chemistry* 107 (2008) 1553-1560.
5. Pohl, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 117-128.
6. Mello, P. A., Barin, J. S., Duarte, F. A., Bizzi, C. A., Diehl, L. O., Muller, E. I., Flores, E. M. M. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.
7. Krug, F. J. Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar / Editado por Francisco José Krug, Piracicaba, 2010, 340 p.
8. Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., Soylak, M. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey, *Food Chemistry* 103 (2007) 325-330.
9. Nelson, D. L., Cox, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger, 5ª ed., 2011, 425 p.
10. Prystupa, J. Fluorine—A current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides, *Toxicology Mechanisms and Methods* 2 (2011) 103-170.
11. World Health Organization, A guide for programme managers, 2007, 12 p.
12. Joint FAO/WHO Expert consultation on human vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edn., 2004.

13. Costa, V. C., Picoloto, R. S., Hartwig, C. A., Mello, P. A., Flores, E. M. M., Mesko, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.
14. Mesko, M. F., Moraes, D. P., Barin, J. S., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M. Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.
15. Pereira, J. S. F., Moraes, D. P., Antes, F. G., Diehl, L. O., Santos, M. F. P., Guimarães, R. C. L., Fonseca, T. C. O., Dressler, V. L., Flores, E. M. M. Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.
16. Muller, A. L. H., Mello, P. A., Mesko, M. F., Duarte, F. A., Dressler, V. L., Muller, E. I., Flores, E. M. M. Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.
17. Bu, X., Wang, T., Hall, G. Determination of halogens in organic compounds by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 1443-1451.
18. Montaser, A. Inductively coupled plasma spectrometry, Wiley-VCH, 1998, 1004 p.
19. Dressler, V. L., Pozebon, D., Flores, E. L. M., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M. Potentiometric determination of fluoride in geological and biological samples following pyrohydrolytic decomposition, *Analytica Chimica Acta* 466 (2002) 117-123.
20. Krishna, M. V. B., Rao, S. V., Murthy, V. S. N., Karunasagar, D. A simple UV-photolysis digestion method for the determination of fluoride in fluorine-containing drugs by ion-selective electrode and spectrophotometry techniques, *Analytical Methods* 4 (2012) 1565-1572.
21. Holler, F. J., Skoog, D. A., Crouch, S. R. Princípios de Análise Instrumental, 6ª ed., Porto Alegre, 2009, 1056 p.
22. Harris, D. C. Análise Química Quantitativa, 7ª ed., Rio de Janeiro, 2008, 868 p.

23. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, 2nd edn., John Wiley & Sons, New York, 2000.
24. Flores, E. M. M. *Microwave - assisted sample preparation for Trace Element Determination*, Elsevier, Amsterdam, 2014, 401 p.
25. Arruda, M. A. Z. *Trends in Sample Preparation*, Nova Science Publishers, New York, 2006.
26. Schnetger, B., Muramatsu, Y. Determination of halogens, with special reference to iodine, in geological and biological samples using pyrohydrolysis for preparation and inductively coupled plasma mass spectrometry and ion chromatography for measurement, *Analyst* 121 (1996) 1627-1631.
27. Romarís-Hortas, V., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P. Microwave assisted extraction of iodine and bromine from edible seaweed for inductively coupled plasma-mass spectrometry determination, *Talanta* 79 (2009) 947-952.
28. Picoloto, R. S., Doneda, M., Flores, E. L. M., Mesko, M. F., Flores, E. M. M., Mello, P. A. Simultaneous determination of bromine and iodine in milk powder for adult and infant nutrition by plasma based techniques after digestion using microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.
29. Mesko, M. F., Mello, P. A., Bizzi, C. A., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M. Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.
30. Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Barin, J. S., Knapp, G. Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.
31. Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Diehl, L. O., Mesko, M. F., Dressler, V. L., Paniz, J. N. G., Knapp, G., Flores, E. M. M. Evaluation of sample preparation methods for elastomer digestion for further halogens determination, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 563-570.
32. Flores, E. M. M., Muller, E. I., Duarte, F. A., Grinberg, P., Sturgeon, R. E. Determination of trace elements in fluoropolymers after microwave-induced combustion, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 374-380.

33. Wurfels, M., Jackwerth, E., Stoepler, M. Residues from biological-materials after pressure decomposition with nitric acid .1. Carbon conversion during sample decomposition, *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 1-16.
34. Di Narda, F., Toniolo, R., Bontempelli, G. Improved microwave digestion procedure for inductively coupled plasma mass spectrometric determinations of inorganic bromide residues in foodstuffs fumigated with methyl bromide, *Analytica Chimica Acta* 436 (2001) 245-252.
35. Mattos, I. L., Shiraishi, K. A., Braz, A. D., Fernandes, J. R. Hydrogen peroxide: Importance and determination, *Quimica Nova* 26 (2003) 373-380.
36. Chang, R., Goldsby, K. A., Química, 11^a ed., Porto Alegre, 2013, 1135 p.
37. Denbsky, G. Schnelle und nahezu verlustfreie NaBverasehung biologischen materials mit wasserstoffperoxid unter anwendung hoher temperaturen und drucke, *Zeitschrift für Analytische Chemie* 267 (1973) 350-355.
38. Denbsky, G. Schnelle NaI3veraschung biogener fette, ole und wachse sowie lipidreicher lebensmittel mit wasserstoffperoxid unter anwendung hoher temperaturen und drucke, *Zeitschrift für Analytische Chemie* 277 (1975) 375-375.
39. Matusiewicz, H., Barnes, R. M. Tree ring wood analysis after hydrogen peroxide pressure decomposition with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and electrothermal vaporization, *Analytical Chemistry* 57 (1985) 406-411.
40. Alcock, N. W. A hydrogen-peroxide digestion system for tissue trace-metal analysis, *Biological Trace Element Research* 13 (1987) 363-370.
41. Jin, F., Yun, J., Li, G., Kishita, A., Tohji, K., Enomoto, H. Hydrothermal conversion of carbohydrate biomass into formic acid at mild temperatures, *Green Chemistry* 10 (2008) 612-615.
42. Olivares, J. A., Houk, R. S. Suppression of analyte signal by various concomitant salts in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 58 (1986) 20-25.
43. Rodushkin, I., Ruth, T., Klockare, D. Non-spectral interferences caused by a saline water matrix in quadrupole and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 159-166.

44. Agatemor, C., Beauchemin, D. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review, *Analytica Chimica Acta* 706 (2011) 66-83.
45. Pullanikat, P., Jung, S. J., Yoo, K. S., Jung, K. W. Oxidative degradation of reducing carbohydrates to ammonium formate with H₂O₂ and NH₄OH, *Tetrahedron Letters* 51 (2010) 6192-6194.
46. Milestone Srl, UltraWAVE, Operator Manual, 2013.
47. Muller, A. L. H., Bizzi, C. A., Pereira, J. S. F., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Flores, E. M. M., Muller, E. I. Bromine and chlorine determination in cigarette tobacco using microwave-induced combustion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22 (2011) 1649-1655.
48. Pereira, J. S. F., Pereira, L. S. F., Schmidt, L., Moreira, C. M., Barin, J. S., Flores, E. M. M. Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.
49. Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., Vanhaecke, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.