



UFSM

Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE**

Rochele Sogari Picoloto

PPGQ

Santa Maria, RS - Brasil

2014

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE**

por

ROCHELE SOGARI PICOLOTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, **Área de Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS**.

Santa Maria, RS - Brasil

2014

**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 Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA E FORNO DE GRAFITE**

elaborada por

ROCHELE SOGARI PICOLOTO

Como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências - Área de Química Analítica

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Érico Marlon de Moraes Flores - Orientador (UFSM - RS)

Dr. Julio Cezar Paz de Mattos (Polimate)

Dr. Edson Irineu Müller (UFSM - RS)

Dr. Juliano Smanioto Barin (UFSM - RS)

Valderi Luiz Dressler (UFSM - RS)

Santa Maria, 28 de abril de 2014.

***"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."***

Bertolt Brecht.

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria**, pela possibilidade de execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação, apoio e confiança depositada em mim durante todos estes anos de convívio, pela amizade e pelo grande exemplo profissional.

Aos Profs. Drs. **Fábio Andrei Duarte** e **Márcia Foster Mesko** pela co-orientação, pelo exemplo de dedicação, amizade e por contribuírem para minha formação.

Ao Dr. **Julio Cezar Paz de Mattos**, pelas sugestões feitas para aprimoramento deste trabalho e pela participação como banca examinadora.

Ao Prof. Dr. **Juliano Smanioto Barin**, pelos ensinamentos, pela amizade construída ao longo desses anos e pela participação como banca examinadora.

Ao Prof. **Edson Irineu Müller**, pelas sugestões feitas para aprimoramento deste trabalho e pela participação como banca examinadora.

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler**, pelos conhecimentos transmitidos ao longo desse tempo e pela participação como banca examinadora.

Aos Profs. Drs. **José Neri Gottfried Paniz**, **Paola Azevedo Mello** e **Cezar Augusto Bizzi**, pela amizade, exemplo profissional e por contribuições para minha formação.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir** e **Valéria**, pelo auxílio e atenção dedicados.

Aos colegas do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) pelo convívio, amizade e auxílio durante todos esses anos, em especial a **Liange de Oliveira Diehl**, **Matheus Augusto Gonçalves Nunes** e **Lucas Schmidt** e também à **Michele Stéfani Petters Enders** e à **Sindy Raquel Krzyzaniak** que auxiliaram diretamente na execução deste trabalho.

Aos meus pais **Benjamim** (*in memoriam*) e **Marieta** e as minhas irmãs **Marilá** e **Carina**, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem e incentivarem minhas decisões.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Determinação de halogênios em amostras biológicas.....	18
2.2. Métodos de preparo de amostra orgânicas para posterior determinação de halogênios.....	19
2.3. Principais técnicas analíticas utilizadas para determinação de halogênios em amostras biológicas.....	22
2.4. Determinação de halogênios em amostras biológicas por espectrometria de absorção molecular.....	25
2.4.1. Mecanismos envolvidos na formação de moléculas diatômicas em fase vapor.....	27
2.5. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e análise direta de sólidos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Instrumentação.....	35
3.2. Reagentes.....	37
3.3. Amostras.....	38
3.4. Tratamento dos Resultados.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Amostras.....	41
4.1.1. Caracterização da amostra de leite em pó.....	45
4.2. Determinação de flúor por HR-CS-MAS.....	46
4.2.1. Escolha da molécula para a determinação de flúor por absorção molecular.....	46
4.2.1.1. Uso da molécula de GaF.....	46
4.2.1.2. Uso da molécula de CaF.....	47

4.2.1.3. Influência da adição de Ca sobre a absorção molecular de CaF.....	48
4.2.1.4. Curvas de pirólise e vaporização.....	49
4.2.1.5. Sinais de absorção molecular - CaF.....	53
4.2.1.6. Influência de outros íons presentes na amostra na formação da molécula CaF.....	54
4.2.1.7. Efeito da massa de amostra.....	57
4.2.1.8. Curva de calibração para determinação de flúor por HR-CS-MAS.....	60
4.2.1.9. Determinação de F em amostra biológica e CRM por HR-CS-MAS.....	61
4.3. Determinação de cloro por HR-CS-MAS.....	64
4.3.1. Escolha da molécula para a determinação de cloro por absorção molecular.....	64
4.3.2. Curvas de pirólise e vaporização.....	66
4.3.3. Influência da adição de Al e Sr sobre a absorção molecular de AlCl.....	67
4.3.4. Sinais obtidos pela absorção molecular de AlCl.....	70
4.3.5. Curva de calibração para determinação de cloro por HR-CS-MAS.....	71
4.4. Determinação de bromo por HR-CS-MAS.....	75
4.4.1. Escolha da molécula para a determinação de bromo por absorção molecular.....	75
4.4.2. Influência da adição de Ca e Pd na absorção molecular de CaBr.....	76
4.4.3. Curvas de pirólise e vaporização.....	78
4.4.4. Influência de F e Cl na formação da molécula CaBr.....	79
4.4.5. Sinais obtidos pela absorção molecular de CaBr.....	81
4.4.6. Estudo para eliminação da interferência de Cl na determinação de Br por HR- CS-MAS.....	82
4.4.7. Curva de calibração para determinação de bromo por HR-CS-MAS.....	82
4.5. Determinação de iodo por HR-CS-MAS.....	84
4.5.1. Escolha da molécula para a determinação de iodo por absorção molecular.....	84
4.5.2. Influência da adição de Ba sobre a absorção molecular de BaI.....	85
4.5.3. Curvas de pirólise e vaporização.....	86
4.5.4. Influência de F e Cl na formação da molécula BaI.....	87
4.5.5. Curva de calibração para determinação de iodo por HR-CS-MAS.....	89
4.5.6. Sinais obtidos pela absorção molecular de BaI.....	90
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	(A) sistema manual para introdução de amostras sólidas e (B) pinça para introdução da plataforma de grafite no interior do tudo de grafite.....	36
Figura 2.	Influência da massa de Ca (0 a 200 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do CaF (sinal integrado em área). Ensaio usando: ■ solução contendo 5 ng de F (10 μL de solução contendo 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de F, eixo y da direita) e usando ■ amostra de leite contendo 10 ng de F (1 mg de leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F, eixo y da esquerda); temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão.....	48
Figura 3.	Curvas de temperaturas de pirólise e vaporização para F em ■ solução de referência aquosa contendo 5 ng de F (10 μL de solução contendo 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de F, eixo y da direita) e curvas de pirólise e vaporização para ■ amostra de leite em pó contendo 10 ng de F (1 mg de leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, eixo y da esquerda) + 40 μg de Ca. Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: 700 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: 2250 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações; barras verticais representam o desvio padrão.....	50
Figura 4.	Sinais de absorção molecular obtidos usando: a) 10 ng de F a partir de uma solução de referência em meio aquoso (10 μL da solução contendo 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de F); e, b) 10 ng de F a partir da amostra de leite em pó (1 mg da amostra contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$). Condições empregadas: 40 μg de Ca; Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 2200 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.....	53
Figura 5.	Influência de outros íons sobre o sinal de absorção molecular do CaF em solução aquosa. Condições utilizadas: solução contendo 5 ng de F (10 μL da solução contendo 500 $\mu\text{g L}^{-1}$); 40 μg de Ca (10 μL da solução contendo 4 g L^{-1}); 10 μL da solução contendo a espécie interferente. As setas (→) indicam a concentração dos elementos na amostra de leite em pó	56
Figura 6.	Influência da massa de amostra na determinação de F por HR-CS-MAS. Amostra: leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F; 40 μg de Ca (10 μL da solução contendo 4 g L^{-1} de Ca). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 2200 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente	58
Figura 7.	Resíduo da amostra de leite em pó após a determinação de F por HR-CS-MAS. Abaixo de cada plataforma está identificada a massa (mg) de amostras de leite em pó utilizada. Ciclo de aquecimento: 900 $^{\circ}\text{C}$ na etapa de pirólise e 2200 $^{\circ}\text{C}$ na etapa de formação da molécula.	59
Figura 8.	Curva de calibração para F usando em soluções de referência aquosa. Volume de solução padrão: 10 μL + 40 μg de Ca (10 μL da solução contendo 4 g L^{-1}). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 2200 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.....	61
Figura 9.	Curvas de temperaturas de pirólise e vaporização para Cl usando — solução de referência aquosa contendo 250 ng de Cl (10 μL de solução contendo 25 mg L^{-1} de Cl, eixo y da direita) e curvas de pirólise e vaporização usando — músculo bovino (NIST 8414) contendo 940 ng (, 0,5 mg do contendo 0,188 \pm 0,015 % de Cl, eixo y da esquerda) + 2 μg de Al + 20 μg de Sr. Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: 700 $^{\circ}\text{C}$; e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: 2100 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão..	67

- Figura 10.** Influência da massa de Al (0 a 4 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do AlCl (sinal integrado em área). Ensaio usando: \square 250 ng de Cl (10 μL de solução contendo 25 mg L^{-1} de Cl, eixo y da direita) e \blacksquare usando amostra sólida de CRM de músculo bovino contendo 940 ng de Cl (0,5 mg do CRM de músculo bovino 0,188 \pm 0,015 % de Cl, eixo y da esquerda); temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão..... 68
- Figura 11.** Influência da massa de Sr (0 a 40 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do AlCl (sinal integrado em área). Ensaio usando: \square solução contendo 250 ng de Cl (10 μL de solução contendo 25 mg L^{-1} de Cl, eixo y da direita) e \blacksquare amostra de CRM de músculo bovino contendo 940 ng de Cl (0,5 mg do CRM de músculo bovino 0,188 \pm 0,015 % de Cl, eixo y da esquerda); temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão..... 69
- Figura 12.** Sinal de absorção molecular obtidos usando: a) 1000 ng de Cl a partir de uma solução de referência em meio aquoso (10 μL da solução contendo 100 mg L^{-1} de Cl); e, b) 940 ng de Cl a partir da amostra de músculo bovino (0,5 mg da amostra contendo 0,188 \pm 0,015 %). Condições empregadas: 2 μg de Al + 20 μg de Sr. Temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente..... 70
- Figura 13.** Curva de calibração para Cl, como AlCl, usando CRM NIST 8414 (músculo bovino) contendo 0,188 \pm 0,015 % de Cl) + 2 μg de Al + 20 μg de Sr. Temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente..... 71
- Figura 14.** Influência da massa de amostra na determinação de Cl, como AlCl, por HR-CS-MAS. Amostra de músculo bovino (NIST 8414, Cl = 0,188 \pm 0,015%) + 2 μg de Al + 20 μg de Sr. Temperatura de pirólise e vaporização de 700 $^{\circ}\text{C}$ e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente..... 72
- Figura 15.** Influência da massa de Ca (0 a 600 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do CaBr (sinal integrado em área). Ensaio usando solução contendo 100 ng de Br (10 μL de solução contendo 10 mg L^{-1} de Br) e 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL da solução contendo 3000 mg L^{-1} de Pd). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão..... 76
- Figura 16.** Influência da massa de Pd (0 a 60 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do CaBr (sinal integrado em área). Ensaio usando solução contendo 100 ng de Br (10 μL de solução contendo 10 mg L^{-1} de Br) e 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Pd). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão..... 77
- Figura 17.** Curvas temperatura de pirólise e vaporização para Br em solução de referência aquosa contendo 100 ng de Br (pela adição de 10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de Br), 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Ca) e 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL de Pd contendo 3000 mg L^{-1}). Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: 1100 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: 2100 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações; barras verticais representam o desvio padrão..... 78

- Figura 18.** Influência de cloro sobre o sinal de absorção molecular do CaBr em solução aquosa. Condições utilizadas: 100 ng de Br (pela adição de 10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de Br), 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Ca) e 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL de Pd contendo 3000 mg L^{-1}). A temperatura de pirólise durante a curva de vaporização foi de 900 $^{\circ}\text{C}$; a temperatura de vaporização durante a curva de pirólise foi de 1900 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão..... 80
- Figura 19.** Sinal de absorção molecular obtidos usando: a) 100 ng de I a partir de uma solução de referência em meio aquoso (10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de Cl); e, b) 20 ng de I a partir da amostra de leite em pó (1 mg da amostra contendo 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Br). Condições empregadas: 300 μg de Ca e 30 μg de Pd. Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: 900 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: 1900 $^{\circ}\text{C}$ 81
- Figura 20.** Curva de calibração para Br usando em soluções de referência aquosa. Condições utilizadas: 10 μL da solução de referência aquosa contendo Br; 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Ca); e, 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL de Pd contendo 3000 mg L^{-1}). Cada valor representa a média de 3 determinações. Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente..... 83
- Figura 21.** Influência da massa de Ba (0 a 400 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do BaI (sinal integrado em área). Ensaios usando solução contendo 100 ng de I (10 μL de solução contendo 10 mg L^{-1} de I) e temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 2000 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão..... 85
- Figura 22.** Curvas de pirólise e vaporização para I em solução de referência aquosa contendo 100 ng de I (pela adição de 10 μL de solução contendo 10 mg L^{-1} de I) e 100 μg de Ba (pela adição de 10 μL da solução contendo 10 g L^{-1} de Ba). Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização foi de 600 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura de vaporização durante a curva de pirólise foi de 2000 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão..... 87
- Figura 23.** Influência de cloro sobre o sinal de absorção molecular do BaI em solução aquosa. Condições utilizadas: solução contendo 100 ng de I (10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de I), 100 μg de Ba (10 μL da solução contendo 10 g L^{-1}) e 10 μL das soluções contendo de 0,25 a 10 mg L^{-1} de Cl. Cada barra representa a média de 3 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão..... 88
- Figura 24.** Curva de calibração para I usando em soluções de referência aquosa. Condições utilizadas: 10 μL da solução de referência aquosa contendo I e 100 μg de Ba (10 μL da solução contendo 10 g L^{-1}). Cada valor representa a média de 3 determinações. Temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente..... 89
- Figura 25.** Sinal de absorção molecular obtidos usando: a) 100 ng de Br a partir de uma solução de referência em meio aquoso (10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de Cl); e, b) 1 ng de Br a partir da amostra de leite em pó (1 mg da amostra contendo $1,08 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ de I). Condições empregadas: 100 μg de Ba. Temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente..... 90
- Figura 26.** Condições escolhidas para a determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS. (T_p e T_v: temperaturas de pirólise e vaporização, respectivamente)..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Aplicações envolvendo a determinação de Cl, F, Br e I por absorção molecular em forno de grafite empregando espectrômetro de absorção atômica com fonte de linhas.....	31
Tabela 2.	Aplicações envolvendo a determinação de Cl, F, Br e I por absorção molecular em forno de grafite empregando espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua.....	32
Tabela 3.	Comprimentos de onda usados para a determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS.....	35
Tabela 4.	Programas de aquecimento utilizados para determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS.....	40
Tabela 5.	Concentração de F, Cl, Br e I em leite em pó integral, após a decomposição por MIC como método de pré-concentração dos analitos. Determinação de Cl, Br e I por ICP-MS, F por ISE e F, Cl, Br e I por IC (média \pm desvio padrão em $\mu\text{g g}^{-1}$, $n = 3$).....	43
Tabela 6.	Concentração de F por IC e ISE em leite em pó integral após adição de 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F (média \pm desvio padrão em $\mu\text{g g}^{-1}$, $n = 3$).....	44
Tabela 7.	Caracterização da amostra de leite em pó integral.....	45
Tabela 8.	Concentração de Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S em leite em pó após a decomposição por MIC. Determinação por ICP OES. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$, $n = 3$	54
Tabela 9.	Determinação de F em leite em pó por HR-CS-MAS. Média \pm desvio padrão em $\mu\text{g g}^{-1}$, $n = 5$, as incertezas correspondem aos desvios padrão..	62
Tabela 10.	Parâmetros de mérito do método para determinação de F por HR-CS-MAS.....	63
Tabela 11.	Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes os métodos para determinação de F por HR-CS-MAS.....	63
Tabela 12.	Determinação de Cl em amostras biológicas por HR-CS-MAS. Resultados em %, $n = 5$ (as incertezas correspondem aos desvios padrão).....	73
Tabela 13.	Parâmetros de mérito do método para determinação de Cl por HR-CS-MAS.....	74
Tabela 14.	Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes métodos para determinação de Cl por HR-CS-MAS.....	74
Tabela 15.	Parâmetros de desempenho do método para determinação de Br por HR-CS-MAS.....	84
Tabela 16.	Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes os métodos para determinação de Br por HR-CS-MAS.....	84
Tabela 17.	Parâmetros de mérito do método para determinação de I por HR-CS-MAS.	91
Tabela 18.	Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes os métodos para determinação de I por HR-CS-MAS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	espectrometria de absorção atômica
CCD	dispositivos de carga acoplada
GF	forno de grafite
HCL	lâmpada de cátodo oco
HR-CS-MAS	espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua
IC	cromatografia de íons
ICP OES	espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
ISE	eletrodo íon seletivo
GF-MAS	espectrometria de absorção molecular em forno de grafite
LOD	limite de detecção
LOQ	limites de quantificação
M	elemento metálico
MAS	espectrometria de absorção molecular
MIC	combustão iniciada por micro-ondas
m_0	massa característica
MW-AD	decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas
MX	molécula diatômica
NAA	análise por ativação neutrônica
NIST	National Institute of Standards and Technology
RSD	desvio padrão relativo

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para a determinação de F, Cl, Br e I por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS-MAS) em forno de grafite. Os métodos foram aplicados para a determinação de halogênios em amostras biológicas. A determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS foi baseada na medida da absorção molecular das moléculas diatômicas de CaF, AlCl, CaBr e BaI, respectivamente, formadas em fase vapor, na presença de um excesso de modificador químico. As temperaturas de pirólise e vaporização ajustadas no forno de grafite foram 900 e 2200 °C para F, 700 e 2100 °C para Cl, 900 e 1900 °C para Br e 600 e 1900 °C para I, respectivamente. As medidas de absorvância para F, Cl, Br e I foram feitas em 606,440, 261,418, 625,315 e 538,308 nm, respectivamente. Para a determinação de F, Br e I a calibração do equipamento foi feita com soluções de referência aquosas e, para a determinação de Cl, a calibração foi feita com o uso do material de referência certificado (CRM) NIST 8414 (músculo bovino). A exatidão do método proposto foi avaliada pela determinação de F, Cl, Br e I em CRMs e por comparação com a determinação por métodos independentes, (ICP-MS e ISE), após a decomposição por combustão iniciada por micro-ondas. Os resultados obtidos para F e Cl em amostras biológicas foram concordantes com os valores certificados e com resultados obtidos por outras técnicas independentes. Não foi possível fazer a determinação de Br e I na amostra sólida, possivelmente devido às interferências causadas pelo excesso de Cl nas amostras, o que levou à supressão do sinal analítico. Os limites de detecção dos métodos para determinação de F e Cl por HR-CS-MAS foram de 0,72 e 34 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Os limites de detecção instrumentais para Br e I foram 1,95 e 3,01 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

INTRODUÇÃO

A determinação de halogênios em amostras biológicas tem sido de grande interesse, principalmente devido ao efeito ambíguo destes elementos na saúde humana. Alguns desses elementos caracterizam-se por serem essenciais aos seres vivos e, por outro lado, concentrações elevadas de F, Cl, Br e I podem causar diversos problemas a saúde. A falta de F pode trazer sérios danos à saúde oral, enquanto elevadas concentrações desse elemento podem causar fluorose. O cloro auxilia o transporte de compostos no organismo, enquanto a sua falta pode acarretar na carência de nutrientes no organismo. Apesar do Br ainda não ter seu mecanismo no organismo totalmente elucidado, devido as suas similaridades químicas com o iodo, este pode influenciar no funcionamento da glândula tireoide e, conseqüentemente, trazer danos ao funcionamento desse órgão. Além disso, algumas espécies de Br são carcinogênicas. Em relação ao I, sua importância está majoritariamente relacionada ao funcionamento da glândula tireoide e sua falta, ou excesso, no organismo pode resultar em danos a esse órgão.¹⁻⁴

Apesar da importância relacionada com a presença de halogênios no organismo, principalmente com respeito às fontes potenciais de exposição humana, a determinação de halogênios em amostras biológicas ainda é um desafio analítico. Diversas técnicas analíticas podem ser empregadas para a determinação desses elementos e, devido aos grandes avanços da instrumentação analítica, é possível a determinação em concentrações cada vez mais baixas. Entretanto, a maior parte dos equipamentos requer que a amostra esteja em uma forma de solução para análise. Neste caso, a amostra geralmente deve ser convertida para a forma líquida, adequada ao uma vez que o sistema de introdução de amostras, comumente presente nos instrumentos analíticos, permite a introdução de soluções.

A etapa de preparo de amostras é, normalmente, a mais morosa da sequência analítica. A esta etapa são atribuídos o maior número de erros analíticos, bem como os principais riscos de contaminação. Os métodos de preparo de amostra para a posterior determinação de halogênios são bastante suscetíveis a perdas por volatilização e/ou recuperações incompletas dos analito. A fusão e a combustão por via seca são métodos simples e que apresentam elevada eficiência na decomposição de elevadas massas de amostra. Porém, por se tratarem de sistemas abertos, e que operam a elevada temperatura

¹ Prystupa, J., *Toxicol. Mech. Methods* 21 (2011) 103-170

² FAO/WHO 2nd edn. (2004)

³ Lag, M. et al., *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1991) 528-534

⁴ Zimmermann, M. B., Jooste, P. L., Pandav, C. S., *Lancet* 372 (2008) 1251-1262

são mais suscetíveis a problemas relacionados a perdas de analito e/ou contaminação. Os métodos de decomposição por via úmida que empregam ácidos concentrados, geralmente levam à formação de espécies voláteis dos halogênios e, conseqüentemente, a perdas de analito por volatilização. Os métodos de combustão permitem que sejam empregadas soluções alcalinas para reter os analitos após a eliminação da matriz. Entretanto, apresentam algumas desvantagens, como a baixa frequência analítica (frasco de Shöniger e bomba de combustão), a necessidade de maior manipulação da amostra, a utilização de um ignitor que pode atuar como fonte de contaminação, dentre outros aspectos. A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) permite minimizar alguns desses problemas, mas ainda ocorre a diluição da amostra, o que é ainda mais crítico quando o analito está presente em baixas concentrações.⁵

Algumas técnicas com amostragem de sólidos podem ser usadas para a determinação de halogênios. Estas técnicas dispensam a etapa prévia de decomposição de amostra, como é o caso da análise por ativação neutrônica. Entretanto, em alguns casos, são inadequadas por não apresentam sensibilidade suficiente para a determinação de halogênios em baixas concentrações e não estarem disponíveis na maioria dos laboratórios. Por outro lado, as técnicas analíticas com sensibilidade adequada para determinação de halogênios, como cromatografia de íons (IC), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), eletrodo íon seletivo (ISE), dentre outras, apresentam as desvantagens relacionadas com a amostragem de solução, fazendo-se necessária a aplicação de uma etapa de preparo de amostras.

O desenvolvimento de estudos baseados na espectrometria de absorção molecular em forno de grafite (GF-MAS) permitiu a determinação de halogênios em baixa concentração. A técnica envolvendo a absorção molecular em fase vapor foi desenvolvida em meados de 1970, principalmente, para a determinação de não metais, como fósforo, enxofre e halogênios. Essa técnica baseia-se na absorção de moléculas diatômicas formadas entre um elemento não metálico e um metal em fase vapor que apresentam bandas de absorção molecular muito finas, comparadas às linhas atômicas. Por meio da GF-MAS e empregando espectrômetros de baixa resolução, pode-se quantificar F, Cl, Br e I usando uma lâmpada de cátodo oco (HCL) com emissão de radiação no respectivo comprimento de onda de absorção da molécula. Recentemente, com o desenvolvimento da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite

⁵ Flores, E. M. M. *et al.*, in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 252-255

(HR-CS-AAS), as lâmpadas de HCL foram substituídas pelo uso de uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão. Essa lâmpada emite radiação intensa de 185 a 900 nm, permitindo a utilização de uma única fonte para toda faixa espectral. O monocromador, de alta resolução, permite separar mais eficientemente a linha de absorção do analito das linhas dos interferentes, praticamente resolvendo todos os problemas de interferência espectral que comprometiam a utilização dos equipamentos de baixa resolução. Além disso, espectrômetros de absorção atômica mais modernos permitem também a amostragem direta de sólidos para a determinação de halogênios em amostras biológicas dispensando a aplicação de uma etapa de digestão de amostras, previamente à determinação dos analito.⁶

Com base nas considerações acima, no presente trabalho foi feito o desenvolvimento de um método empregando MAS para a determinação de F, Cl, Br e I em amostras biológicas, usando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua e forno de grafite. O desafio analítico proposto no presente trabalho consiste em fazer a introdução de amostras sólidas diretamente no forno de grafite para determinação de halogênios em amostras biológicas sem a necessidade de aplicação de uma etapa previa de decomposição de amostra. A exatidão do método foi avaliada pelo uso de materiais de referência certificados (CRMs) e pela comparação com resultados obtidos por técnicas alternativas.

⁶ Welz, B. et al., High Resolution Continuum Source AAS, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão abordados os principais aspectos relacionados aos problemas causados pelos halogênios, bem como sua importância na saúde humana. Posteriormente serão apresentadas as técnicas analíticas mais amplamente empregadas para determinação de F, Cl, Br e I e, também, os métodos de preparo de amostra geralmente utilizados para decomposição de amostras biológicas visando à posterior determinação de halogênios. Será apresentada uma revisão acerca da utilização da espectrometria de absorção molecular para determinação de halogênios, bem como as principais aplicações.

2.1. Determinação de halogênios em amostras biológicas

O consumo de alimentos que contenham flúor é importante para assegurar uma boa saúde oral. Por outro lado, o excesso de F no organismo pode aumentar o risco de fluorose, principalmente em crianças. A ingestão diária recomendada varia de 0,05 a 1 mg kg⁻¹ dia⁻¹, mas é importante salientar que são apenas quantidades recomendadas e que valores exatos ainda são desconhecidos.¹

Cloro também desempenha um papel fundamental no organismo, pois muitos nutrientes são transportados quando associados a este elemento, na forma de cloretos. A ausência de cloro pode acarretar em carência dos nutrientes por alguma parte do organismo, enquanto que o excesso de sal (NaCl) pode levar a problemas relacionados com pressão arterial.²

Em relação a bromo, poucas informações estão disponíveis na literatura a respeito do seu mecanismo no organismo. Há indícios que ele possa inibir o transporte do iodo até a glândula tireoide, prejudicando o funcionamento da mesma. Além disso, pode provocar efeitos carcinogênicos, quando presente na forma de BrO₄²⁻.³

Iodo é um dos elementos químicos essenciais ao organismo humano, cuja principal função está diretamente relacionada ao funcionamento da glândula tireoide. A deficiência desse elemento pode acarretar em problemas relacionados ao crescimento e desenvolvimento humano e, por outro lado, o excesso deste elemento pode resultar no desequilíbrio desta glândula.⁴

O conhecimento da concentração de halogênios em amostras biológicas é importante e diversas técnicas analíticas estão disponíveis para sua determinação. Porém, a maior parte delas requer que a amostra esteja na forma de uma solução, para que a mesma seja introduzida no instrumento de medida. Cabe destacar que a necessidade de se trabalhar com soluções, deve-se ao fato que a maioria dos equipamentos empregados para determinação de halogênios, assim como outros elementos são adequadas para a análise de amostras líquidas ou soluções. Assim, a determinação de halogênios em uma amostra sólida implica na utilização de um procedimento que vise à decomposição da amostra e, conseqüentemente, à obtenção dos analitos em uma solução que deve ser compatível com a técnica de determinação.

A seguir, serão apresentados os métodos de preparo de amostras mais amplamente empregados para a decomposição de amostras orgânicas e obtenção dos analitos em

¹ Prystupa, J., *Toxicol. Mech. Methods* 21 (2011) 103-170

² FAO/WHO 2nd edn. (2004)

³ Lag, M. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1991) 528-534

⁴ Zimmermann, M. B., Jooste, P. L., Pandav, C. S., *Lancet* 372 (2008) 1251-1262

solução e, posteriormente, as principais técnicas disponíveis para determinação de halogênios em amostras biológicas.

2.2. Métodos de preparo de amostra orgânicas para posterior determinação de halogênios

Diversos métodos de preparo de amostras podem ser empregados para a decomposição de amostras biológicas visando à posterior determinação de halogênios. Dentre os quais, destaca-se o uso da piroidrólise, decomposição por via úmida, métodos de extração em meio alcalino e métodos de combustão.⁷ A seguir, serão abordados brevemente os princípios de cada um dos métodos citados

A piroidrólise consiste em um método de decomposição de amostras em um tubo aquecido, na presença de vapor d'água e de um gás, que pode ser oxigênio, ar ou um gás inerte. Em elevadas temperaturas e na presença de água, os halogênios liberados da amostra, são convertidos, normalmente, em seus ácidos voláteis correspondentes.⁸ Essas espécies são carregadas pelo vapor d'água, por um condensador, até uma solução absorvedora. No processo da piroidrólise, a liberação do analito da amostra é dependente, basicamente, da temperatura e da forma química em que este se encontra na amostra. Assim, a liberação do analito pode ocorrer na faixa de 700 a 1400 °C, mas temperaturas em torno de 1000 °C são, geralmente, adequadas. Para alguns tipos de materiais, além da elevada temperatura, são utilizados reagentes auxiliares, como SiO₂, TiO₂, WO₃, Bi₂O₃, Al₂O₃ e V₂O₅ ou misturas desses, sendo o V₂O₅ o mais amplamente empregado. De maneira geral, o tempo de decomposição por piroidrólise pode variar de cerca de alguns minutos até algumas horas e a composição da mistura de amostra + reagente auxiliar varia de 1 + 3 a 1 + 5, respectivamente.^{5,9} A principal vantagem do uso desse sistema é que muitos óxidos e hidróxidos de metais são formados e permanecem no reator. Dessa forma, durante a piroidrólise ocorre uma separação dos analitos da matriz, a qual permanece no reator o que, em alguns casos, ajuda a minimizar problemas de interferência na etapa de determinação.^{8,10}

A decomposição de amostras por fusão está baseada no uso de um fundente adequado combinado com o emprego de elevadas temperaturas. Nestas condições, acontece a solubilização e/ou decomposição da amostra sólida no fundente e os analitos são liberados da matriz. Dentre os reagentes mais utilizados para esta finalidade, destacam-

⁵ Welz, B. *et al.*, High Resolution Continuum Source AAS, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005.

⁷ Arruda, M. A. Z., Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, New York, 2006.

⁸ Warf, J. C., Cline, W. D. Tevebaugh, R., *Anal. Chem.* 26 (1954) 342-346

⁹ Sulcek, Z., Povindra, P., Methods of decomposition in inorganic analysis, CRC Press, Boca Raton, EUA, 1989, pp 325-350

¹⁰ Schnetger, B., Muramatsu, Y., *Analyst*, 121 (1996) 1627-1631

se as bases, óxidos e sais inorgânicos e, em alguns casos, o uso de agentes oxidantes em proporções que variam de 1:2 a 1:50 (amostra:fundente). A maior quantidade de fundente em relação a amostra é usada para garantir que aconteça a completa interação entre a amostra e o fundente. A fusão, geralmente, é feita em cadinho de platina ou níquel e acontece em temperaturas que variam de 300 a 1000 °C. De maneira geral, o emprego dessas temperaturas é adequado para que aconteça a interação entre o fundente e a amostra. Após esta etapa, é obtido um sólido vítreo, geralmente solúvel em água ou ácidos inorgânicos (ex, HCl ou HNO₃). Dentre as vantagens relacionadas ao uso da fusão como método de preparo de amostra, destaca-se a possibilidade de decomposição de elevadas massas de amostra. Por outro lado, a solução final obtida da decomposição de amostra por fusão, geralmente, apresenta elevada concentração de fundente, o que pode causar interferências na etapa de determinação, as quais estão relacionadas à presença de elementos alcalinos e alcalinos terrosos presentes na solução final. Outra desvantagem está relacionada ao uso de sistema aberto para decomposição de amostra, onde o risco de perdas de analitos por volatilização e/ou contaminação é mais pronunciado.¹¹

A decomposição por via úmida utilizando ácidos concentrados também vem sendo empregada para a decomposição de amostras biológicas para a posterior determinação de halogênios. Nesse caso, são utilizados ácidos inorgânicos concentrados e/ou a mistura deles (HNO₃, HClO₄, H₂SO₄) e reagentes auxiliares como H₂O₂.⁵ Em alguns casos, ao final da etapa de decomposição é adicionado um agente redutor para minimizar o risco de perdas de halogênios pela formação de espécies voláteis formadas durante a decomposição da amostra. A decomposição de amostras biológicas acontece devido à eliminação da matéria orgânica pela ação oxidante do ácido inorgânico utilizado, geralmente, sob aquecimento. As formas de aquecimento empregadas nesses métodos de decomposição são: aquecimento convencional ou por micro-ondas. Blocos digestores são convenientemente empregados como fonte de aquecimento convencional. O aquecimento por micro-ondas faz uso de equipamentos especialmente desenvolvidos para este propósito (decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, MW-AD). O emprego da MW-AD resulta, geralmente, em melhor eficiência de decomposição, devido às condições drásticas que podem ser empregadas durante a decomposição da amostra.⁷ Esses equipamentos contam

¹¹ Costa, A. C. S. *et al.*, Decomposições e solubilização de sólidos inorgânicos in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 158-167

⁵ Flores, É. M. M. *et al.*, Decomposições de materiais orgânicos por via úmida in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 252-255

⁷ Arruda, M. A. Z., Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, New York, 2006

com dispositivos que permitem o emprego de maiores pressões e temperaturas, aumentando a eficiência de decomposição da amostra.^{12,13}

A MW-AD, em sistema fechado, apresenta diversas vantagens na decomposição de amostras biológicas, onde destaca-se a redução de perdas de analitos por volatilização e o risco de contaminação. Por outro lado, com respeito à determinação de halogênios, o meio ácido pode levar a perdas de F, Cl, Br e I devido a formação dos respectivos ácidos (HF, HCl, HBr e HI), os quais são voláteis e podem ser perdidos ao final do procedimento de decomposição.¹⁴

A decomposição de amostras orgânicas também tem sido feita de forma adequada pelo emprego de métodos de decomposição por combustão.¹⁵ Nesse caso, a decomposição acontece por uma reação de oxidação da matéria orgânica em que o O₂ atua como agente oxidante, convertendo a matéria orgânica à CO₂ e H₂O. Os gases gerados da decomposição da amostra são absorvidos em uma solução absorvedora adequada, onde ficam retidos os analitos. Essa solução pode ser escolhida de acordo com as características dos analitos. No caso dos halogênios, soluções absorvedoras alcalinas têm sido amplamente empregadas por minimizarem o risco de perdas de analitos por volatilização. Provavelmente, o método mais utilizado seja a combustão por via seca em forno mufla. Esse sistema consiste, basicamente em aquecer a amostra a temperaturas de, aproximadamente, 500 °C em um cadinho. Entretanto, embora esse procedimento seja bastante utilizado, podem ocorrer riscos de contaminação ou perdas de analitos.¹⁶⁻¹⁸

Com a finalidade de minimizar essas desvantagens da utilização dos frascos abertos de combustão, outros sistemas têm sido utilizados, onde se incluem os métodos convencionais de combustão, como bomba de combustão e frasco de Schöniger. No entanto, esses métodos não permitem que uma etapa de refluxo seja aplicada após a decomposição da amostra (exceto etapa manual). Além disso, a frequência analítica em ambos os casos é baixa, pois apenas uma amostra pode ser digerida a cada ciclo. Alternativamente aos métodos clássicos de combustão, a MIC tem sido aplicada para a decomposição de amostras biológicas para a posterior determinação e metais e não

¹² Flores, É. M. M. *et al.*, Decomposições de materiais orgânicos por via úmida in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 252-255

¹³ Nogueira, A. R. A. *et al.*, Decomposições assistidas por radiação micro-ondas in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 276-289

¹⁴ Di Narda, F., Toniolo, R., Bontempelli, G., *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 245-252

¹⁵ Souza, G. B. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2195-2201

¹⁶ Fecher, P.A., Ruhnke, G., *Anal. Bional. Chem.*, 373 (2002)787-791

¹⁷ Koh, S., Aoki, T., Katayama, Y., Takada, J., *J. Radional. Nucl. Chem.* 239 (1999) 591-594

¹⁸ Nadkarni, R. A., *Anal. Chem.* 52 (1980) 929-935

metais.¹⁹ Nesse método, a amostra é prensada, na forma de um comprimido, posicionada sobre a base de um suporte de quartzo sobre um disco de papel filtro umedecido com um iniciador de combustão (solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1}). Posteriormente, o suporte é inserido no frasco de quartzo contendo 6 mL da solução absorvedora.²⁰ Quando a radiação micro-ondas incide sobre essa solução inicia o processo de combustão da amostra. Os analitos liberados durante a decomposição da amostra são retidos em uma solução absorvedora adequada. No caso da posterior determinação de halogênios, as soluções diluídas de NH_4OH e NH_4CO_3 têm sido amplamente empregadas.²¹⁻²⁴

2.3. Principais técnicas analíticas utilizadas para determinação de halogênios em amostras biológicas

A determinação de halogênios em amostras biológicas pode ser considerada um desafio, principalmente, quando os analitos estão presentes em baixas concentrações. Isso é ainda mais crítico quando a instrumentação utilizada para determinação permite apenas a introdução de soluções aquosas. O procedimento de decomposição de amostra resulta na diluição da amostra, dificultando a determinação dos analitos presentes em baixas concentrações. Neste sentido, faz-se necessária a utilização de técnicas com elevada sensibilidade, que permitam a determinação desses elementos, mesmo quando presentes em concentrações na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$. Entre as técnicas mais utilizadas e que possuem sensibilidade adequada para a determinação de halogênios, destacam-se as técnicas com emprego de plasma como fonte de energia para excitação ou ionização (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, ICP OES; e, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS),^{22,25,26} coulometria,²⁷ cromatografia de íons (IC)²⁸ e potenciometria, utilizando eletrodo íon seletivo (ISE).²⁹

Dentre as técnicas mencionadas, é importante destacar o uso da IC, que recebe destaque devido à facilidade com que é feita a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. Essa técnica está baseada em um processo de separação dos

¹⁹ Flores, E. M. M., *et al.*, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3525-3529

²⁰ Juliano S. Barin *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, 29, 352-358

²¹ Flores, E. M. M. *et al.*, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1865-1870

²² Mesko, M. F. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1125-1131

²³ Moraes, D. P. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 563-570

²⁴ Flores, E. M. M. *et al.*, *Anal. Chem.* 85 (2013) 374-380

²⁵ Naozuka, J. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 917-921

²⁶ Muller, A. L. H. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012) 1889-1894

²⁷ Hernandez, H. A., Application note, AnalytikJena, Alemanha, 2005, em www.analytik-jena.de, acessado em 05/2014

²⁸ Pereira, J. S. F. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 249-252

²⁹ Careri, M., Mangia, A., Musci, M., *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 153-184

componentes da amostra entre duas fases: móvel e estacionária. O processo de separação acontece em função de interações das espécies presentes na amostra em ambas as fases. O mecanismo de interação com a fase estacionária é a troca iônica, onde as colunas utilizadas são constituídas por um grupo funcional carregado, ligado a uma matriz polimérica. A fase móvel também contém espécies iônicas ocorrendo, assim, uma competição entre a distribuição das espécies presentes na amostra entre as fases móvel e estacionária.³⁰ A IC tem sido usada para separação de cátions e ânions inorgânicos e orgânicos. Todavia, a separação e quantificação de halogênios, NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} tem sido o principal foco dos métodos reportados envolvendo essa técnica. Para a determinação de halogênios detectores amperiométricos, espectrofométricos no UV-VIS e de condutividade podem ser empregados. Porém, esse último recebe destaque em razão de sua simplicidade e universalidade de resposta.³¹

Por outro lado, para amostras biológicas, as quais apresentam elevada concentração de ânions, algumas interferências têm sido observadas na etapa de separação. A presença de elevada concentração ácida também pode interferir na separação dos analitos. Uma das alternativas encontradas para minimizar este tipo de interferência é aplicar uma etapa de diluição da amostra. Entretanto, isso leva a uma diluição da amostra que pode inviabilizar a determinação dos halogênios presentes, normalmente, em baixas concentrações em amostras biológicas.

A potenciometria utilizando eletrodo íon seletivo é uma técnica bastante utilizada para determinação de cloro e flúor e, também tem sido empregada para a determinação de bromo e iodo em diversos tipos de materiais. Os eletrodos íon-seletivos baseiam-se na diferença de potencial gerada pelo íon empregando uma membrana seletiva. A instrumentação utilizada apresenta baixo custo, sendo acessível em muitos laboratórios. Por outro lado, os limites de detecção (LODs) obtidos para todos os halogênios são relativamente altos, o que representa um inconveniente quando os analitos estão presentes em baixas concentrações. Além disso, essa técnica é bastante suscetível a interferências de outros íons presentes em solução, mesmo quando soluções de ajuste da força iônica são utilizadas. No caso do F, o ISE-F tem sido amplamente empregado juntamente com o tampão de ajuste da força iônica, permitindo que a determinação desse halogênio seja feita em diversos tipos de materiais.^{32,33} Porém, no caso de amostras biológicas, os halogênios, geralmente, estão presentes em concentrações consideravelmente mais baixas que o LOD da técnica.³⁴

³⁰ Meyer, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley and Sons: Saint Gallen 1998

³¹ Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, 2a ed. John Wiley & Sons, New York, 2000

³² Krishna, M. V. B. *et al.*, *Anal. Methods* 4 (2012) 1565-1572

³³ Dressler, V.L. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002)117-123

³⁴ Melicherick, J., Szijarto, L., Hill, A.R., *J. Dairy Sci.* 89 (2006) 934-937

As técnicas com plasma (ICP-MS e ICP OES) são bastante atrativas para a determinação de metais, não-metais e halogênios em amostras biológicas, devido a capacidade multielementar, ampla faixa linear e baixos limites de detecção. Essas técnicas são baseadas na ionização dos analitos em um plasma, que consiste em um gás parcialmente ionizado, atingindo temperaturas de até 10000 K. O argônio tem sido o gás mais utilizado para esse fim. No caso da determinação de halogênios por ICP-MS, os íons positivamente carregados, formados no plasma, são separados em um espectrômetro de massas de acordo com a sua razão m/z e, finalmente, conduzidos até o detector. Entretanto, essa técnica é suscetível a interferências causadas pela presença de alguns constituintes da matriz, como é o caso do carbono, que interfere principalmente na determinação de iodo.³⁵ Além disso, a determinação de cloro por ICP-MS pode ser afetada por interferências de espécies poliatômicas, como é o caso de $^{36}\text{Ar}^1\text{H}^+$ na determinação de cloreto ($^{37}\text{Cl}^+$). Esse tipo de interferência pode ser evitada pelo uso de uma cela dinâmica de reação e colisão e cela de colisão.³⁶

Nas determinações por ICP OES, a radiação emitida pelos halogênios durante as transições eletrônicas no plasma, é conduzida até o sistema óptico, onde a radiação de determinado comprimento de onda é separada e detectada.³⁷ Porém, a determinação de halogênios por ICP OES é menos comum que por ICP-MS, principalmente, devido aos piores LODs obtidos. Isso se deve às linhas de emissão mais sensíveis estarem localizadas em comprimentos de onda abaixo de 200 nm, sendo mais suscetíveis à interferência dos gases que constituem a atmosfera, como O_2 e N_2 . Cabe destacar que, mesmo os equipamentos de ICP OES que possuem um sistema óptico praticamente livre da presença de gases da atmosfera (óptica selada), os LODs obtidos são relativamente elevados, tornando inviável o emprego desta técnica para determinação de halogênios em baixas concentrações, em amostras biológicas.

Algumas técnicas que permitem a amostragem direta de sólidos, como a análise por ativação neutrônica (NAA), ou espectrometria de fluorescência de raios-X também podem ser empregadas para a determinação de halogênios. A NAA é uma técnica de análise elementar fundamentada na produção de radioisótopos, formados através de reações nucleares entre nêutrons e os átomos dos isótopos dos elementos que constituem a amostra.³⁸ Entretanto, para esse tipo de análise, é necessária uma estrutura relativamente complexa, como reatores nucleares e geradores de nêutrons. A NAA apresenta como

35 Grindlay, G. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 86 (2013) 42-49

36 Tanner, S. D., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1361-1452

37 Nölte, J., *ICP Emission spectrometry - a practical guide*, Wiley - VCH: New York, 2003

38 Kruger, P., *Principles of Activation Analysis*. Wiley Intescience, New Work, 1971 W. D. Ehmann, D. E. Vance radiochemistry and nuclear methods of analysis. John Wiley and Sons, New York, 1991

principais vantagens a capacidade de determinação multielementar e utilização de pouca quantidade de amostra. Por outro lado, a instrumentação tem um custo bastante elevado, dificultando o acesso para muitos laboratórios. Além disso, o tempo de análise é elevado, principalmente, para elementos cujo decaimento apresente um longo tempo de meia vida.³⁹⁻

⁴⁰

A espectrometria de fluorescência de raios-X está baseada na utilização de um feixe de radiação policromática que tem a função de excitar elétrons presentes na amostra. Um dos principais problemas dessa técnica é que a sensibilidade diminui com o aumento do número atômico do elemento e, em alguns trabalhos são observados problemas relacionados à calibração. Esta técnica vem sendo utilizada principalmente para amostras sólidas, permitindo a determinação simultânea ou sequencial de vários elementos, sem a necessidade de decomposição da amostra.⁴¹

Como alternativa para as técnicas de determinação previamente apresentadas nesta revisão, a espectrometria de absorção molecular com amostragem de sólidos em forno de grafite também vem sendo utilizada para a determinação de halogênios em diversas matrizes.⁴² A seguir, serão apresentados os principais fundamentos relacionados a espectrometria de absorção molecular para a determinação de halogênios em diversos tipos de amostras.

2.4. Determinação de halogênios em amostras biológicas por espectrometria de absorção molecular

A espectrometria de absorção molecular (MAS) é uma técnica que foi desenvolvida nos anos 70 para permitir a determinação de não metais, como enxofre, fósforo e halogênios. Inicialmente, foram empregados espectrômetros de absorção atômica com fonte de linhas, para essa finalidade. Atualmente, espectrômetros de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua também vêm sendo empregados.

De maneira geral, a espectrometria de absorção atômica (AAS) com fonte de linhas foi desenvolvida para a determinação de metais e de alguns não metais. Os halogênios não podem ser determinados por essa técnica, pois suas linhas de absorção estão localizadas em comprimentos de onda fora da faixa de trabalho, normalmente, utilizadas nos equipamentos (menor que 190 nm). Todavia, existem moléculas diatômicas formadas por metais e halogênios que possuem espectros complexos de absorção molecular com

³⁹ Pavelka, S., Vobecky, M., Babicky, A., *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 278 (2008) 575-579

⁴⁰ Isaac-Olive, K., Chatt, A., *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 29 (2012) 479-486.

⁴¹ Miah, M. Y., Wang, M. K., Chino, M., *J. Plant Nutrition* 1999 (22) 229-235

⁴² Butcher, D. J., *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 1-15

estruturas muito estreitas e localizadas na região do visível e ultravioleta. Essas linhas de absorção tem largura na faixa de pm e não são separadas por monocromadores de baixa resolução, como é o caso dos utilizados nos equipamentos de absorção atômica convencionais. Quando essas moléculas são formadas podem ser utilizadas para fins analíticos. Nesse contexto, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando a absorção molecular para determinação de halogênios. A fonte de radiação utilizada é uma HCL com linha de emissão com mesmo comprimento de onda da energia absorvida pela molécula formada. Dentre as HCL utilizadas para esse fim, destacam-se a de Pt (227,5 nm),⁴³ Pb (261,4 nm),⁴³ As (279,0 nm)⁴⁴ e Au (202,0 nm)⁴⁵ referentes à absorção molecular do AlF, AlCl, AlBr e TlI, respectivamente. Diversos trabalhos, envolvendo a determinação de halogênios por MAS, estão mostrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Recentemente, com o advento de espectrômetros de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução, as lâmpadas de arco curto de xenônio de alta pressão começaram a ser utilizadas. Essas lâmpadas compreendem a faixa contínua de emissão entre 185 e 900 nm. A intensidade de emissão excede a de uma lâmpada de cátodo oco em pelo menos 1 a 3 ordens de magnitude. A radiação que passa pelo atomizador e não é absorvida, é dirigida ao monocromador de alta resolução, que conta com um prisma e em uma rede de difração Echelle. A radiação, de comprimento de onda referente à transição eletrônica do analito, é selecionada pela rotação do prisma e da rede de difração para posições pré-ajustadas. Por fim, a radiação transmitida, atinge o detector, que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD). Na Tabela 2 são mostrados, de forma resumida, os trabalhos desenvolvidos para determinação de halogênios empregando a HR-CS-MAS.⁶

A técnica de HR-CS-MAS permitiu que outras moléculas diatômicas fossem estudadas. O uso dessa lâmpada possibilitou que moléculas que absorvem radiação no intervalo de 185 a 900 nm possam ser empregadas para fins analíticos. Esse fato, associado à alta resolução do equipamento, contribuiu para que essa técnica fosse difundida para determinação de halogênios por MAS. Então, a determinação de halogênios passou a ser feita HR-CS-MAS, usando também as seguintes moléculas GaF (211,248

⁴³ Fender, M. A., Butcher, D. J., *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 167-176

⁴⁴ Butcher, D. J., *Microchem. J.* 48 (1993) 303-317

⁴⁵ Zhi-He, Y., Hui-Ming, H., *Spectrochim. Acta* 44B (1989) 617-623

⁶ Welz, B. *et al.*, High Resolution Continuum Source AAS, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005

nm),⁴⁶⁻⁴⁸ CaF (606,440 nm),⁴⁹⁻⁵¹ SrF (651,187 nm),⁵² AlCl(261,418),⁵³⁻⁵⁴ CaBr (625,315 nm),⁵⁵⁻⁵⁷ AlBr (278,914 nm)⁵⁷ e BaI (538,308 nm)⁵⁸ As principais características dos estudos usando essas moléculas para determinação de halogênios estão mostradas nas Tabelas 1 e 2.

2.4.1. Mecanismos envolvidos na formação de moléculas diatômicas em fase vapor

A possibilidade de determinação de halogênios por espectrometria de absorção molecular está relacionada com a capacidade de formação de moléculas diatômicas entre o halogênio e um metal. Esta molécula diatômica é, normalmente, formada em fase vapor através de uma reação que pode ocorrer de forma inerente ou ser provocada intencionalmente. Por exemplo, algumas moléculas, como o PO, são formadas na chama ou forno de grafite, em elevadas temperaturas mesmo sem a adição de reagentes. Quando a formação da molécula ocorre de forma intencional, faz-se necessário a adição de um íon metálico que viabilize a formação da molécula diatômica com o elemento de interesse. Os elementos do grupo 13 da tabela periódica (Al, Ga, In e Tl) formam com facilidade moléculas diatômicas com os halogênios, as quais apresentam alta estabilidade em fase vapor podendo, dessa forma, gerar espectros de absorção molecular de interesse analítico.⁵⁹ Embora existam vários trabalhos publicados envolvendo a determinação de halogênios por MAS, poucos discutem a formação de moléculas diatômicas em fase vapor. A seguir, serão feitas algumas considerações sobre os mecanismos de formação das moléculas diatômicas de haletos metálicos. Embora, essas moléculas possam ser formadas na chama ou no forno de grafite, será dado um enfoque maior para as reações que ocorrem no forno de grafite.

Estudos iniciais foram feitos por Huang e colaboradores⁶⁰, os quais propuseram que a formação de uma molécula diatômica estável se dá pelas colisões de seus átomos em fase vapor. Essas colisões resultam na combinação entre o elemento metálico (M) e um halogênio (X), como pode ser observado na Reação 1. Possivelmente ocorram outras reações paralelas, as quais não foram mencionadas. Porém, em condições em que o metal

⁴⁶ Gleisner, H., Welz, B., Einax, J. W., *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 864-869

⁴⁷ Gleisner, H. et al., *J. Pharmaceut. Biom.* 54 (2011) 1040-1046

⁴⁸ Krüger, M. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 69 (2012) 50-55

⁴⁹ Ozbek, N., Akman, S., *Food Chem.* 138 (2013) 650-654

⁵⁰ Morés, S. et al., *Talanta* 85 (2011) 2681-2685

⁵¹ Ozbek, N., Akman, S., *E3S Web of Conferences* 1 05006 (2013)

⁵² Ozbek, N., Akman, S., *Spectrochim. Acta Part B* 69 (2012) 32-37

⁵³ Heitmann, U. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1314-1320

⁵⁴ Fechetia, M., Tognon, A. L., Veiga, M. A. M. S., *Spectrochim. Acta Part B* 71-72 (2012) 98-101

⁵⁵ Limburg, T., Einax, J. W., *Microchem. J.* 107 (2013) 31-36

⁵⁶ Flórez, M. R., Resano, M., *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32-39

⁵⁷ Huang, M. D. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 566-570

⁵⁸ Huang, M. D. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 697-701

⁵⁹ Dittrich, K., Hanisch, B., Stark, H. J., *Fresenius J. Anal. Chem.* 324 (1986) 497-506

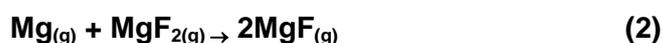
⁶⁰ Tsunoda, K., Haraguchi, H., Fuwa, K., *Spectrochim. Acta Part B* 40 (1985) 10-12

está em excesso e sua concentração é considerada constante, o equilíbrio químico descrito na Reação 1 prevalece e outras reações paralelas não afetariam o equilíbrio.



Na presença de excesso do metal, o halogênio (X) tende a ser totalmente convertido na formação da molécula (MX), resultando em um máximo de absorção. Nesse sentido, em todas as reações que envolvem a formação de moléculas diatômicas MX, o excesso do metal M é requerido.

Especificamente para o uso da vaporização em forno de grafite, alguns estudos apresentaram informações referentes à formação da molécula de MgF, as quais serão elencadas abaixo. Nesses trabalhos foi demonstrada a necessidade de adição de um excesso de Mg em relação ao F e que a combinação de Mg e F ocorre em fase vapor, resultando na formação da molécula de MgF. Não foi descartada a possibilidade de formação de MgF₂ competindo com a formação de MgF. Porém, a presença de um excesso de Mg na fase vapor, condicionaria o deslocamento do equilíbrio químico para o lado dos produtos, resultados na conversão total do F em MgF.^{61,62} Esse efeito é demonstrado na Reação 2:



Posteriormente, foi estudado se a adição de um cátion metálico poderia atuar como modificador químico e auxiliar na redução de perdas de analito durante as etapas de secagem e pirólise.⁶³ O uso de soluções de nitrato de metais alcalinos terrosos tem sido amplamente empregados para esse fim e resultados adequados tem sido obtidos. Na Tabela 1 e 2 estão mostrados os estudos desenvolvidos para determinação de halogênios MAS.

⁶¹ Dittrich, K. *et al.*, *Spectrochim. Acta* 39B (1984) 349-363

⁶² Yuzefovsky, A. I., Michel, R. G., *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 1203-1207

⁶³ Styris, D. L., *Anal. Chem.* 56 (1984) 1070-1076

2.5. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e análise direta de sólidos

Para a determinação de halogênios por espectrometria de absorção molecular, os equipamentos utilizados são espectrômetros de absorção atômica com fonte de linhas ou com fonte contínua. As fontes de linhas são lâmpadas de cátodo oco de elementos que possuem linhas de emissão correspondentes à absorção molecular da molécula de interesse. As lâmpadas de fonte contínua emitem radiação na faixa do UV-VIS, e o comprimento de onda pode ser selecionado de acordo com a absorção molecular. A formação da molécula diatômica com o halogênio pode acontecer em uma chama ou forno de grafite. Entretanto, no presente trabalho será dada ênfase ao uso do forno de grafite para tal finalidade, bem como serão apresentadas as vantagens da amostragem direta de sólidos em forno de grafite.⁴²

A espectrometria de absorção molecular em forno de grafite tem se tornado viável para a determinação de halogênios, principalmente, por se ser uma técnica de elevada sensibilidade, que permite a determinação de halogênios em baixas concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$). Essa técnica permite que um programa de aquecimento seja utilizado visando à decomposição da matriz, tornando-a adequada para determinação de halogênios em vários tipos de materiais. Essa técnica é considerada bastante versátil, pois permite a análise de amostras líquidas, suspensões ou até mesmo pela introdução direta da amostras sólidas. Diferentemente da amostragem de soluções, com o uso da introdução direta de sólidos, a etapa de decomposição da amostra não se faz necessária, fazendo com que os resultados sejam obtidos mais rapidamente. Dentre as principais vantagens desse tipo de amostragem, destacam-se o menor tempo requerido para preparo de amostras, pois em muitos casos, apenas uma etapa de cominuição da amostra é necessária. A moagem da amostra é feita, geralmente, para diminuir o tamanho das partículas e garantir a homogeneidade. Essa simplificação no pré-tratamento da amostra possibilita reduzir o tempo gasto nessa etapa aumentando, assim, a frequência de determinações. Além disso, a amostragem de sólidos requer o uso de pequenas quantidades de reagentes, resultando em menor risco de contaminação e redução da geração de resíduos, estando de acordo com o recomendado pela Química Verde.⁶⁴ Além disso, o risco de contaminação é pequeno devido a pouca manipulação.⁶⁵

⁴² Butcher, D. J., *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 1-15

⁶⁴ Lenardão, E. J. *et al.*, *Quim. Nova* 26 (2003) 123-129

⁶⁵ Nomura, C. S., Silva, C. S., Oliveira, P. V., *Quim. Nova* 31 (2008) 104-113

Atualmente, há apenas um fabricante de instrumentos que comercializa espectrômetros de absorção atômica com forno de grafite com um acessório que permite a introdução direta de amostras sólidas. A instrumentação moderna permite que a introdução da amostra seja feita através de um acessório manual ou mesmo completamente automatizada, incluindo a etapa de pesagem, através do uso de uma balança integrada. No caso do amostrador manual, a amostra é pesada sobre uma plataforma de grafite, que é introduzida e retirada do atomizador manualmente, através do uso de uma pinça metálica, enquanto que no amostrador automático, um braço robótico é quem conduz a plataforma para o atomizador, bem como nas etapas de pesagem. A microbalança utilizada para esta finalidade possui resolução de 1 μg e pode ser posicionada próxima ao equipamento, no caso do acessório manual, ou mesmo integrada ao sistema de introdução automático de amostras sólidas.⁶⁷

⁶⁷ Venkateswarlu, P., Lacroix, M.A., Kirsch, G.W., *Microchem. J.* 48 (1993) 78-85

Tabela 1. Aplicações envolvendo a determinação de Cl, F, Br e I por absorção molecular em forno de grafite empregando espectrômetro de absorção atômica com fonte de linhas.

Elemento	Amostra	Preparo de Amostra	Absorção Molecular	LOD	Exatidão	Referência
F	sangue	Digestão por via úmida: 20 µL de amostra, 500 µL de éter, 5 µL de HClO ₄ concentrado e agitação manual ou banho de ultrassom por 15 min. Adição de 2 mL de bifenil de sódio e agitação por 10 min. Adição de 0,5 mL de água com agitação em vortexing por 10 min e centrifugação a 2500 rpm, por 2 min. O sobrenadante foi extraído com éter (2 vezes com 0,5 mL) e 0,45 mL de fosfato de cálcio e 1 mL de NH ₄ OH. Antes da determinação, os extratos foram aquecidos a 90 °C por 30 min, resfriados por 10 min, e centrifugados a 4000 rpm por 10 min. O sedimento foi tratado com 0,5 mL de água e centrifugado 4000 rpm por 10 min. O flúor absorvido no sedimento do fosfato foi dissolvido em 100 µL de ácido fórmico 20 % e 100 µL de Al (usado como modificador) e diluído a 1 mL com água.	Molécula: AIF HCL de Pt $\lambda = 227,5 \text{ nm}$	não informado	98 a 100%	67
F	leite bovino	A amostra foi pipetada diretamente na plataforma de grafite	Molécula: AIF HCL de Pt $\lambda = 227,5 \text{ nm}$	não informado	105%	68
F	alumina e carvão	A determinação foi feita com amostragem direta de sólidos, sem etapa adicional de preparo de amostras.	Molécula: AIF HCL de Pt $\lambda = 227,5 \text{ nm}$	205 pg	92 e 105%	69
Cl	água	A amostra foi pipetada diretamente na plataforma de grafite	Molécula: AIF HCL de Pt $\lambda = 227,5 \text{ nm}$	não informado	Concordante com o valor de referência	70
I	agua e planta	A amostra foi pipetada diretamente na plataforma de grafite (amostra líquida) Digestão via úmida: amostra + HNO ₃ + H ₂ SO ₄ + HClO ₄ , seguido da extração com tiosulfato de sódio.	Molécula: TII HCL de Au $\lambda = 202 \text{ nm}$	35 ng	94%	45
F	creme dental, leite em pó, anticéptico bucal e tecido de ostra	Diluição: creme dental e anticéptico bucal Digestão via úmida: amostra sólida, 10 mL de HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ . A solução foi mantida sob aquecimento em "hot plate"	Molécula: AIF HCL de Pt $\lambda = 227,5 \text{ nm}$	F = 0,16 ng	86 e 118%	46
Cl e Br	planta	Decomposição via seca: amostra foi adicionada a um cadinho, qual foi inserido em uma mufla a 550 °C, e mantido por 10 h. Após as cinzas foram dissolvidas em HNO ₃ 10%	Molécula: AlCl HCL de Pb $\lambda = 261,4 \text{ nm}$ Molécula: AlBr HCL de As $\lambda = 279,0 \text{ nm}$	Cl = 0,12 ng Br = 1,1 ng	Boa concordância	44

Tabela 2. Aplicações envolvendo a determinação de Cl, F, Br e I por absorção molecular em forno de grafite empregando espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua.

Elemento	Amostra	Preparo de Amostra	Absorção Molecular	LOD	Exatidão	Referência
F	células de câncer	Extração com solução tampão de fosfato, lavagem com tripsina, resuspensão em 10 mL de DMEM, centrifugação a 2300 rpm, por 3 min, 4 °C, e lavagem, por duas vezes com solução tampão de fosfato. Estocagem a 20°C	Molécula: GaF $\lambda = 211,248 \text{ nm}$	22,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	não informado	48
F	água	A amostra foi pipetada diretamente na plataforma de grafite	Molécula: GaF $\lambda = 211,248 \text{ nm}$	7,4 pg	97 a 106%	46
F	creme dental	0,01 - 0,02 g de amostra foram solubilizados em água ultrapura	Molécula: GaF $\lambda = 211,248 \text{ nm}$	0,0052 ng	98 a 106%	47
F	leite pasteurizado	A amostra foi pipetada diretamente na plataforma de grafite	Molécula: CaF $\lambda = 606,440 \text{ nm}$	0,13 ng	Concordância satisfatória com os CRMs	49
F	chá	Digestão por via úmida: 0,5 g de amostra e 7 mL de HNO ₃ . Programa de aquecimento: 40 min e 30 min de resfriamento	Molécula: CaF $\lambda = 606,440 \text{ nm}$	160 $\mu\text{g L}^{-1}$	90 a 98%	50
F	água	A amostra foi pipetada diretamente na plataforma de grafite	Molécula: SrF $\lambda = 651,187 \text{ nm}$	não informado	Não avaliada	52
Cl	músculo bovino e leite em pó	Digestão por via úmida: 0,1 g de amostra e 1,5 mL de HNO ₃ . A solução foi mantida a temperaturas ambiente por 12 h, filtrada (0,45 μm), e diluída a 15 mL com água ultrapura. Digestão e precipitação: 0,1 mg de amostra, 1 mL de AgNO ₃ 1 mol L ⁻¹ , 4 mL de HNO ₃ e 1 mL de H ₂ O ₂ . Programa de aquecimento: banho-maria a 50 °C, por 2 h. A solução foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min e o precipitado foi lavado com água duas vezes e dissolvido em 2 mL de amônia.	Molécula: AlCl $\lambda = 211,248 \text{ nm}$	Digestão via úmida: 18 $\mu\text{g g}^{-1}$ Digestão e precipitação: 9 $\mu\text{g g}^{-1}$	Após digestão via úmida: 25 a 49% Após digestão e precipitação: 79 e 115%	50

continuação da Tabela 2

Elemento	Amostra	Preparo de Amostra	Absorção Molecular	LOD	Exatidão	Referência
Br	sais de Br e fármacos	Solubilização: 0,05 g de sal de bromo foram solubilizados em 50 mL de água ultrapura; 0,3 g de pílula farmacêutica foi solubilizada em 1 mL de HNO ₃ e diluído em 50 mL de água.	Molécula: AlBr $\lambda = 278,914 \text{ nm}$ Molécula: CaBr $\lambda = 625,315 \text{ nm}$	ng	97 e 103%	57
Br	polímeros retardante de chamas, sal de Br, desinfetante	Dissolução: 0,3 g de um comprimido contendo bromocloro-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona foram dissolvidos em água.	Molécula: CaBr $\lambda = 625,315 \text{ nm}$	78 pg	95%	55
Br	materiais plásticos	A determinação foi feita com amostragem direta de sólidos, sem etapa adicional de preparo de amostras.	Molécula: CaBr $\lambda = 625,315 \text{ nm}$	1,8 ng	Adequada concordância com os CRMs	56
Br	vinhos e fármacos	Os fármacos foram diluídos em água e pipetados na plataforma de grafite. As amostras de vinho foram pipetadas diretamente na plataforma de grafite, sem tratamento prévio.	Molécula: SrBr $\lambda = 651,058 \text{ nm}$	1,6 ng		71
I	fármacos para tireoide	Solubilização: 1 pílula foi diluída em água ultrapura	Molécula: BaI $\lambda = 538,308 \text{ nm}$	0,6 ng	102 e 103%	58

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os equipamentos, reagentes, vidrarias e amostras utilizados no desenvolvimento desse trabalho. Também estão descritos os procedimentos de preparo das amostras, bem como a etapa de caracterização das mesmas.

Além disso, serão descritos os métodos utilizados para a determinação de halogênios em amostras biológicas empregando as técnicas de ICP-MS, IC e ISE após a decomposição por MIC. Cabe destacar que os resultados obtidos por esses métodos foram utilizados como referência para o desenvolvimento do método proposto

Posteriormente, será apresentado o procedimento envolvido no desenvolvimento do método proposto para a determinação de halogênios por HR-CS-MAS.

3.1. Instrumentação

A determinação de F, Cl, Br e I nas amostras biológicas foi feita empregando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) equipado com um sistema manual para introdução de amostras sólidas modelo SSA 600 (Analytik Jena). O sistema óptico é equipado com sistema de alta resolução constituído por um prisma e um monocromador do tipo grade de difração Echelle. A fonte de radiação utilizada neste equipamento é uma lâmpada de arco curto de xenônio (potência de 300 W) com emissão contínua na faixa de 185 a 900 nm. Na Tabela 3 estão mostrados os comprimentos de onda utilizados para determinação dos halogênios através da absorção das respectivas moléculas diatômicas formadas pelos analitos em estudo.

Tabela 3. Comprimentos de onda usados para a determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS.

Elemento	Molécula	λ , nm
F	CaF	606,440
F	GaF	211,248
Cl	AlCl	261,418
Br	CaBr	625,315
I	BaI	538,308

Todas as determinações foram feitas utilizando forno de grafite com aquecimento transversal, usando tubos de grafite com tratamento pirolítico próprios para análise direta de sólidos (Analytik Jena, Art, nº 07-8130325). As amostragens foram feitas com a pesagem direta das amostras sólidas sobre plataformas de grafite com tratamento pirolítico (Analytik Jena, Art, nº 407-A81.312). Para determinação de F, Br e I foram selecionados 3 pixels do detector (100, 101 e 102), e para as determinações de Cl, foi selecionado apenas o pixel central (101). Na Tabela 4 são mostrados os programas de aquecimento utilizados para a determinação de halogênios por HR-CS-MAS.

A Figura 1 pode ser visto o sistema de introdução de amostras sólidas empregado para a determinação de halogênios por absorção molecular (contrAA 700).

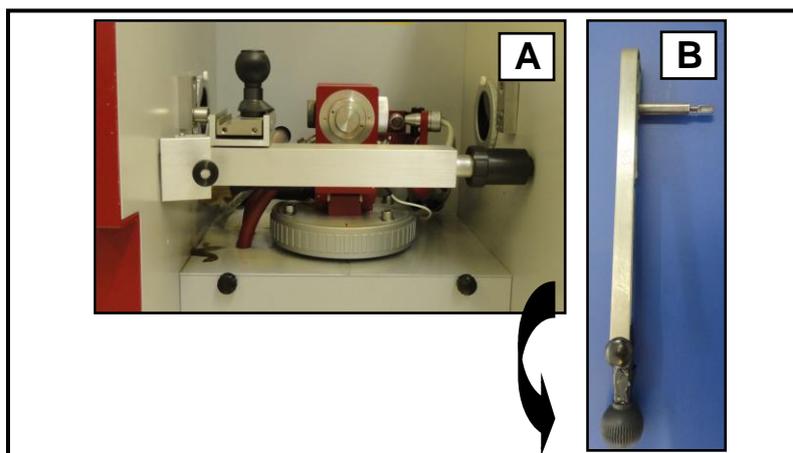


Figura 1. (A) sistema manual para introdução de amostras sólidas e (B) pinça para introdução da plataforma de grafite no interior do tudo de grafite.

Para comparação dos resultados, as amostras foram digeridas por MIC, onde foi empregado um forno de micro-ondas modelo Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com 8 frascos de quartzo. Esse sistema possui sensores que permitem que temperaturas e pressões de 280 °C e 80 bar, respectivamente, sejam atingidas durante a decomposição das amostras. A determinação de Cl, Br e I nas soluções obtidas com a decomposição por MIC foi feita utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado modelo ELAN[®] DRC II (PerkinElmer, EUA) equipado com nebulizador pneumático tipo A (Meinhard[®], EUA) com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno. Os isótopos com m/z 37, 79 e 127 foram monitorados para a determinação de Cl, Br e I, respectivamente. A determinação de F foi feita por potenciometria, utilizando um eletrodo íon seletivo para fluoreto com membrana de fluoreto de lantânio dopado com európio, modelo 781 (Metrohm, N^o 6,0502,150) e um eletrodo Ag/AgCl 781 (Metrohm, N^o 6,0726,100) foi utilizado como referência, ambos conectados a um potenciômetro modelo 780 (Metrohm).

Adicionalmente, para comparação dos resultados, a concentração de F, Cl, Br e I foi determinada em um cromatógrafo de íons modelo MagIC, (Metrohm Ion Analysis, Herisau, Suíça) com detector por condutividade. O cromatógrafo possui um sistema de supressão de CO₂ (modelo 833 supressor Unit, Metrohm) e foi utilizada uma coluna trocadora de ânions A Supp 5 (Metrosep, Metrohm) (150 x 4 mm d.i., 5 µm de diâmetro de partícula) com grupos de amônio quartenário suportados em poli(álcool vinílico) e uma coluna guarda (5 x 4 mm d.i., 5 µm de diâmetro de partícula) com o mesmo material usado para preenchimento da

coluna de troca iônica. A vazão da bomba foi ajustada para $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. A fase móvel foi preparada a partir da dissolução de Na_2CO_3 p.a. (Merck) e NaHCO_3 p.a. (Merck) em água, sendo que a concentração da fase móvel foi de $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e 1 mmol L^{-1} de Na_2CO_3 e NaHCO_3 , respectivamente. A coluna supressora foi regenerada periodicamente com solução de H_2SO_4 50 mmol L^{-1} .

A determinação dos elementos majoritariamente presentes na amostra de leite foi feita por ICP OES, usando um espectrômetro de emissão óptica (Optima 4300 DV, PerkinElmer) com vista axial, injetor de quartzo, nebulizador concêntrico de quartzo e câmara de nebulização ciclônica, após a diluição adequada.

Todos os procedimentos de pesagem foram feitos utilizando uma balança analítica modelo AY220 (Shimadzu, EUA) com resolução de $0,0001 \text{ g}$ e tara máxima de 220 g . A pesagem das amostras para determinação de halogênios por HR-CS-MAS foram feitas em uma microbalança modelo M2P (Sartorius, Göttingen, Alemanha) com resolução de $0,001 \text{ mg}$. Para os procedimentos de secagem, foram utilizados um liofilizador (Terroni Fauvel Modelo LH 2000/3, São Paulo, Brasil) e uma estufa com circulação de ar modelo 400/2ND (Nova Ética, Brasil). A determinação da distribuição do tamanho de partícula da amostra de leite em pó feita empregando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Os comprimidos, utilizados para decomposição das amostras por MIC, foram feitos utilizando uma prensa hidráulica modelo Manual Hydraulic Press, 15 ton (Specac, Inglaterra).

3.2. Reagentes

A água utilizada foi destilada, desionizada em coluna de troca iônica e, posteriormente purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Para os procedimentos de descontaminação foi utilizado HNO_3 P.A. (65% , $1,4 \text{ kg L}^{-1}$, Merck, Darmstad, Alemanha). As soluções absorvedoras utilizadas para reter os analitos liberados na decomposição das amostras por MIC foram preparadas pela diluição da solução de amônia líquida ($28\text{-}30\%$, Merck, Alemanha) em água ultra-pura. A solução de NH_4NO_3 , utilizada como iniciador de combustão, foi preparada a partir da dissolução do respectivo sal em água purificada. Papel filtro, com baixo teor de cinzas (Black Ribbon Ashless, Schleicher e Schuell, Dassel, Germany), também foi utilizado na decomposição por MIC, os quais foram previamente descontaminados com etanol em banho de ultrassom por 3 ciclos, de 20 min , seguidos de 3 ciclos com água.

As soluções de referência aquosas de F, Cl, Br e I foram preparadas a partir da dissolução de seus respectivos sais, NaF, NaCl, KBr e KI (Merck, Alemanha), em água.

Também foram preparadas soluções a partir dos reagentes AgNO_3 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Merck, Alemanha). Para o preparo de todas essas soluções foi utilizada água ultra-pura. Essas soluções foram utilizadas no desenvolvimento dos métodos para determinação de halogênios em amostras biológicas por HR-CS-MAS.

3.3. Amostras

Para o desenvolvimento do método para determinação de halogênios por HR-CS-MAS foi utilizada uma amostra de leite em pó integral adquirida em comércio local e um CRM de músculo bovino (NIST 8414). Posteriormente, já com as condições otimizadas, o método foi aplicado para outras amostras biológicas, como, leite em pó desnatado e semi-desnatado. Para avaliar a exatidão do método proposto, foi feita a determinação de F, Cl, Br e I em CRMs de origem biológica: NIST 8435 (whole milk powder), NIST 1566a (oyster tissue), NIST 1577 (bovine liver) todos produzidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, EUA). Esses CRMs também foram digeridos por MIC e a determinação de Cl, Br e I foi feita por ICP-MS, F por ISE e adicionalmente, a determinação de F, Cl, Br e I também foi feita por IC.

Devido a pouca disponibilidade de amostras biológicas com concentração de flúor adequada para o desenvolvimento do método para determinação de F por HR-CS-MAS, foi feita a adição de analito em amostra de leite em pó integral. Nesse procedimento, foram pesados aproximadamente, 40 g de leite em pó integral e adicionados a um béquer contendo 80 mL de água ultrapura. Após, foram adicionados 200, 400, 800 ou 1600 μL da solução de F (1160 mg L^{-1}) correspondentes à adição de 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de flúor, respectivamente. A solução foi mantida sob agitação por 2 horas. Posteriormente, as amostras contendo flúor, foram secas em liofilizador e moídas em moinho criogênico. Adicionalmente, para avaliar a adsorção de flúor foi feita a decomposição das quatro amostras (contendo 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F) por MIC e a subsequente determinação de flúor foi feita por ISE e IC.

3.4. Tratamento dos Resultados

Os dados obtidos nesse trabalho foram avaliados estatisticamente com a aplicação do teste *t-Student*, considerando um nível de confiança de 95%. Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da máxima quantidade de amostra que poderia ser introduzida dentro da faixa linear usada para cada elemento, considerando-se também a

recomendação da IUPAC ($B + 3\sigma$ para LOD e $B + 10\sigma$ para LOQ, sendo σ o desvio padrão de 10 leituras consecutivas do branco, e o B o valor do branco).

Tabela 4. Programas de aquecimento utilizados para determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS

Etapa	Flúor	Cloro	Bromo	Iodo
Solução de referência (10 µL)	F 1000 µg L ⁻¹	Cl 25 mg L ⁻¹	Br 10 mg L ⁻¹	I 10 mg L ⁻¹
Modificador (10 µL)	-	*Sr 2000 mg L ⁻¹	*Pd 3000 mg L ⁻¹	-
Reagente para (10 µL)	*Ca 4 g L ⁻¹	*Al 200 mg L ⁻¹	*Ca 30 mg L ⁻¹	*Ba 5000 mg L ⁻¹
Secagem 1				
Temperatura, °C	90	90	90	90
Rampa, °C s ⁻¹	5	5	5	5
Tempo, s	20	20	20	20
Vazão de Ar, L min ⁻¹	2	2	2	2
Secagem 2				
Temperatura, °C	120	120	120	120
Rampa, °C s ⁻¹	30	30	30	30
Tempo, s	30	30	30	30
Vazão de Ar, L min ⁻¹	2	2	2	2
Pirólise				
Temperatura, °C	900	700	900	600
Rampa, °C s ⁻¹	50	50	50	50
Tempo, s	50	50	50	50
Vazão de Ar, L min ⁻¹	2	2	2	2
Vaporização				
Temperatura, °C	2200	2100	1900	1900
Rampa, °C s ⁻¹	3000	3000	3000	3000
Tempo, s	10	10	10	10
Vazão de Ar, L min ⁻¹	0	0	0	0

*soluções preparadas a partir da dissolução do nitrato do respectivo elemento, em água.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amostras

A primeira etapa deste trabalho constituiu na seleção de uma amostra, de origem biológica, para ser utilizada no desenvolvimento do método para determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS. Para isso, amostras de fígado bovino, peixe e leite em pó (integral, semi-desnatado e desnatado) foram digeridas por MIC com subsequente determinação de F, Cl, Br e I por IC e Cl, Br e I por ICP-MS. Os resultados obtidos para Cl, Br e I indicaram que qualquer uma das amostras avaliadas poderia ser empregada no desenvolvimento do método proposto, pois a concentração de Cl, Br e I esteve acima do LOD das técnicas de ICP-MS e IC e os desvios padrão relativos (RSDs) foram menores que 5%. Entretanto, a concentração de flúor esteve sempre abaixo do limite de detecção da técnica de IC, independente da amostra avaliada. Nesse caso, os estudos para escolha das temperaturas de pirólise e vaporização para a determinação de flúor por HR-CS-MAS em amostra biológica não poderiam ser executados com nenhuma das amostras avaliadas.

Então, optou-se por tentar melhorar o limite de detecção (LOD) para flúor e, assim, conseguir quantificá-lo nas amostras biológicas para possibilitar a obtenção das curvas de pirólise e vaporização do sistema HR-CS-MAS proposto. Então, visando à quantificação de flúor nas amostras acima citadas, a MIC foi utilizada, diferentemente ao emprego convencional, como um método de pré-concentração dos analitos. Este procedimento foi empregado visando melhorar o limite de quantificação do método e, ainda, avaliar a possibilidade de determinação de flúor por ISE. Neste sentido o método de decomposição foi modificado em relação ao sistema proposto por Flores et al., 2004.¹⁹ Nesta nova proposta de uso da MIC, 500 mg amostra de leite em pó integral foram digeridos usando o sistema pressurizado com 20 bar de O₂, onde os analitos foram retidos em 6 mL de solução absorvedora (NH₄OH 200 mmol L⁻¹). Diferentemente do método de decomposição por MIC convencionalmente empregado, um outro suporte de quartzo com outro comprimido de amostra (500 mg de leite em pó) foi inserido no frasco de quartzo contendo a solução absorvedora proveniente da queima anterior. O sistema foi novamente pressurizado e a decomposição foi feita usando 5 min de aquecimento por radiação micro-ondas. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, perfazendo a decomposição de 2 g de amostra, utilizando a mesma solução absorvedora. Após, a solução absorvedora foi

¹⁹ Flores, E. M. M. et al., *Anal. Chem.* 76 (2004) 3525-3529

transferida para um frasco volumétrico e o volume final foi completado para 25 mL. É importante salientar que, ao final de cada ciclo de decomposição, o suporte de quartzo foi lavado com aproximadamente 3 mL de água ultra-pura antes de ser removido do frasco de decomposição. Essa lavagem foi feita para que os analitos que poderiam ter ficado retidos no suporte de quartzo fossem levados à solução absorvedora. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de F, Cl, Br e I em leite em pó integral, após a decomposição por MIC como método de pré-concentração dos analitos. Determinação de Cl, Br e I por ICP-MS, F por ISE e F, Cl, Br e I por IC (média \pm desvio padrão em $\mu\text{g g}^{-1}$, n = 3)

Ciclos de digestão	pH	Flúor		Cloro		Bromo		Iodo	
		ISE	IC	ICP-MS	IC	ICP-MS	IC	ICP-MS	IC
1	5,9	< 5,9	< 3,2	9254 \pm 156	9024 \pm 121	18,1 \pm 0,3	19,3 \pm 0,4	0,487 \pm 0,013	< 4,8
2	5,7	< 2,9	< 3,2	9225 \pm 145	9201 \pm 117	18,2 \pm 0,1	18,9 \pm 0,2	0,491 \pm 0,005	< 2,4
3	5,5	< 1,9	< 3,2	9105 \pm 131	9108 \pm 100	18,5 \pm 0,1	18,7 \pm 0,5	0,472 \pm 0,011	< 1,6
4	5,2	< 1,5	< 3,2	9192 \pm 100	9105 \pm 98	18,4 \pm 0,3	19,1 \pm 0,4	0,502 \pm 0,009	< 1,2

Obs: as determinações de F (ISE e IC) e I (IC) foram menores que os respectivos LODs.

Conforme pode ser observado na Tabela 5, a determinação de F, Cl, Br e I foi feita por IC nas soluções obtidas da decomposição de 2 g de leite em pó, usando os múltiplos ciclos de decomposição por MIC. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 5, mesmo empregando 4 ciclos de decomposição a quantificação de F não foi possível pelas técnicas utilizadas (IC e ISE), pois as concentrações obtidas nas soluções finais foram abaixo do limite de detecção (IC < 3,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ e ISE < 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Então, a fim de obter uma amostra com concentração de F adequada para o desenvolvimento do método para determinação de flúor por HR-CS-MAS em amostras biológicas, optou-se por fazer a adição de flúor na amostra de leite em pó integral. Para isso, foram adicionadas à amostra sólida, concentrações de flúor que pudessem ser quantificadas por IC após a decomposição da amostra por MIC (usando apenas um ciclo de decomposição). Este procedimento de adição de analito à amostra foi feito segundo descrito nos *Materiais e Métodos (item 3.3. Amostras)*. Foram preparadas quatro amostras com adição de 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F. Para este procedimento, aproximadamente 40 g de leite em pó integral foram solubilizados em 80 mL de água. Após, foram adicionados 200, 400, 800 ou 1600 μL da solução de F (1160 mg L^{-1}) às amostras, correspondendo a 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de flúor, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram secas em liofilizador e moídas em moinho criogênico.

A avaliação da massa de flúor adicionada à amostra de leite foi feita pela decomposição das quatro amostras (contendo 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{g g}^{-1}$) por MIC e subsequente determinação de F por ISE e IC. Os resultados obtidos para determinação de F nas amostras que foram submetidas ao procedimento de adição de analito estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração de F por IC e ISE em leite em pó integral após adição de 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F (média \pm desvio padrão em $\mu\text{g g}^{-1}$, n = 3).

Amostra + F ($\mu\text{g g}^{-1}$)	F	
	MIC - IC	MIC - ISE
5	5,89 \pm 0,25	< 5,9
10	10,6 \pm 0,2	9,98 \pm 0,4
20	21,2 \pm 0,9	19,4 \pm 1,1
40	37,7 \pm 1,0	38,1 \pm 2,4

Conforme pode ser observado na Tabela 6, não houve diferença significativa (teste *t-Student*, nível de confiança de 95%) entre os valores obtidos para flúor por IC e por ISE, após a decomposição por MIC. Além disso, foi verificado que o flúor adicionado foi

homogeneamente incorporado às amostras de leite em pó integral. Isso pode ser verificado através dos baixos valores de RSDs da determinação de F por IC e ISE. Então, a amostra de leite em pó integral em que foi adicionado $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de F foi utilizada para a obtenção das curvas de pirólise e vaporização para determinação de F por HR-CS-MAS.

4.1.1. Caracterização da amostra de leite em pó

A amostra de leite em pó integral foi caracterizada através da determinação dos seguintes parâmetros: teor de umidade, resíduo mineral fixo, tamanho de partícula e concentração de C, Ca, Cl, K, Mg, Na, K, N, P e S. A determinação do teor de água e resíduo mineral fixo foi feito de acordo com métodos oficiais recomendados para amostras de leite.⁷² A determinação de Ca, K, Mg, Na, K, P e S foi feita por ICP OES após a decomposição da amostra de leite em pó por MIC. A determinação de Cl foi feita por IC. A determinação de C e N foi feita por análise elementar. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 7.

Adicionalmente, foi feita a determinação da distribuição do tamanho de partícula na amostra de leite em pó, após moagem em moinho criogênico e moinho de bolas e, também, na amostra sem passar por processo de moagem. A distribuição do tamanho de partículas obtido após os diferentes tipos de moagem está mostrada na Tabela 7.

Tabela 7. Caracterização da amostra de leite em pó integral.

Parâmetro avaliado	Resultado
Teor de umidade, %	$5,52 \pm 0,21$
Resíduo mineral fixo, %	$6,55 \pm 0,73$
C, %	$50,5 \pm 0,6$
N, %	$4,02 \pm 0,41$
Cl, %	$0,925 \pm 0,027$
Ca, %	$0,459 \pm 0,010$
K, %	$1,16 \pm 0,02$
Mg, %	$0,554 \pm 0,018$
Na, %	$0,318 \pm 0,016$
P, %	$0,322 \pm 0,004$
S, %	$0,216 \pm 0,014$
Distribuição do tamanho de partícula, μm	
sem moagem	148
moinho de bolas	103
moinho criogênico	39,9

⁷² The Official Methods of Analysis of AOAC International (OMA), 18th Edition, AOAC International, Gaithersburg, USA, 2005

4.2. Determinação de flúor por HR-CS-MAS

4.2.1. Escolha da molécula para a determinação de flúor por absorção molecular

4.2.1.1. Uso da molécula de GaF

Inicialmente, foi feita a escolha da molécula que seria utilizada para a determinação de flúor em amostras biológicas empregando a técnica de HR-CS-MAS. Diversos estudos têm sido desenvolvidos para determinação de flúor empregando a absorção da molécula de GaF.⁴⁶⁻⁴⁸ Nesses trabalhos, são utilizados modificadores químicos que auxiliam na estabilidade do analito durante as etapas de secagem e pirólise, permitindo que a solução e/ou a composição orgânica da amostra sejam eliminadas sem acarretar em perdas de analitos devido ao emprego de temperaturas relativamente elevadas. Neste sentido, soluções contendo Ca, Mg, Pd, Ru, Zr, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, dentre outras, tem sido constantemente avaliadas em função do tipo de amostra e da espécie de flúor que está presente na amostra. Além disso, é feita a adição de Ga visando à formação da molécula de GaF e subsequente absorção molecular em 211,248 nm.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura para determinação de F usando a molécula de GaF, o que utilizou a amostra com matriz mais semelhante à utilizada no presente trabalho (leite em pó integral) foi o desenvolvido por Kruger e colaboradores⁴⁸. Então, as condições previamente estudadas foram aplicadas no presente trabalho. Primeiramente, foi feito o recobrimento da plataforma de grafite com uma solução de Zr (10 μL de Zr 1000 mg L^{-1}). Em seguida, foram adicionadas soluções de F (10 μL de F 50 $\mu\text{g L}^{-1}$), Ga (10 μL de Ga 5 g L^{-1}), Mg (5 μL de Mg 5 g L^{-1}), Ca (5 μL de Ca 5 g L^{-1}) e Pd (5 μL de Pd 5 g L^{-1}) empregando temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 1600 °C, respectivamente. As medições de GaF foram feitas em absorbância integrada, obtendo-se o valor $0,551 \pm 0,049$ s, indicando que estudos subsequentes fossem feitos. Então, posteriormente, foi avaliada a viabilidade da utilização deste método para determinação de flúor em amostras biológicas. Para estes ensaios foi utilizado, aproximadamente, 1 mg de amostra de leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F. Entretanto, diferentemente dos resultados obtidos quando apenas a solução de referência foi empregada, foram observadas várias interferências no intervalo selecionado (200 pm). Algumas destas interferências já foram discutidas na literatura, como é o caso da absorção molecular por parte da molécula de PO.⁴⁸ Considerando as severas interferências espectrais encontradas na janela espectral

⁴⁶ Gleisner, H., Welz, B., Einax, J. W., *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 864-869

⁴⁷ Gleisner, H. et al., *J. Pharmaceut. Biom.* 54 (2011) 1040-1046

⁴⁸ Krüger, M. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 69 (2012) 50-55

selecionada, as quais não foram corrigidas pela resolução do equipamento, optou-se por avaliar a viabilidade do uso de outra molécula para determinação de flúor usando a técnica de HR-CS-MAS.

4.2.1.2. Uso da molécula de CaF

Posteriormente, investigou-se a possibilidade de uso da molécula de CaF para a determinação de flúor por HR-CS-MAS. Inicialmente foram conduzidos experimentos empregando as condições previamente otimizadas, conforme trabalho desenvolvido por Ozber et. al.⁴⁹ Neste trabalho, foi feita a determinação de F em leite pasteurizado por HR-CS-MAS, usando a absorção molecular de CaF. Temperaturas de pirólise (700 °C) e vaporização (2250 °C) foram selecionadas e a absorção molecular foi monitorada no comprimento de onda de 606,440 nm. Para estes testes iniciais, foram utilizadas soluções de F (10 µL de F 1000 µg L⁻¹) e de Ca (10 µL de Ca 4 g L⁻¹), com recobrimento prévio da plataforma de grafite com 10 injeções de 20 µL da solução de Zr contendo 1000 mg L⁻¹ (aquecimento a 1000 °C, por 10 s). Posteriormente, foi avaliado o emprego deste método para determinação de flúor em leite em pó. A amostra de leite em pó integral (1 mg) contendo 10 µg g⁻¹ de F foi pesada diretamente na plataforma de grafite. Além disso, foi adicionado 10 µL de solução de Ca (4 g L⁻¹). O sinal obtido em 606,440 nm, referente à absorção molecular de CaF, apresentou absorbância integrada de 0,680 ± 0,059, e o sinal foi integrado em área e retornou à linha de base em 6 s, em 2250 °C, mostrando-se promissor para estudos subsequentes utilizando essa molécula. Como não foram observadas interferências espectrais que comprometessem a obtenção da informação analítica, foi sistematizado um estudo para a determinação de flúor em amostras biológicas.

Inicialmente, foram estudadas as temperaturas adequadas para eliminação da matriz e para formação da molécula de CaF, através da obtenção das curvas de pirólise e vaporização, respectivamente. Além disso, foi avaliada a quantidade de cálcio necessária para formação da molécula de CaF, bem como seu uso como modificador químico. Também foi estudada a massa máxima de amostra que pode ser usada na determinação de F por HR-CS-MAS. Além disso, foi feito um estudo sistemático para avaliar a interferência promovida por outros elementos presentes na amostra de leite em pó na determinação de flúor por HR-CS-MAS. Estes itens serão descritos e discutidos a seguir.

⁴⁹ Ozbek, N., Akman, S., *Food Chem.* 138 (2013) 650-654

4.2.1.3. Influência da adição de Ca sobre a absorção molecular de CaF

Uma das grandes vantagens relacionadas ao uso da absorção molecular de CaF para determinação de flúor é a possibilidade de dispensar o uso de outros reagentes como modificadores químicos, pois o mesmo elemento (Ca) utilizado para formar a molécula que absorve em 606,440 nm é utilizado para evitar as perdas de analito, por volatilização, durante a etapa de pirólise.

Neste sentido, foram avaliadas massas de Ca de 0 a 200 μg pela adição de 10 μL de soluções contendo de 0 a 20 g L^{-1} de Ca. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 2.

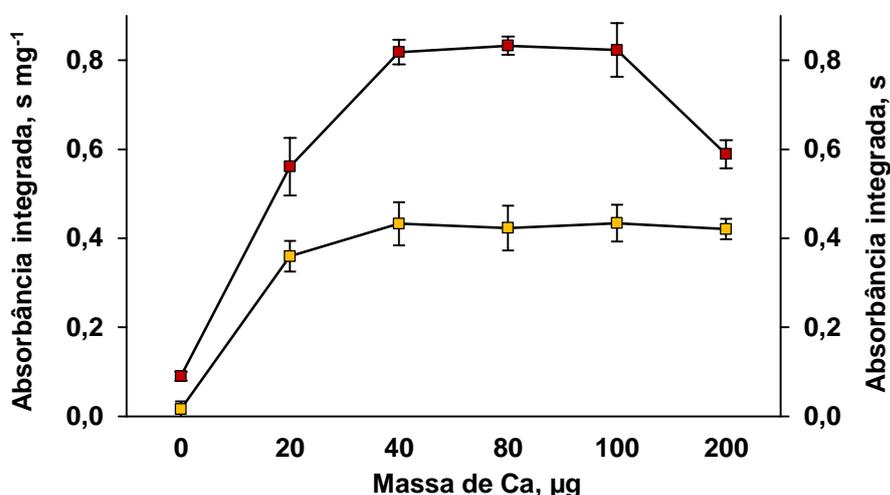


Figura 2. Influência da massa de Ca (0 a 200 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do CaF (sinal integrado em área). Ensaio usando: ■ solução contendo 5 ng de F (10 μL de solução contendo 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de F, eixo y da direita) e usando ■ amostra de leite contendo 10 ng de F (1 mg de leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F, eixo y da esquerda); temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão

Conforme observado na Figura 2, para os ensaios empregando 5 ng de F pela adição de 10 μL da solução contendo 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi necessário fazer a adição de Ca para a formação da molécula de CaF. Sem a adição do modificador a absorbância foi próxima a zero (barras amarelas). Por outro lado, com a adição de 20 μg de Ca houve um aumento na absorbância em 606,440 nm, (referente à absorção molecular de CaF) evidenciando sua formação. Então, aumentou-se a massa de Ca adicionada para 40 μg e os valores de

absorbância obtidos foram ainda maiores que aqueles usando 20 μg de Ca. Quando massas de 80, 100 e 200 μg de Ca foram avaliadas, os valores de absorbância obtidos foram muito semelhantes aos obtidos com a adição de 40 μg de Ca. Entretanto, é importante destacar que o uso de massas de Ca superiores a 100 μg resultaram no alargamento do sinal de absorção molecular. Contudo, para evitar a obtenção desse tipo de sinal e, também para minimizar o uso excessivo de reagentes, optou-se por proceder os demais testes usando 40 μg de Ca.

Posteriormente, ensaios semelhantes foram feitos usando a amostra sólida, ou seja, adicionado leite em pó contendo 10 ng de F (1 mg de amostra de leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F) e massas variáveis de Ca (0 a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$). Resultados muito semelhantes aos obtidos para os testes usando solução de referência flúor foram observados (Figura 2). É importante salientar que o Ca originalmente presente na amostra de leite não foi suficiente para promover formação quantitativa da molécula de CaF. Desta forma, faz-se necessária a adição de Ca juntamente com a amostra de leite em pó e/ou solução contendo F. Esse fato pode ser explicado pela temperatura de atomização do Ca ser de, aproximadamente, 2500 °C e, como a máxima temperatura empregada foi de 2250 °C, o Ca presente no leite, pode não ser suficiente para interagir com o F em fase gasosa. Por outro lado, caso fosse empregada a temperatura de 2500 °C, a qual promoveria a atomização completa do Ca naturalmente presente no leite, essa poderia não ser adequada para a absorção molecular do CaF. Além disso, foi observado que para formação quantitativa da molécula de CaF é necessário que massas de Ca de no mínimo 40 μg sejam utilizadas e, na amostra de leite em pó usada nesse estudo, a massa de Ca é menor que o mínimo necessário (5 μg).

A partir do estudo da massa de Ca para a formação da molécula de CaF e seu uso como modificador químico, passou-se a investigar as temperaturas adequadas para promover a completa eliminação da matriz da amostra sem prejudicar a estabilização térmica do F. Esse estudo foi feito pela obtenção das curvas de pirólise e vaporização.

4.2.1.4. Curvas de pirólise e vaporização

Conforme foi mostrado em testes anteriores, para a determinação de F a quantidade de Ca é essencial para a formação da molécula de CaF em fase gasosa. Porém, outros fatores também são extremamente importantes para que a molécula seja formada. Dentre esses fatores, pode-se destacar o ajuste das condições do programa de aquecimento do forno de grafite. Essas condições são, geralmente, determinadas pelas curvas de pirólise e de vaporização, essa última também é chamada de etapa de formação da molécula. Assim é possível estabelecer um perfil de comportamento térmico da molécula e dos componentes

da matriz. Além disso, o ajuste das temperaturas de pirólise e de vaporização levam à obtenção de resultados com menor massa característica e à eliminação de possíveis interferentes da matriz da amostra. Como consequência do ajuste destas condições, pode-se obter resultados com melhores precisão e exatidão.

Inicialmente, foram estabelecidas as curvas de pirólise e vaporização para a solução aquosa. Esse estudo foi feito com o uso de uma solução de referência contendo 10 ng de F, pela adição de 10 μL de solução contendo 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de F. Além disso, foram obtidas curvas de pirólise e vaporização para a amostra de leite em pó contendo 10 ng de F, pelo uso de 1 mg de amostra de leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de F, a qual foi pesada diretamente sobre a plataforma de grafite. Em todos os ensaios para obtenção das curvas de pirólise e vaporização foram adicionados 40 μg de Ca, pela adição de 10 μL da solução contendo 4 g L^{-1} de Ca à plataforma de grafite, juntamente com a solução de referência contendo flúor ou com a amostra de leite em pó. Devido à dificuldade de pesagem de massas exatamente iguais para obtenção das curvas de pirólise e vaporização para amostra sólida, foram utilizadas massas de amostra no intervalo entre 0,5 e 1 mg. Os resultados obtidos para a otimização das curvas de pirólise e vaporização para solução aquosa e amostra de leite estão apresentados na Figura 3.

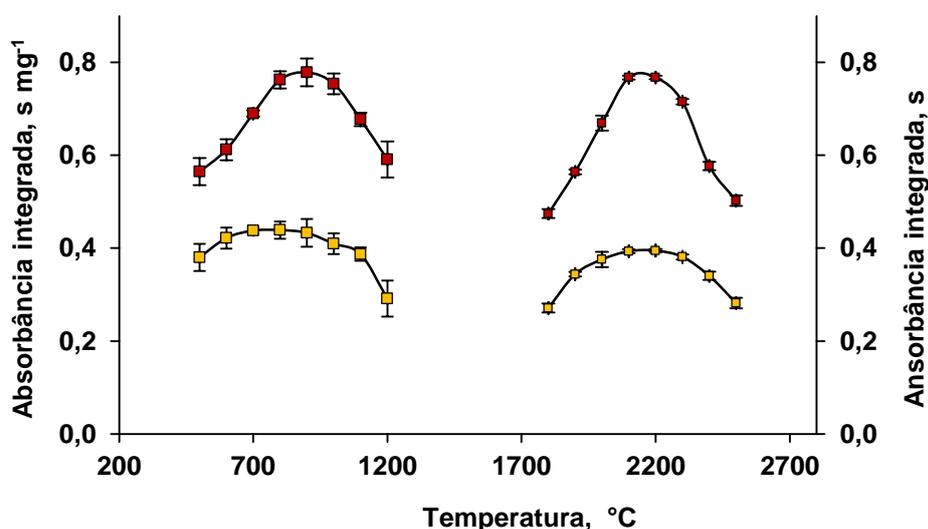


Figura 3. Curvas de temperaturas de pirólise e vaporização para F em \blacksquare solução de referência aquosa contendo 5 ng de F (10 μL de solução contendo 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de F, eixo y da direita) e curvas de pirólise e vaporização para \blacksquare amostra de leite em pó contendo 10 ng de F (1 mg de leite em pó contendo 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, eixo y da esquerda) + 40 μg de Ca. Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: 700 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: 2250 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações; barras verticais representam o desvio padrão.

Inicialmente foi feita a curva de pirólise para solução de referência aquosa contendo 10 ng de F, mantendo-se a temperatura de vaporização em 2250 °C (resultados não apresentados na Figura 3). Nesse estudo, a temperatura de pirólise mais adequada foi a de 700 °C, o que está de acordo com os resultados reportados na literatura.⁴⁹⁻⁵⁰ Para temperaturas de 800 e 900 °C, os valores de absorbância foram similares aos valores obtidos quando a temperatura de 700 °C foi empregada, porém os RSDs para 800 e 900 °C foram maiores. Então, optou-se por utilizar a temperatura de pirólise de 700 °C para a obtenção da curva de vaporização. Porém, quando o mesmo estudo (escolha da temperatura de pirólise) foi feito para amostra de leite em pó, foi observado que a temperatura mais adequada para eliminação da matriz da amostra foi a de 900 °C (resultados apresentados na Figura 3). Com o uso de 700 ou 800 °C durante a pirólise da amostra sólida, os valores de absorbância foram inferiores aos obtidos com o uso de 900 °C. O RSD referente às cinco determinações obtidas em 900 °C foi de 6%. Assim, as curvas de vaporização para solução de referência aquosa e para amostra de leite em pó foram feitas usando 900 °C (Figura 3). Apesar da possibilidade do flúor formar compostos relativamente voláteis durante a pirólise, os quais poderiam ser perdidos devido ao emprego de elevadas temperaturas (900 °C), isso não foi observado nesse trabalho. Este fato pode ser explicado considerando-se o emprego do modificador químico (Ca), o qual favorece a formação de CaF₂ fixando o analito durante a pirólise. Em temperaturas mais elevadas, como nas empregadas durante a vaporização (acima de 2100 °C), esse composto sofre decomposição térmica originando CaF, molécula que absorve radiação no comprimento de onda de 606,440 nm.

É importante mencionar que em um estudo desenvolvido por Morés e colaboradores⁵⁰, para a determinação de flúor em amostras de chá usando a absorção molecular de CaF em HR-CS-MAS foi observado que, em temperaturas de pirólise superiores a 700 °C, havia perdas de F, diferentemente do que foi observado nesse trabalho. Possivelmente essas perdas de F estejam relacionadas à presença de ácido nítrico, tendo em vista que a determinação de flúor foi feita após a decomposição das amostras de chá por decomposição via úmida. Além disso, a massa de Ca usada foi menor (12,6 µg) do que a usada no presente trabalho (40 µg), o que poderia contribuir para as perdas de analito durante a etapa de pirólise. Em outro estudo,⁴⁹ desenvolvido para determinação de F em leite usando também a molécula de CaF, a temperatura de pirólise selecionada foi de 700 °C. No entanto, não foram observadas perdas de analito em

⁴⁹ Ozbek, N., Akman, S., *Food Chem.* 138 (2013) 650-654

⁵⁰ Morés, S. *et al.*, *Talanta* 85 (2011) 2681-2685

temperaturas entre 800 e 900 °C, mas os RSDs foram um pouco maiores que os obtidos pelo uso de temperatura de 700 °C. Esse resultado está de acordo com o obtido no presente trabalho, possivelmente pelo emprego de massas maiores de Ca (40 µg), o que contribuiu para evitar perdas do analito durante a etapa de pirólise.

Conforme mostrado na Figura 3, a temperatura adequada para formação da molécula foi a de 2200 °C. Essa condição foi bastante semelhante à estabelecida em trabalhos anteriores usando a mesma molécula. A formação de CaF em fase vapor requer temperaturas de vaporização, relativamente, elevadas em razão do Ca ser também um elemento refratário e se combinar com F apenas em fase de vapor. As pequenas diferenças de temperaturas (100 °C) obtidas para pirólise e vaporização, com relação a alguns trabalhos já publicados, pode ser a variação da medida da temperatura entre os diferentes equipamentos utilizados.

Com o uso de temperaturas superiores a 2200 °C para formação da molécula de CaF usando soluções de referência aquosas, o sinal referente a absorção da molécula de CaF diminuiu, possivelmente devido a perdas de analito em função das elevadas temperaturas empregadas (2300 a 2500 °C). Por outro lado, com a utilização de temperaturas superiores a 2200 °C para formação da molécula de CaF, a partir do F liberado da amostra de leite em pó, o comportamento foi diferente daquele observado para soluções de referência aquosas quando temperaturas superiores a 2200 °C foram empregadas. Diferentemente do comportamento observado para a solução, onde o sinal analítico decresce em função do aumento de temperatura, para a amostra sólida o sinal de absorbância em 606,440 nm sofre um aumento com o uso de temperaturas mais elevadas (igual ou superior a 2400 °C). Os valores mais elevados de absorbância, obtidos quando temperaturas superiores a 2400 °C foram empregadas, deve-se possivelmente, ao aumento da quantidade de cálcio disponível no interior do forno de grafite. Nessas temperaturas, o cálcio presente na amostra de leite é volatilizado e, conseqüente, a massa de Ca presente no interior do forno de grafite aumenta contribuindo para o deslocamento do equilíbrio da reação envolvida na determinação de flúor pela absorbância da molécula CaF.

Contudo, após o estudo para obtenção das temperaturas de pirólise a vaporização adequadas para a determinação de F pela absorção molecular em 606,440 nm (referente a molécula de CaF), essas condições foram utilizadas para a curva de calibração visando determinação de F em amostras biológicas. Cabe destacar que as temperaturas adequadas de pirólise e vaporização foram de 900 e 2200 °C, respectivamente.

4.2.1.5. Sinais de absorção molecular - CaF

Os sinais analíticos referentes à absorção da molécula CaF em 606,440 nm são mostrados na Figura 4. Na Figura 4a está mostrado o perfil do sinal obtido pelo uso da solução de referência aquosa contendo 10 ng de F ($10 \mu\text{L}$ da solução de F $1000 \mu\text{g L}^{-1}$). Na Figura 4b está mostrado o perfil do sinal obtido pela absorção molecular do CaF a partir do 10 ng de F liberado da amostra de leite em pó (usando 1 mg da amostra contendo $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de F).

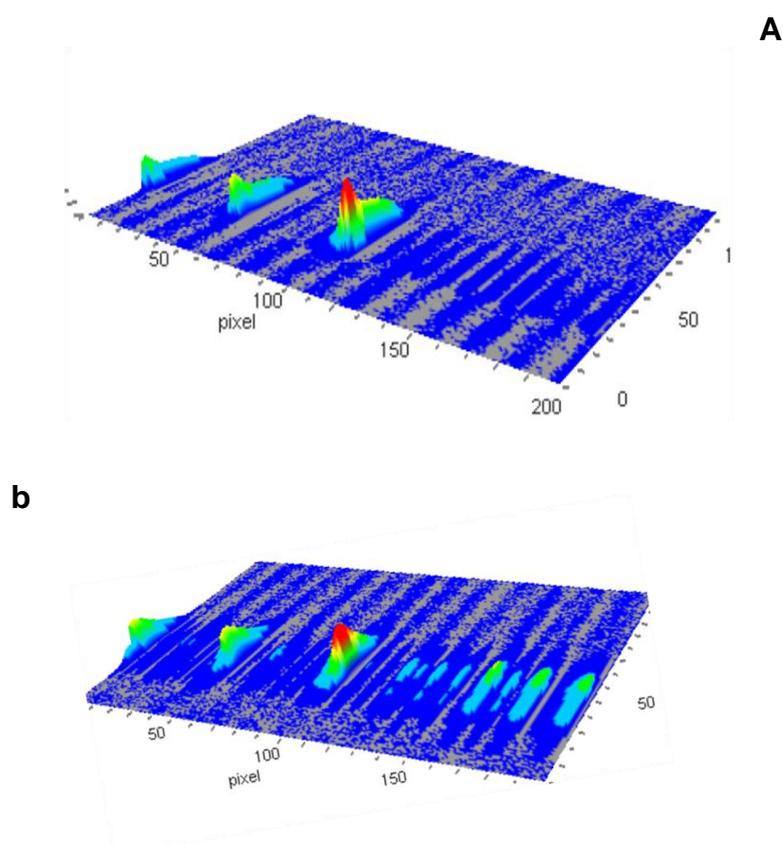


Figura 4. Sinais de absorção molecular obtidos usando: a) 10 ng de F a partir de uma solução de referência em meio aquoso ($10 \mu\text{L}$ da solução contendo $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de F); e, b) 10 ng de F a partir da amostra de leite em pó (1 mg da amostra contendo $10 \mu\text{g g}^{-1}$). Condições empregadas: $40 \mu\text{g}$ de Ca; Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e $2200 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Os sinais analíticos obtidos em 606,440 nm para solução aquosa contendo 10 ng de F e para amostra de leite em pó contendo 10 ng de F (Figura 4a e 4b, respectivamente) apresentaram perfis muito semelhantes (Figura 4). No espectro obtido para a amostra sólida (Figura 4b), foram observados sinais de absorção referente a outras espécies (elementos ou

moléculas presentes na amostra de leite), as quais absorvem radiação em comprimento de onda muito próxima à linha de absorção molecular do analito.

4.2.1.6. Influência de outros íons presentes na amostra na formação da molécula CaF

De acordo com os perfis das curvas de pirólise e vaporização para a solução de referência aquosa e para a amostra de leite em pó, pode-se inferir que não houve interferência de outros íons presentes na amostra de leite sobre o sinal analítico de flúor. Ainda assim, foi feito um estudo de adição dos possíveis interferentes (concomitantes da amostra) às soluções de referência. Foram considerados potenciais interferentes aqueles elementos que estavam presentes na amostra em concentrações superiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$.

Para esse estudo, foi considerada a composição mineral do leite presente em 1 mg de amostra, tendo em vista que essa foi a massa de amostra utilizada em todas as etapas envolvidas na otimização do método proposto. Primeiramente, foi feita a determinação dos Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S por ICP OES, após a decomposição da amostra por MIC. Foram decompostos 500 mg de amostra de leite em pó e com a utilização de 6 mL de solução absorvedora (HNO_3 7 mol L^{-1}). As condições utilizadas na etapa de decomposição da amostra e determinação dos analitos foram seguidas conforme recomendado por Pereira e colaboradores.⁷³

Os resultados obtidos para de Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S por ICP OES após a decomposição da amostra de leite em pó estão mostrados na Tabela 8. Outros elementos foram determinados. No entanto as concentrações obtidas foram menores que $100 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 8. Concentração de Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S em leite em pó após a decomposição por MIC. Determinação por ICP OES. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$, n = 3.

Elemento	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$	Equivalente a 1 mg de amostra, μg	Interferente, μg
Ca	4598 ± 102	4,59	2,5 a 20
K	11597 ± 191	11,6	2,5 a 20
Mg	5541 ± 180	5,54	2,5 a 20
Na	3178 ± 157	3,18	2,5 a 20
Cl	9054 ± 279	9,25	2,5 a 20
P	3221 ± 93	3,22	2,5 a 20
S	2156 ± 140	2,15	1 a 20

⁷³ Pereira, J. S. F. et al., Microchem. J. 109 (2013) 29-35

Finalmente, foram preparadas soluções com concentrações de 250 a 2000 mg L⁻¹ de cada elemento considerado interferente (Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S). Nos ensaios subsequentes foram adicionados 10 µL da solução de Ca, K, Na, Mg, Cl, P ou S, 10 µL da solução contendo 500 µg L⁻¹ de F e 10 µL da solução contendo 4 g L⁻¹ de Ca. As temperaturas de pirólise a vaporização utilizadas foram de 900 e 2200 °C, respectivamente. Os resultados estão mostrados na Figura 5.

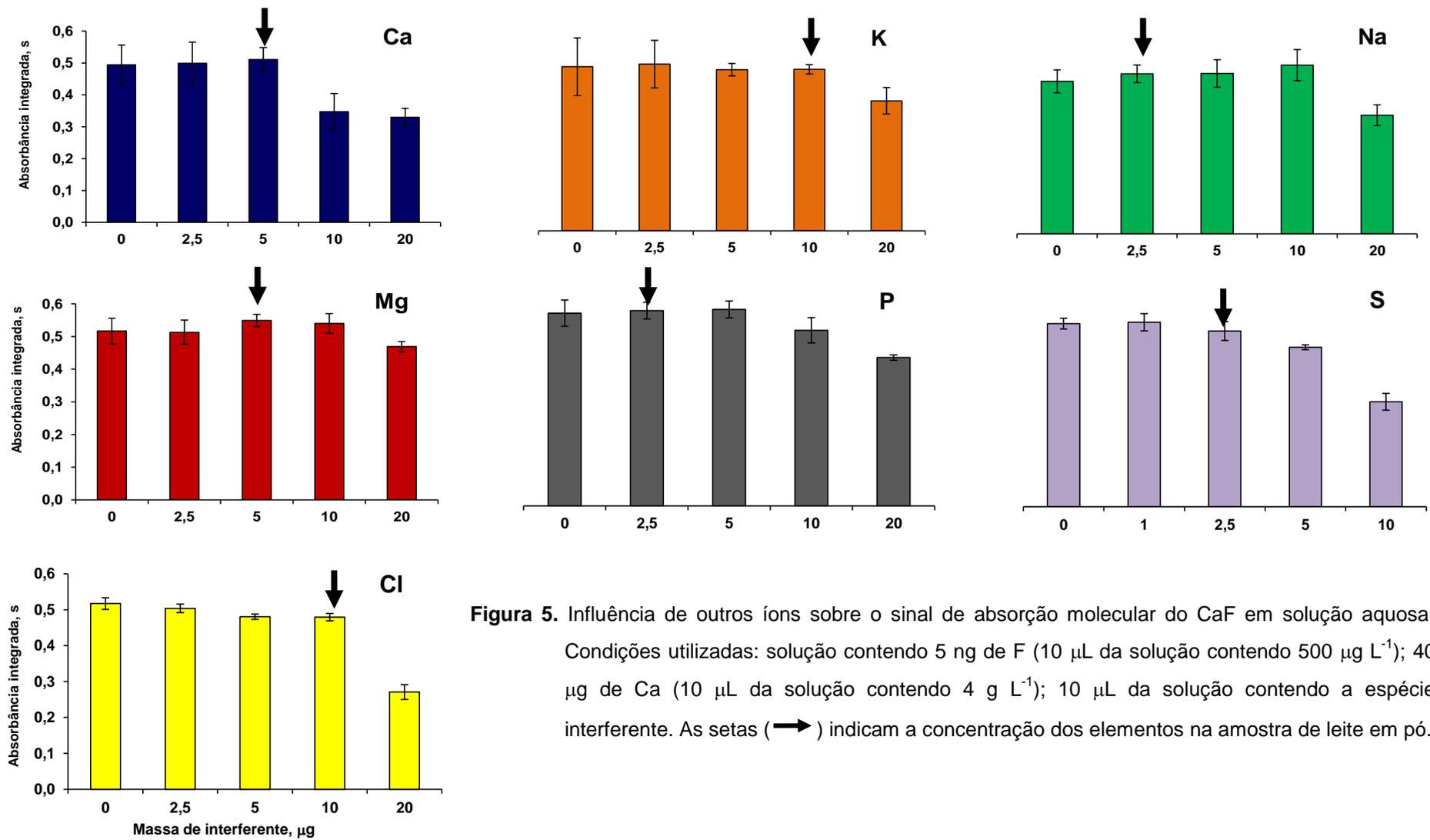


Figura 5. Influência de outros íons sobre o sinal de absorção molecular do CaF em solução aquosa. Condições utilizadas: solução contendo 5 ng de F (10 µL da solução contendo 500 µg L⁻¹); 40 µg de Ca (10 µL da solução contendo 4 g L⁻¹); 10 µL da solução contendo a espécie interferente. As setas (→) indicam a concentração dos elementos na amostra de leite em pó.

Nos testes para avaliar as possíveis interferências na determinação de F por HR-CS-MAS, foram utilizadas as concentrações de Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S presentes na amostra de leite em pó, dentre outras concentrações (Figura 5). Na Figura 5, foram indicadas com setas as barras que indicam a absorvância de CaF, na presença Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S em concentração equivalente à naturalmente presente na amostra.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 5, a mesma quantidade de Ca, K, Na, Mg, Cl, P e S presente naturalmente no leite não interferiu na determinação de F por HR-CS-MAS. Por outro lado, com concentrações maiores de alguns elementos como Ca, K, S e Cl o sinal referente a absorvância do F foi menor. Neste contexto, caso seja utilizada uma amostra com concentrações mais elevadas desses elementos é necessário fazer um novo estudo sistemático. Por outro lado, é importante salientar que, de maneira geral, não são encontradas concentrações mais elevadas que essas em amostras biológicas.

4.2.1.7. Efeito da massa de amostra

A amostragem direta de sólidos para determinação de flúor em amostras biológicas apresenta diversas vantagens quando comparada às técnicas que requerem a introdução da amostra na forma de solução. Dentre as principais vantagens, cabe destacar o mínimo tratamento da amostra que é requerido, previamente à etapa de determinação. Entretanto, uma das desvantagens do uso da análise direta de sólidos é que pequenas massas de amostra podem ser introduzidas a cada ciclo de determinação, acarretando principalmente em resultados com baixa precisão, relacionadas principalmente à heterogeneidade da amostra. Por outro lado, com o emprego de massas muito elevadas de amostra, o problema geralmente está relacionado à incompleta eliminação da matriz da amostra durante a etapa de pirólise.

Nesse sentido, foram feitos ensaios para avaliar qual a massa mínima e máxima que poderia ser empregada para a determinação de F por HR-CS-MAS. Ensaios com massas de amostra de 0,1 a 2 mg foram feitos, e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 6.

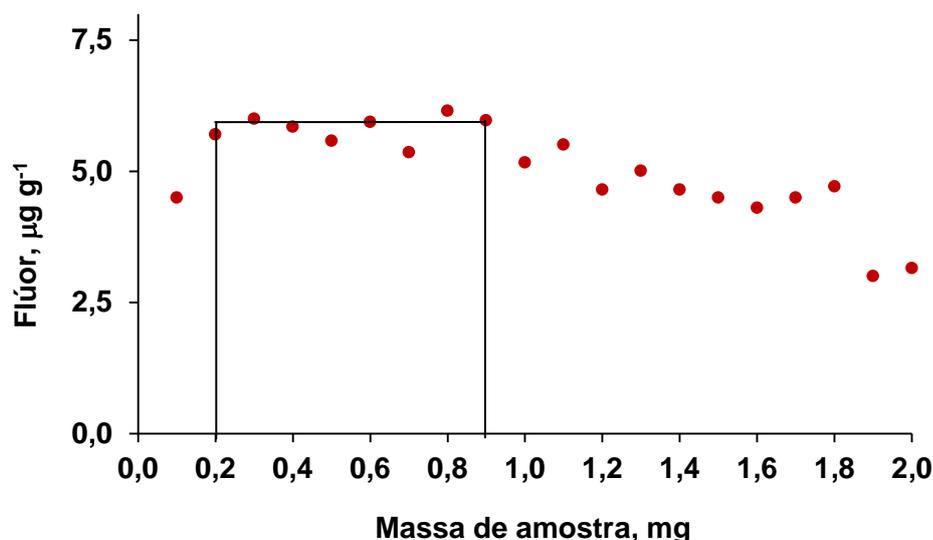


Figura 6. Influência da massa de amostra na determinação de F por HR-CS-MAS. Amostra: leite em pó contendo $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de F; $40 \mu\text{g}$ de Ca ($10 \mu\text{L}$ da solução contendo 4 g L^{-1} de Ca). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e $2200 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Quando massas de amostra inferiores a $0,2 \text{ mg}$ foram utilizadas, os resultados foram inferiores os valores de referência, resultados semelhantes foram obtidos por Flores em um estudo feito para determinação de F em carvão e alumina por GF MAS, usando a absorção molecular da AIF.⁷⁴ Por outro lado, quando massas de amostra superiores a 1 mg foram utilizadas, as baixas recuperações podem estar relacionadas ao excesso de gases gerados pela decomposição da amostra, levando ao resfriamento do sistema e, possivelmente, prejudicando a formação da molécula.⁷⁵

Neste sentido, na Figura 7 estão mostradas as plataformas de grafite contendo os resíduos da amostra de leite em pó após a determinação de F por HR-CS-MAS, variando a massa de amostra de $0,1$ a 2 mg . Nesses ensaios, as temperaturas de pirólise e vaporização foram utilizadas conforme já otimizado anteriormente, ou seja, $900 \text{ }^\circ\text{C}$ na etapa de pirólise e $2200 \text{ }^\circ\text{C}$ na etapa de formação da molécula.

Com o aumento da massa de amostra usada na determinação de flúor, o resíduo após o ciclo de aquecimento é maior. Esse resíduo é devido fração inorgânica da amostra de leite em pó que não foi vaporizada.

⁷⁴ Flores, E. L. M., Tese de Doutorado, UFSM, 2010

⁷⁵ Belarra, M. A. et al., *Spectrochim. Acta B* 52 (1997) 1855-1860

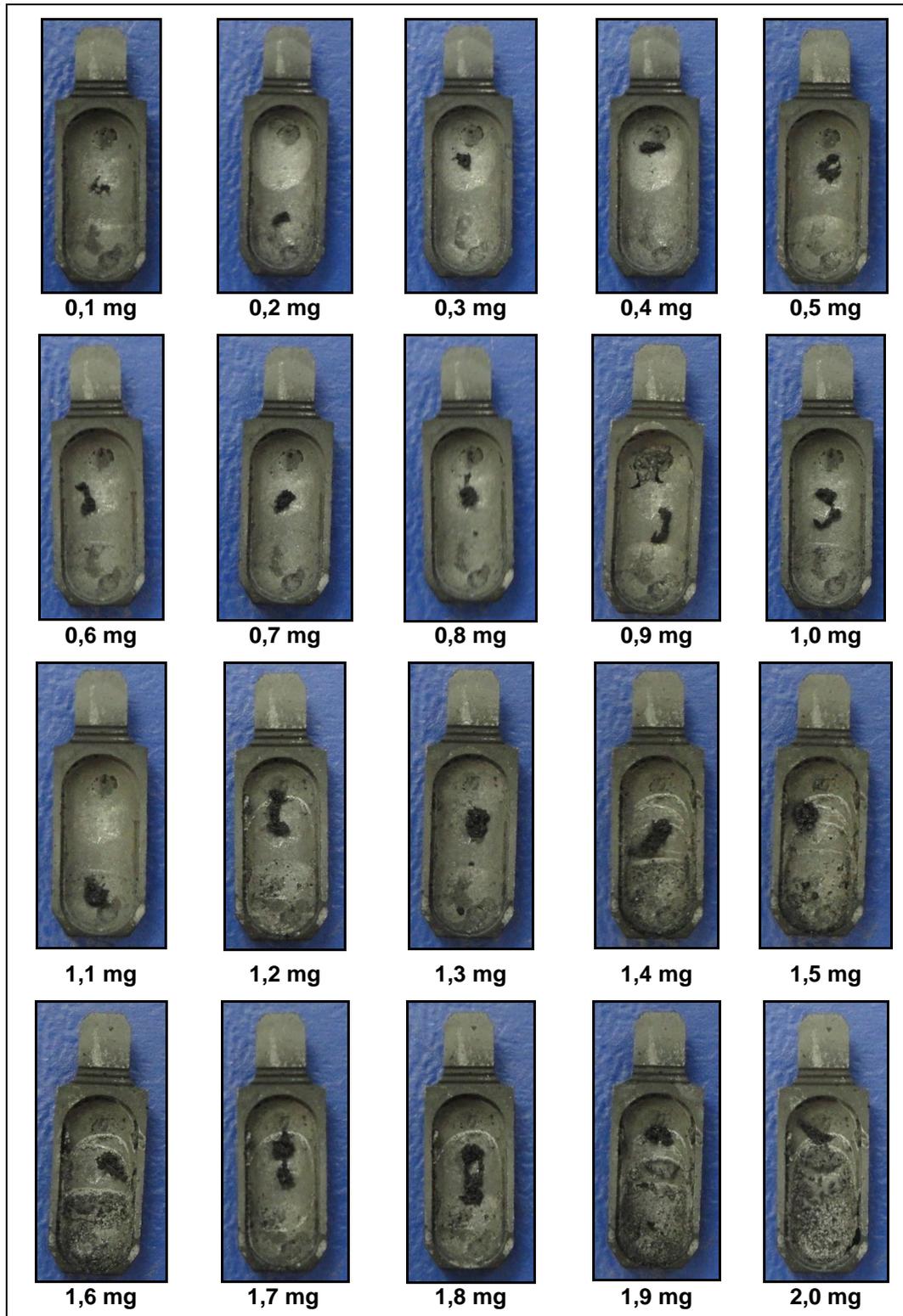


Figura 7. Resíduo da amostra de leite em pó após a determinação de F por HR-CS-MAS. Abaixo de cada plataforma está identificada a massa (mg) de amostras de leite em pó utilizada. Ciclo de aquecimento: 900 °C na etapa de pirólise e 2200 °C na etapa de formação da molécula.

4.2.1.8. Curva de calibração para determinação de flúor por HR-CS-MAS

Idealmente, para determinações por análise direta de sólidos, a calibração deve ser feita com o uso de materiais de referência certificados que apresentem semelhança com a matriz da amostra e, ainda contenham o analito em questão. Porém, nem sempre estão disponíveis materiais que apresentem essas características. Além disso, este tipo de material, geralmente, apresenta um custo bastante elevado, inviabilizando sua utilização em muitos laboratórios.

Por outro lado, a calibração com soluções de referência aquosas é uma alternativa que vem sendo empregada em muitos estudos.⁷⁶⁻⁷⁸ Entretanto nem sempre esse procedimento é adequado, pois a liberação do analito da matriz da amostra pode ocorrer de forma diferente da forma de vaporização do analito da solução aquosa. Quando isso ocorre, é comum que diferentes temperaturas sejam empregadas para solução de referência e para amostra sólida. Uma das formas de identificar se há a possibilidade de calibração com solução aquosa para posterior determinação dos analitos em amostras sólidas, pode ser feita pela comparação do perfil das curvas de pirólise e vaporização obtidas com o uso de soluções aquosas com às obtidas pelo uso da amostra sólida.

Assim, avaliando-se as curvas de pirólise e vaporização da solução de referência aquosa e da amostra de leite em pó, e pode-se verificar que a temperatura adequada para a formação da molécula foi de 2200 °C e, essa foi coincidente para ambas. Esse é um importante aspecto a ser considerado, pois se poderia inferir que o comportamento térmico do analito e a ação do modificador químico são similares tanto para a solução aquosa como para a amostra de leite em pó. Outro aspecto ainda mais importante é a comparação entre as massas características da solução aquosa e da amostra sólida, as quais podem indicar se a migração do analito para a fase vapor durante a vaporização ocorre de forma idêntica entre a solução aquosa e a amostra sólida. Diferenças muito grandes entre os valores de massa característica (m_0) para solução e amostra sólida pode ser um indicativo que, determinados constituintes da matriz da amostra podem estar interferindo na taxa de vaporização do analito, resultando em sinais de absorvância dos analitos e massas características diferentes dos obtidos com a solução de referência aquosa. Os valores de massa característica obtidos para solução de calibração e amostra sólida foram de 49,8 e 50,6 pg, respectivamente. Os valores de massa característica não apresentaram diferenças significativas entre si (teste *t-Student*, nível de confiança de 95%), de forma que a calibração foi feita com o uso de soluções de referência se tornou viável. Na Figura 8 está mostrada a

⁷⁶ Mello, P. A. et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, 22 (2011) 1040-1049

⁷⁷ Huang, M.D., Krivan, V., *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 297-303

⁷⁸ Mattos, J. C. P. et al. *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 637-643

curva de calibração e a faixa linear para F com soluções de referência aquosas e a respectiva equação da reta.

A curva calibração referente a absorção molecular do CaF foi obtida pelos valores das medidas de absorbâncias da molécula CaF a partir da solução de referência com incrementos crescentes de F. A partir desta curva de calibração, foi estabelecida a linearidade de resposta da massa de F em função da absorbância molecular integrada, obtida em 606,440 nm. Foram avaliadas massas de F de 0,25 a 100 ng e faixa linear foi entre 1 e 50 ng.

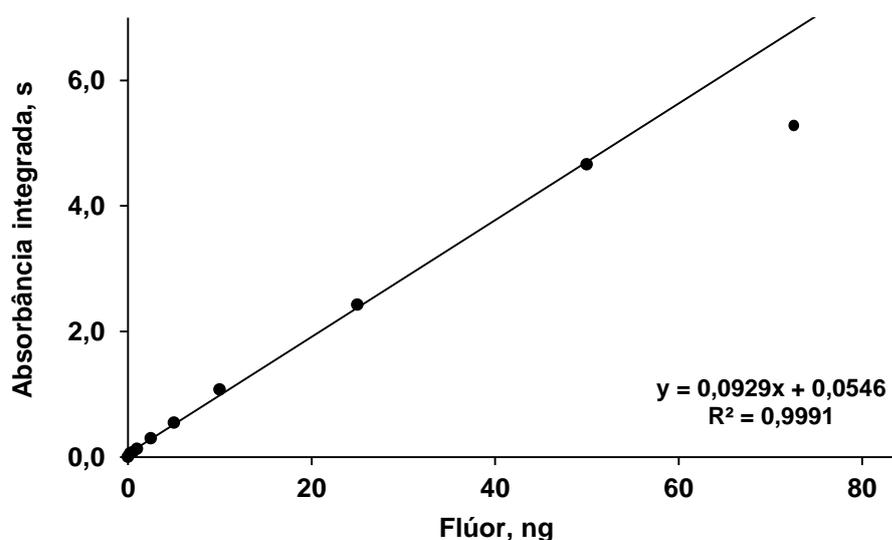


Figura 8. Curva de calibração para F usando em soluções de referência aquosa. Volume de solução padrão: 10 μL + 40 μg de Ca (10 μL da solução contendo 4 g L^{-1}). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 2200 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

4.2.1.9. Determinação de F em amostra biológica e CRM por HR-CS-MAS

Após a etapa de otimização das condições operacionais, incluindo as temperaturas de pirólise e vaporização, massa de amostra, massa de modificador químico, foi avaliada a aplicabilidade do método para a determinação de F em outras amostras biológicas. As amostras de leite em pó utilizadas neste estudo foram preparadas pela adição de F nas concentrações 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ e, identificadas como amostra 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A determinação de F também foi feita por IC, após a decomposição das amostras por MIC para comparação com os resultados obtidos por HR-CS-MAS. Os resultados estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Determinação de F em leite em pó por HR-CS-MAS. Média \pm desvio padrão em $\mu\text{g g}^{-1}$, n = 5, as incertezas correspondem aos desvios padrão.

Amostras	MIC-IC	HR-CS-MAS
1	5,89 \pm 0,25	5,62 \pm 0,31
2	10,6 \pm 0,2	10,6 \pm 1,3
3	21,2 \pm 0,9	20,7 \pm 2,8
4	37,7 \pm 1,0	37,4 \pm 3,5

Conforme pode ser observado na Tabela 9, os resultados para F, obtidos por IC após a decomposição das amostras de leite em pó por MIC não apresentam diferença significativa (teste *t-Student*, nível de confiança de 95%) em relação aos valores obtidos pela determinação de F empregando o método proposto neste trabalho (HR-CS-MAS). Além disso, o desvio padrão dos resultados obtidos pelo método proposto foi considerado adequado (< 10%), considerando-se a massa relativamente pequena de amostra.

Posteriormente, o método também foi aplicado para a determinação de F em CRMs de outros materiais biológicos, como leite em pó (NIST 8435 e 1549), músculo bovino (NIST 8414) e tecido de ostra (NIST 1566a). Para os CRMs de leite em pó e músculo bovino, os valores obtidos foram abaixo do limite de quantificação (< 2,02 $\mu\text{g g}^{-1}$) do método para determinação de F por HR-CS-MAS (valores informados para F, NIST 8435: 0,17; NIST 1549: 0,20 e NIST 8414: 0,22 $\mu\text{g g}^{-1}$). No caso do CRM de tecido de ostra, a concentração de F informada é de 240 $\mu\text{g g}^{-1}$. Essa concentração está fora da faixa linear do método proposto (até 50 $\mu\text{g g}^{-1}$, usando 1 mg de amostra).

Na Tabela 10 estão mostradas, de forma resumida, as características do método proposto para determinação de F por HR-CS-MAS. Para a obtenção dos resultados mostrados a seguir foram utilizadas as condições previamente estudadas neste trabalho. Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 2200 °C; massa de Ca: 40 μg .

Tabela 10. Parâmetros de mérito do método para determinação de F por HR-CS-MAS.

Parâmetros	
Frequência de análise, h ⁻¹	15
Massa característica, pg	50,6
Faixa linear, ng de F	1 a 50
Limite de detecção, µg g ⁻¹	0,72
Limite de quantificação, µg g ⁻¹	2,4
Desvio padrão relativo (n = 5), %	< 10

Na Tabela 10, são apresentados os valores de LOD, m_0 e faixa linear para o método proposto para determinação de F por HR-CS-MAS e a comparação com outros estudos reportados na literatura. É importante destacar que todos os trabalhos mostrados na Tabela 11 foram desenvolvidos usando um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua e alta resolução e a determinação de F foi feita pela absorção molecular de CaF em 606,440 nm.

Tabela 11. Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes os métodos para determinação de F por HR-CS-MAS

Referência	LOD, ng	LOQ, ng	m_0, pg	Faixa linear, ng
Método proposto	0,72	2,4	50,6	1 a 50
Ref. 49	0,26	NI	130	até 100
Ref. 50	1,6	5,2	2500	5 a 250
Ref. 51	0,21	NI	130	até 100

NI - valor não informado

Conforme pode ser observado na Tabela 11, os valores de limites de detecção e quantificação foram, relativamente, similares aos obtidos nos outros trabalhos usando a absorção molecular (CaF) para a determinação de F por HR-CS-MAS. No entanto, a m_0 foi menor que as encontradas nos outros trabalhos.

O método proposto nesse trabalho para a determinação de F (CaF, 606,440 nm) mostrou-se apropriado para amostras biológicas, mesmo quando F estiver presente em baixas concentrações. Apesar das amostras utilizadas nesse estudo apresentarem

⁴⁹ Ozbek, N., Akman, S., *Food Chem.* 138 (2013) 650-654

⁵⁰ Morés, S. *et al.*, *Talanta* 85 (2011) 2681-2685

⁵¹ Ozbek, N., Akman, S., *E3S Web of Conferences* 1 05006 (2013)

concentração natural de flúor abaixo do LOD obtido, existem alguns países que fazem a adição de flúor ao leite para a manutenção da saúde oral da população. Neste contexto, é muito importante o desenvolvimento de métodos que permitam a determinação desse elemento mesmo quando presente em níveis de traço ($\mu\text{g g}^{-1}$).

4.3. Determinação de cloro por HR-CS-MAS

4.3.1. Escolha da molécula para a determinação de cloro por absorção molecular

Alguns estudos tem sido desenvolvidos para a determinação de cloro utilizando a absorção molecular empregando monocloreto de alumínio (AlCl).⁷⁹⁻⁸¹ Nos primeiros trabalhos foram empregados equipamentos de absorção atômica equipado com lâmpada de cátodo oco de Pb. Uma das linhas de absorção do chumbo (261,4 nm), corresponde à energia absorvida pela molécula de AlCl, formada em fase vapor. De maneira geral, as condições empregadas para a determinação de cloro usando a absorção molecular de AlCl não variaram muito desde os trabalhos com equipamentos que empregavam fonte de linhas. Nesses trabalhos, Al foi empregado para formação da molécula de interesse (AlCl) e, estrôncio foi o modificador químico mais amplamente empregado para fixar o cloro durante a etapa de pirólise e para reduzir e/ou eliminar as perdas de analito pela formação de espécies voláteis de cloro.

Recentemente, os equipamentos de absorção atômica com fonte contínua começaram a ser utilizados para a determinação de cloro por MAS.^{53,54} Nesses trabalhos, o comprimento de onda monitorado é 261,418 nm, referente a absorção molecular de AlCl. As temperaturas de pirólise a vaporização, massa de modificador químico e do reagente formador da molécula tem sido avaliados.

Neste sentido, o presente trabalho utilizou alguns parâmetros previamente estabelecidos na literatura para a determinação de Cl em alimentos por HR-CS-MAS. No estudo publicado por Fechetia e colaboradores⁵⁴ foi utilizada uma solução contendo Al-Ag-Sr nas concentrações de 1 g L^{-1} de cada um desses elementos. As temperaturas de pirólise e vaporização selecionadas foram 500 e 2200 °C, respectivamente.

Inicialmente, foram utilizadas as mesmas condições estabelecidas no trabalho acima citado e foram feitos experimentos utilizando 10 μL da solução contendo 25 mg L^{-1} de Cl. Posteriormente, embora não estejam apresentadas no presente trabalho, foram obtidas as

⁷⁹ Parvinen, P., Lajunen, L. H. J., *Talanta* 50 (1999) 67-71

⁸⁰ Dittrich, K., *Talanta* 31 (1984) 341-345

⁸¹ Tsunoda, Kin-ichi, Fujiwara, K., Fuwa, K., *Anal. Chem.* 50 (1978) 861-865

⁵³ Heitmann, U. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1314-1320

⁵⁴ Fechetia, M., Tognon, A. L., Veiga, M. A. M. S., *Spectrochim. Acta Part B* 71-72 (2012) 98-101

curvas de pirólise e vaporização e, as temperaturas selecionadas foram relativamente semelhantes às obtidas no trabalho para determinação de Cl em alimentos: pirólise a 700 °C e vaporização a 2200 °C.

A seguir foram estudadas as temperaturas de pirólise e vaporização para a amostra sólida. Nesses experimentos foi utilizado o CRM NIST 8414 (Cl = 0,188 ± 0,015%). Foi observada uma grande variação nos resultados obtidos, independente da temperatura utilizada. Uma das possíveis justificativas pela variação dos resultados seria a elevada absorvância, a qual foi superior a 2 (altura do pico) mesmo com a utilização de apenas 0,5 mg de amostra. Então, um fluxo de argônio (1 ou 2 mL min⁻¹) foi utilizado durante a etapa de formação da molécula para redução da sensibilidade do método. Os valores de absorvância foram reduzidos significativamente com o uso de ambas as vazões de Ar, onde a absorvância foi reduzida aproximadamente 4 e 15 vezes (uso de 1 e 2 mL min⁻¹ de Ar, respectivamente). Por outro lado, o RSDs das 10 medidas foi superior a 20% em ambos os casos. Por esse motivo optou-se por não utilizar a passagem de Ar durante a etapa de vaporização. Essa baixa precisão dos resultados pode ser explicada pelo espalhamento da radiação devido a matéria inorgânica restante da amostra, a qual não foi eliminada durante a pirólise. Quando não há passagem de gás durante a etapa de vaporização, o resíduo inorgânico permanece fixo na plataforma de grafite. Porém, quando há a presença de um fluxo de argônio, esse resíduo possivelmente se espalha pelo interior do tubo de grafite, resultando no espalhamento da radiação. Outro fator que pode estar contribuindo para obtenção dos elevados valores de RSD pode ser devido ao resfriamento ocasionado pela passagem do Ar. Além disso, é importante salientar que, independente do uso ou não do fluxo de Ar durante a etapa de formação da molécula, observou-se que apenas a adição da solução contendo Al-Ag-Sr 1 g L⁻¹ resultou na obtenção de valores de brancos analíticos, relativamente elevados e com considerável variação (absorvância = 0,278 ± 0,130).

Posteriormente, optou-se por avaliar a mistura de Al e Sr sem a presença de Ag. Principalmente porque nos estudos desenvolvidos utilizando essa mistura (Al-Ag-Sr) não há explicação referente a presença da prata, nem são apresentados resultados sem o uso deste elemento. Por outro lado, o uso das soluções contendo somente Al e Sr foi feito em um trabalho desenvolvido por Flores⁷⁴ para a determinação de cloro em carvão e alumina usando a amostragem direta e sólidos em forno de grafite. Nesse contexto, inicialmente, foram empregadas as condições escolhidas no estudo para determinação de cloro em carvão e alumina. Então, foi utilizado 250 ng de cloro (10 µL da solução contendo 25 mg L⁻¹

⁷⁴ Flores, E. L. M., Tese de Doutorado, UFSM, 2010

de Cl), 20 µg de Sr (10 µL da solução contendo 2000 mg L⁻¹ de Sr) e 2 µg de Al (10 µL da solução contendo 200 mg L⁻¹ de Al). As temperaturas de pirólise e vaporização empregadas foram de 700 e 2100 °C, respectivamente. Essas condições também foram aplicadas para 1 mg do CRM de material biológico de músculo bovino (NIST 8414). A concentração de cloro certificada é de 0,188 ± 0,015%.

Inicialmente foram feitos ensaios empregando apenas solução contendo Cl, Al e Sr, onde foi observado que o sinal obtido em 261,418 nm retornou à linha base em 6 s e, o RSD referente a 10 medidas de absorvância foi relativamente baixo (9%). Então, ensaios preliminares também foram feitos para o CRM de músculo bovino. Entretanto, a absorvância em altura, usando 0,5 mg de amostra, foi de 6,44 e, o RSD para 10 medidas foi maior que 20%. Assim, optou-se por avaliar alguma modificação no método que contribuísse para a redução da sensibilidade resultando em menores valores de absorvância.

Como a passagem de argônio durante a etapa de formação da molécula já havia sido avaliada e não foram obtidos bons resultados (RSD superior a 20%), optou-se por avaliar a possibilidade de trabalhar com menos de 3 pixels do detector. Esse procedimento foi utilizado para auxiliar na redução na sensibilidade do método.

Inicialmente foram selecionados apenas os pixels laterais ao pixel central (101), ou seja, o 100 e o 102. Esta avaliação foi feita com 0,5 mg do CRM NIST 8414. Os valores de absorvância integrada em área e normalizada pela massa de amostra foram de 2,62 ± 0,85 (RSD = 33%, n = 10). Em vista do elevado RSD, optou-se por avaliar o uso de apenas um pixel do detector, ou seja, o pixel central (101). Então a absorvância integrada foi normalizada pela massa de amostra foi de 1,08 ± 0,12 (RSD = 11%, n = 10). Mediante a melhor relação absorvância/massa obtida pelo uso de apenas de 1 pixel do detector, esse modo foi selecionado no método e os demais ensaios foram conduzidos pelo uso dessa condição. Além disso, usando os pixels vizinhos ao central (100 e 102) a absorvância diminuiu aproximadamente 4,5 vezes em relação ao uso dos três pixels (100, 101 e 102) e com o uso apenas do pixel central (101) a absorvância diminuiu, aproximadamente, 10 vezes. Isto permitiu que fossem estudadas as temperaturas de pirólise e vaporização para a determinação de cloro por MAS usando a absorção molecular do AlCl (absorvância em 261, 418 nm).

4.3.2. Curvas de pirólise e vaporização

Para a determinação de cloro por absorção molecular, o ajuste dos parâmetros de temperatura do programa de aquecimento do forno de grafite é feito, comumente, através da avaliação das curvas de pirólise e vaporização. Uma das características desejáveis para um

método empregando análise direta de sólidos é a possibilidade de fazer a calibração com soluções de referência aquosas, evitando a utilização de CRMs sólidos ou adição de padrão sobre a matriz da amostra. Dessa forma, as curvas de pirólise e vaporização foram feitas para as soluções de referência e para a amostra sólida a fim de encontrar uma condição de compromisso para que as soluções de calibração e a amostra sólida. Na Figura 9 estão mostradas as temperaturas de pirólise e vaporização usando solução de referência aquosa e amostra sólida.

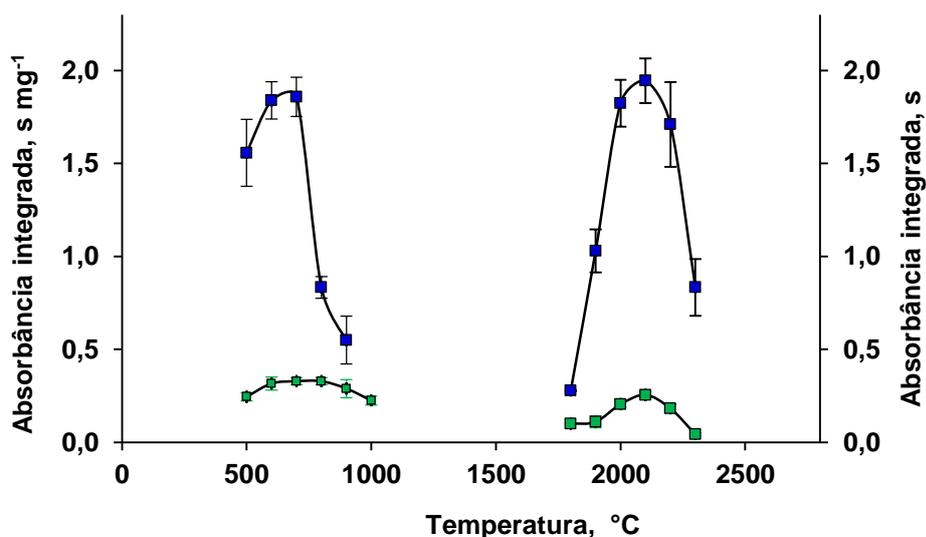


Figura 9. Curvas de temperaturas de pirólise e vaporização para Cl usando — solução de referência aquosa contendo 250 ng de Cl (10 μ L de solução contendo 25 mg L⁻¹ de Cl, eixo y da direita) e curvas de pirólise e vaporização usando — músculo bovino (NIST 8414) contendo 940 ng (0,5 mg do contendo 0,188 \pm 0,015 % de Cl, eixo y da esquerda) + 2 μ g de Al + 20 μ g de Sr. Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: 700 °C; e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: 2100 °C. Cada ponto representa a média de 5 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão.

As temperaturas de pirólise e vaporização selecionadas para a solução de referência aquosa e para a amostra sólida foram as mesmas, 700 e 2100 °C, respectivamente, evidenciando assim, a possibilidade de calibração do equipamento com o uso de soluções aquosas.

4.3.3. Influência da adição de Al e Sr sobre a absorção molecular de AlCl

Para a formação de AlCl em fase gasosa um dos requisitos é que o elemento que forma a molécula diatômica com o cloro (nesse caso o Al) esteja presente em excesso, de

modo que o equilíbrio químico seja deslocado no sentido de formação da molécula de AlCl. Conforme os resultados mostrados na Figura 10, a quantidade adequada de Al para a formação de AlCl foi ajustada com a adição de 10 μL de soluções contendo massas variáveis de até 4 μg de Al, mantendo fixa a massa de Cl e de Sr. Esses ensaios foram feitos para a solução de referência aquosa e para a amostra sólida. As temperaturas de pirólise vaporização utilizadas foram de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

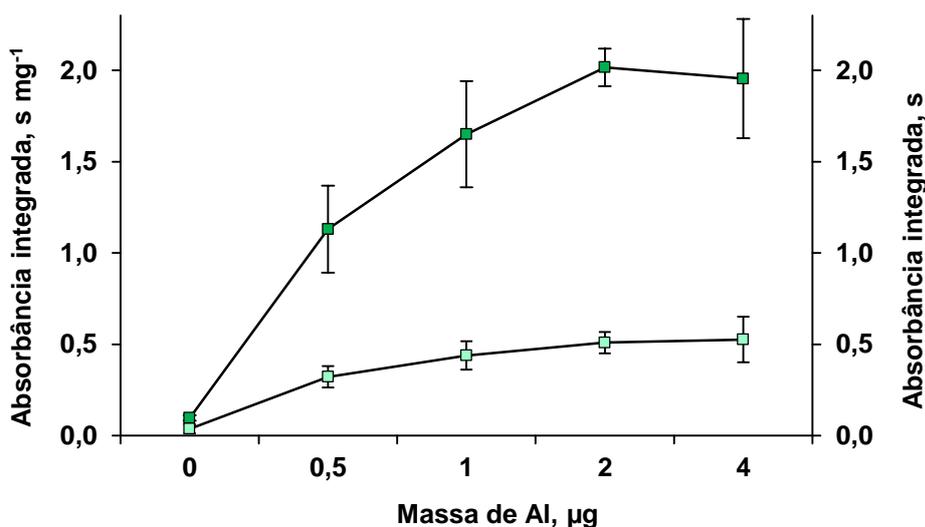


Figura 10. Influência da massa de Al (0 a 4 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do AlCl (sinal integrado em área). Ensaios usando: \square 250 ng de Cl (10 μL de solução contendo 25 mg L^{-1} de Cl, eixo y da direita) e \blacksquare usando amostra sólida de CRM de músculo bovino contendo 940 ng de Cl (0,5 mg do CRM de músculo bovino 0,188 \pm 0,015 % de Cl, eixo y da esquerda); temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão.

Conforme pode ser observado na Figura 10, massas de até 1 μg de Al não foram adequadas para a formação da molécula de AlCl. Ou seja, os valores de absorbância foram inferiores aos obtidos com uso de 2 ou 4 μg de Al. Possivelmente, o uso de 1 μg de Al não foi suficiente para deslocar o equilíbrio químico da reação favorecendo a formação quantitativa da molécula de AlCl. É importante mencionar que o uso de 4 μg de Al levou a obtenção de sinais analíticos mais alargados e algumas vezes não retornaram totalmente à linha base. Sendo assim, os testes subsequentes foram feitos com a adição de 2 μg de Al.

Posteriormente, foram feitos ensaios para avaliar a massa de Sr necessário para auxiliar na determinação de Cl pela absorção molecular do AlCl. É importante destacar que o estrôncio foi utilizado neste estudo com a finalidade de formar uma molécula estável com

o cloro (SrCl_2) de modo a evitar perdas de analito na etapa de pirólise. O uso do estrôncio levou a obtenção de resultados positivos na determinação de cloro. Os resultados obtidos nesse estudo estão mostrados na Figura 11. Conforme pode ser observado, massas de estrôncio superiores a 10 μg levaram a um sinal de absorvância mais elevado quando comparado ao uso de menores quantidades desse modificador. Entretanto, com o uso de 20 μg de Sr o sinal analítico foi ainda maior que quando 10 μg de Sr foi utilizando, indicando a necessidade do uso de maiores quantidades desse reagente para evitar perdas de analito. Ainda, com o uso de 40 μg de Sr o sinal referente a absorção molecular de AlCl foi estatisticamente igual (teste *t-Student*, nível de confiança de 95%) ao valor obtido usando 20 μg de Sr. Porém, assim como já observado em testes anteriores, o uso de elevadas concentrações de modificadores químicos levam a obtenção de sinais analíticos mais alargado, os quais, muitas vezes, não retornam à linha base. É relevante salientar que, muitas vezes o valor de absorvância obtido é superior ao obtido com massas menores de modificador químico, mas é necessário levar em consideração a busca por uma condição de compromisso, a qual deve estar relacionada com a maior absorvância sem deixar que levar em consideração o perfil do sinal analítico, o qual, deve obrigatoriamente retornar à linha base.

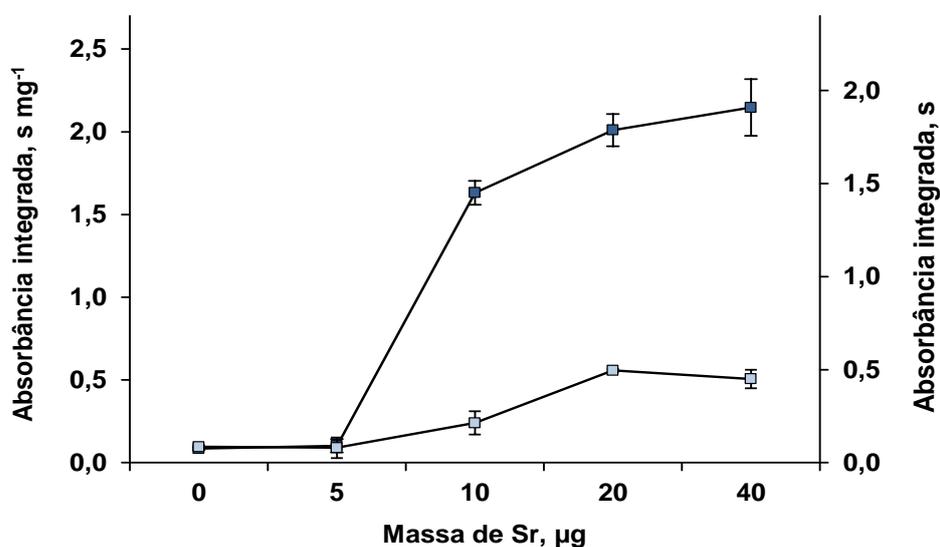


Figura 11. Influência da massa de Sr (0 a 40 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do AlCl (sinal integrado em área). Ensaios usando: □ solução contendo 250 ng de Cl (10 μL de solução contendo 25 mg L^{-1} de Cl, eixo y da direita) e ■ amostra de CRM de músculo bovino contendo 940 ng de Cl (0,5 mg do CRM de músculo bovino 0,188 \pm 0,015 % de Cl, eixo y da esquerda) ; temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão.

4.3.4. Sinais obtidos pela absorção molecular de AlCl

Os sinais analíticos referentes à absorção da molécula AlCl em 261,418 nm são mostrados na Figura 12. Na Figura 12a está mostrado o perfil do sinal obtido pelo uso da solução de referência aquosa contendo 250 ng de Cl ($10 \mu\text{L}$ da solução de Cl 25 mg L^{-1}). Na Figura 12b está mostrado o perfil do sinal obtido pela absorção molecular do AlCl a partir do 1500 ng de Cl liberado da amostra de músculo bovino (usando 0,8 mg da amostra contendo $0,188 \pm 0,015 \%$ de Cl).

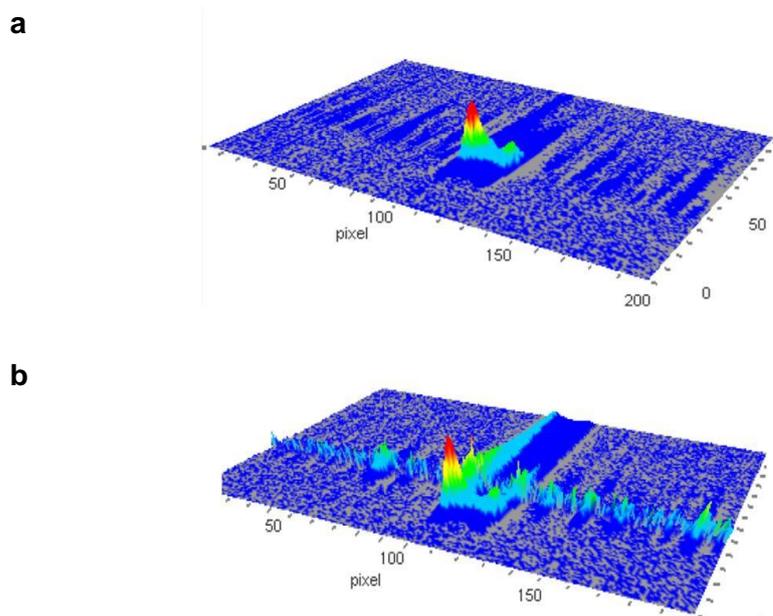


Figura 12. Sinal de absorção molecular obtidos usando: a) 1000 ng de Cl a partir de uma solução de referência em meio aquoso ($10 \mu\text{L}$ da solução contendo 100 mg L^{-1} de Cl); e, b) 940 ng de Cl a partir da amostra de músculo bovino ($0,5 \text{ mg}$ da amostra contendo $0,188 \pm 0,015 \%$). Condições empregadas: $2 \mu\text{g}$ de Al + $20 \mu\text{g}$ de Sr. Temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e $2100 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Conforme pode ser observado, os sinais analíticos obtidos em 261,418 nm para solução aquosa contendo 1000 ng de Cl e para amostra de músculo bovino contendo 940 ng de Cl (Figura 12a e 12b, respectivamente) apresentaram perfis muito semelhantes. Entretanto, no espectro obtido para a amostra sólida foram observados outros sinais de absorção, provavelmente referente a absorção atômica ou molecular de outros constituintes da amostra utilizada.

4.3.5. Curva de calibração para determinação de cloro por HR-CS-MAS

Uma das vantagens da análise direta de sólidos é a possibilidade de calibração com soluções de referência aquosas. Essa característica facilita a determinação dos elementos, principalmente em amostras cuja a disponibilidade de CRMs ainda é limitada. Neste sentido, inicialmente, foi feita a calibração com soluções de referência, utilizando as condições previamente estabelecidas (2 μg de Al, 20 μg de Sr, temperaturas de pirólise vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente). Porém, os valores de absorbância obtidos apresentam variação bastante elevada (RSDs superiores a 30%). Além disso, a resposta não foi linear em relação ao aumento da massa de analito. Sendo assim, optou-se por fazer a calibração utilizando um CRM de origem biológica. Para isso, foi utilizado o CRM de músculo bovino (NIST 8414), o qual já havia sido utilizado para o estudo da escolha das temperaturas de pirólise e vaporização. Para isso, foram utilizadas massas de CRM de 0,1 até 1,5 mg. Foi observado que a relação absorbância/massa de amostra foi linear no intervalo de 0,2 a 0,8 mg. Para obtenção da curva de calibração foram considerados os valores de absorbância x massa de cloro (ng) obtidos apenas quando amostras no intervalo de 0,2 a 0,8 mg foram utilizadas. A curva de calibração obtida para Cl, usando CRM NIST 8414 está mostrada na Figura 13.

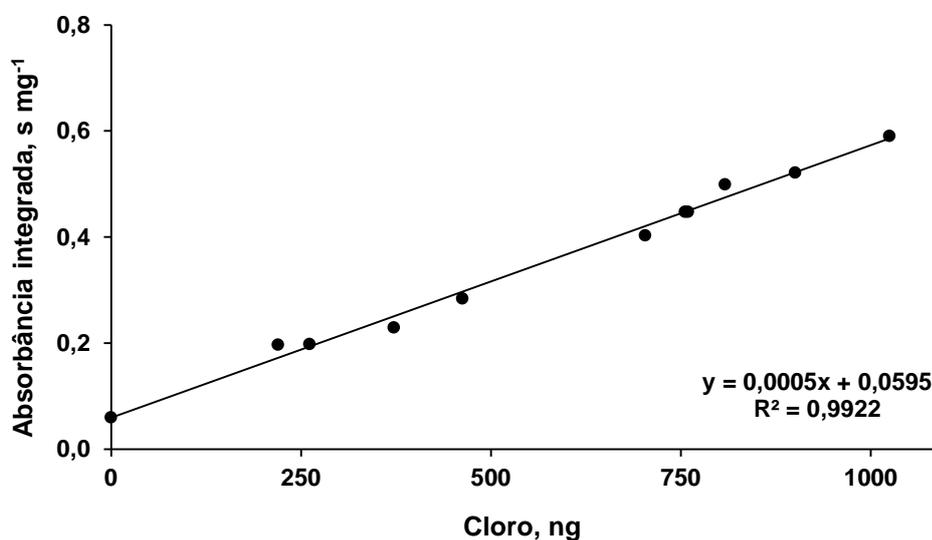


Figura 13. Curva de calibração para Cl, como AlCl, usando CRM NIST 8414 (músculo bovino) contendo $0,188 \pm 0,015$ % de Cl) + 2 μg de Al + 20 μg de Sr. Temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Paralelamente à etapa de calibração, foi feito um estudo da massa de amostra que poderia ser empregada para determinação de cloro por HR-CS-MAS. É importante destacar

que o uso da técnica de absorção molecular em forno de grafite apresenta uma limitação em relação ao uso de elevadas massas de amostra. Nesse sentido, foram utilizadas massas de amostra de 0,1 a 1,5 mg para investigar qual a faixa que poderia ser utilizada nesse método. Esses ensaios foram feitos usando o CRM de músculo bovino (NIST 8414, $Cl = 0,188 \pm 0,015\%$). Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 14. Com essa avaliação, foi possível verificar que o uso de 0,2 a 0,8 mg de amostra foi adequado para a determinação de cloro em amostras biológicas. Possivelmente, a massa limitante (0,8 mg) deve-se a elevada concentração de cloro presente na amostra e não a massa de amostra propriamente dita. Então, com base nesses resultados (Figura 14) foram feitos os cálculos para obter valores referentes a faixa linear de massa de cloro, em ng. A linearidade de resposta do equipamento foi na faixa de 380 a 1500 ng de Cl.

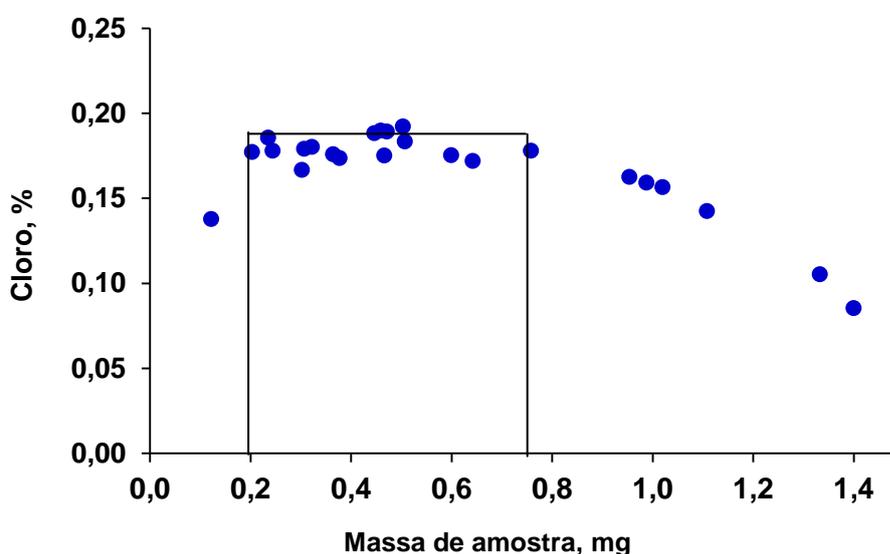


Figura 14. Influência da massa de amostra na determinação de Cl, como AlCl, por HR-CS-MAS.

Amostra de músculo bovino (NIST 8414, $Cl = 0,188 \pm 0,015\%$) + 2 μg de Al + 20 μg de Sr. Temperatura de pirólise e vaporização de 700 °C e 2100 °C, respectivamente.

Posteriormente, foi feita a determinação de cloro em amostras e CRMs de origem biológica. Esses experimentos foram utilizadas amostras de leite em pó integral, desnatado e semidesnatado, além dos CRMs NIST 1577 (fígado bovino, $Cl = 0,27\%$), NIST 8414 (músculo bovino, $Cl = 0,188 \pm 0,015\%$), NIST 8435 (leite em pó integral, $Cl = 0,842 \pm 0,044\%$), NIST 1549 (leite em pó desnatado, $Cl = 1,09 \pm 0,02$), NIST 8433 (farelo de milho, $Cl = 31 \pm 21 \mu\text{g g}^{-1}$) e DORM 1 (músculo de peixe, $Cl = 1,3 \pm 0,03 \%$). É importante mencionar que algumas das amostras utilizadas apresentaram concentração de cloro fora da faixa linear do método proposto (para o uso de 0,2 mg dos CRMs NIST 8435, |

Em relação às amostras de leite em pó integral, desnatado e semidesnatado, considerando o uso de 0,2 mg de amostra os valores de Cl seriam de 1850, 2087 e 1955 ng, respectivamente. Esses valores não estão dentro da faixa linear do método proposto para determinação de cloro por HR-CS-MAS. Cabe destacar que, os valores usados como referência para os cálculos acima foram obtidos por ICP-MS após a decomposição das amostras por MIC.

Na Tabela 12 são mostrados os resultados de Cl por HR-CS-MAS obtidos para as amostras biológicas. Não foram inseridos os resultados obtidos para as amostras que apresentaram concentração de Cl fora da faixa linear do método proposto. A faixa linear, bem como o efeito da massa de amostra foram avaliados através da variação das massas de amostra no intervalo de 0,1 a 1,5 mg. Nesses experimentos foi utilizado o CRM NIST 8414 (músculo bovino), conforme os resultados apresentados na Figura 12.

Tabela 12. Determinação de Cl em amostras biológicas por HR-CS-MAS. Resultados em %, n = 5 (as incertezas correspondem aos desvios padrão)

Amostra	Concentração de Cl, %		Concordância, %
	Valor certificado	Valor encontrado	
NIST 1577	0,27**	0,29 ± 0,27	107
NIST 8414	0,188 ± 0,015	0,179 ± 0,021	95
NIST 8433	31 ± 21*	< 34*	-

* resultados em g kg⁻¹

** valores somente informados

De maneira geral, o método para a determinação por HR-CS-MAS pode ser aplicado para a determinação de Cl em amostras biológicas. A exatidão do método foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos com os valores certificados. Conforme, mostrado na Tabela 12, a concordância dos valores está entre 95 e 107%, demonstrando a exatidão do método proposto. Por outro lado, estudos adicionais ainda são necessários para aplicação do procedimento proposto para amostras com concentrações de Cl mais elevadas que 0,5%. Como alternativa, sugere-se o uso de outra molécula que favoreça a obtenção de uma faixa de trabalho mais ampla.

Na Tabela 13 estão mostradas, de forma resumida, os parâmetros de desempenho do método proposto para determinação de Cl por HR-CS-MAS. Para a obtenção dos resultados mostrados a seguir foram utilizadas as condições previamente estudadas neste

trabalho. Temperaturas de pirólise e vaporização de 700 e 2100 °C; massa de Al e Sr 2 e 20 µg, respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros de mérito do método para determinação de Cl por HR-CS-MAS.

Parâmetros	
Frequência de análise, h ⁻¹	15
Massa característica, ng	6,15
Faixa linear, ng de Cl	380 a 1500
Limite de detecção, µg g ⁻¹	34
Limite de quantificação, µg g ⁻¹	112
Desvio padrão relativo (n = 5), %	< 12

Finalmente, o método proposto para determinação de Cl por HR-CS-MAS foi comparado com outros estudos reportados na literatura (Tabela 14).^{53,54} Os parâmetros comparados foram LOD, m_0 e faixa linear. É importante salientar que, até o presente momento há poucos trabalhos disponíveis na literatura usando a HR-CS-MAS para a determinação de Cl.

Tabela 14. Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes métodos para determinação de Cl por HR-CS-MAS

Referência	LOD, ng	LOQ, ng	m_0 , ng	Faixa linear, ng
Método proposto	34	193	6,15	380 a 1500
Ref. 53	0,300	NI	70	até 25
Ref. 54	1,2	NI	NI	6 a 36

NI - valor não informado

Conforme pode ser observado na Tabela 14, o LOD obtido nesse estudo está acima dos valores obtidos por outros trabalhos usando a absorção molecular para a determinação de Cl (na forma de AICl) por HR-CS-MAS. Possivelmente, porque foi selecionado apenas um *pixel* do detector, o que gerou uma maior variação dos valores obtidos para o branco analítico. Cabe salientar que, de maneira geral, a concentração de cloro em amostras biológicas está, geralmente, entre 0,1 e 1%. Nesse contexto, os valores mais elevados de

⁵³ Heitmann, U. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1314-1320

⁵⁴ Fechetia, M., Tognon, A. L., Veiga, M. A. M. S., *Spectrochim. Acta Part B* 71-72 (2012) 98-101

LOD não prejudicariam o desempenho do método. Contudo, o método proposto nesse trabalho para a determinação de Cl pela absorção molecular de AlCl (261,418 nm) mostrou-se apropriado para a determinação de Cl em amostras biológicas.

4.4. Determinação de bromo por HR-CS-MAS

4.4.1. Escolha da molécula para a determinação de bromo por absorção molecular

A determinação de Br usando a HR-CS-MAS é mais recente que para a determinação de F e Cl, sendo que na literatura existem poucos trabalhos para a determinação de Br por esta técnica.⁵⁵⁻⁵⁷ Nestes trabalhos, as moléculas monitoradas são, geralmente, CaBr e AlBr. O uso destas moléculas tem levado à obtenção de baixos LODs, o que é uma vantagem quando a determinação de bromo em baixa concentração é requerida. Além disso, principalmente para a molécula de CaBr, poucas interferências espectrais são observadas. A escolha por moléculas que absorvem radiação em comprimentos de onda na região do visível, como é o caso da molécula de CaBr (625,315 nm), apresenta a vantagem de ser menos suscetível a interferências uma vez que poucos elementos possuem linhas de absorção atômica nesse mesmo comprimento de onda. Essa questão é um pouco mais problemática quando se trata de moléculas que absorvem radiação na região do UV (AlBr, 278,914 nm), pois há muitos elementos que a absorvem radiação nessa faixa do espectro, aumentando as chances de interferências espectrais.

Contudo, optou-se por fazer a determinação de bromo em amostras biológicas empregando a molécula de CaBr. Para isso, estudos iniciais foram feitos com base em um trabalho desenvolvido por Florez e Resano⁵⁶ para a determinação de bromo em polímeros. Foram utilizados 10 μL de uma solução contendo 10 mg L^{-1} de Br, 10 μL de solução contendo 30 g L^{-1} de Ca e 10 μL de solução contendo 3000 mg L^{-1} de Pd. As temperaturas de pirólise e vaporização, previamente selecionadas, foram de 1000 e 2100 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.⁵⁶ Inicialmente, foi avaliada a massa de Ca para formação da molécula, bem como a quantidade de Pd utilizada para a formação da molécula CaBr em fase vapor. Os valores encontrados foram usados nos testes subsequentes.

⁵⁵ Limburg, T., Einax, J. W., *Microchem. J.* 107 (2013) 31-36

⁵⁶ Flórez, M. R., Resano, M., *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32-39

⁵⁷ Huang, M. D. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 566-570

4.4.2. Influência da adição de Ca e Pd na absorção molecular de CaBr

Conforme já mencionado, as massas de Ca e Pd utilizadas para a determinação de Br por HR-CS-MAS foram escolhidas conforme condições previamente estudadas por Flórez e Resano⁵⁶ (determinação de Br em polímeros). As condições iniciais foram 100 ng de Br, 300 μg de Ca e 30 μg Pd. Posteriormente, foi avaliado se as massas de Ca e Pd eram adequadas para a determinação de Br em amostras biológicas. Nesse sentido, foi avaliado o efeito da adição Ca (0 a 600 μg) sobre o sinal de absorção molecular em 625,315 nm. Os resultados correspondentes estão mostrados na Figura 15.

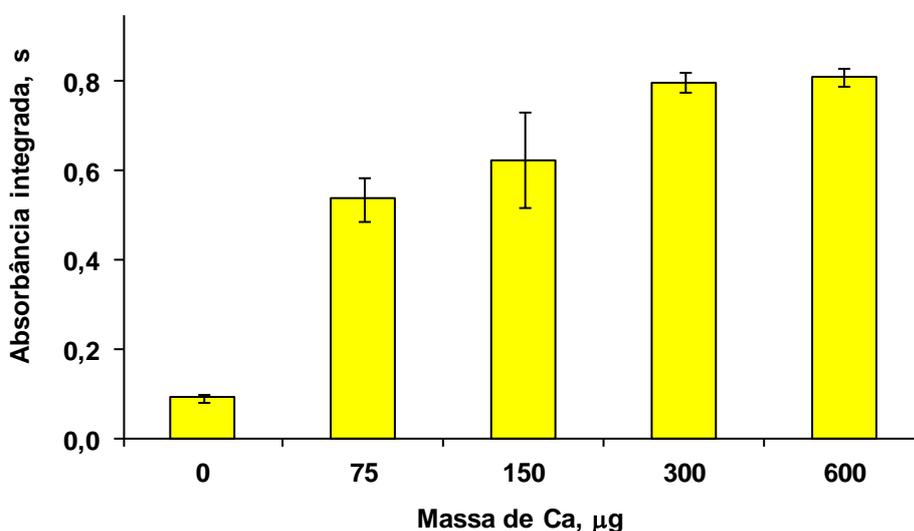


Figura 15. Influência da massa de Ca (0 a 600 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do CaBr (sinal integrado em área). Ensaios usando solução contendo 100 ng de Br (10 μL de solução contendo 10 mg L^{-1} de Br) e 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL da solução contendo 3000 mg L^{-1} de Pd). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão.

A sensibilidade foi maior empregando 300 e 600 μg de Ca. Embora com o uso de 150 μg de Ca o resultado obtido não teve diferença significativa quando comparado ao uso de 300 μg , o RSD das determinações de Br usando 150 μg de Ca foi superior a 10%. Assim, optou-se por fazer os demais experimentos utilizando 300 μg de Ca. É importante mencionar que, mesmo sem o uso de Ca foi obtida um sinal de absorbância, mas esse valor foi muito semelhante ao branco analítico.

⁵⁶ Flórez, M. R., Resano, M., *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32-39

Posteriormente, foi avaliada a massa de Pd. Ensaios foram feitos variando a massa de Pd de 0 a 60 μg , os resultados obtidos estão mostrados na Figura 16.

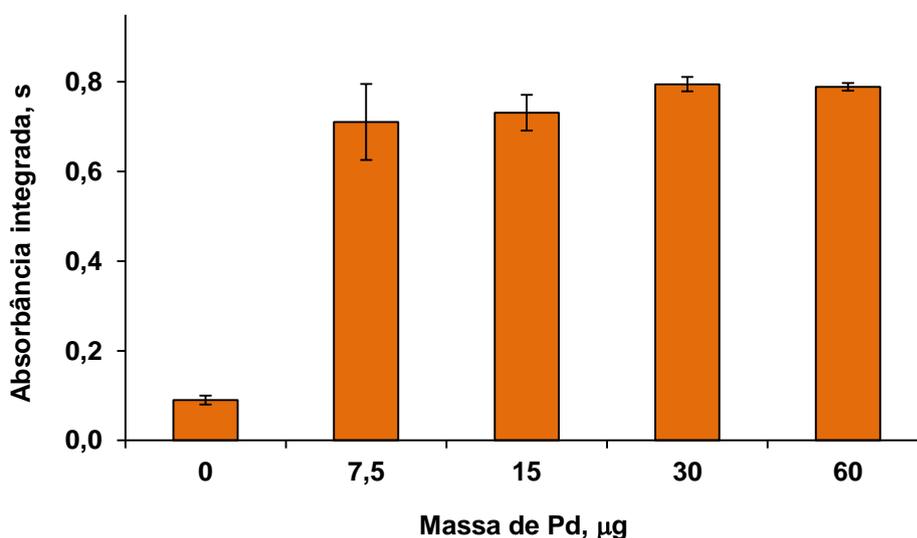


Figura 16. Influência da massa de Pd (0 a 60 μg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do CaBr (sinal integrado em área). Ensaios usando solução contendo 100 ng de Br (10 μL de solução contendo 10 mg L^{-1} de Br) e 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Pd). Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão.

Embora ainda não esteja bem elucidado na literatura qual é o mecanismo de ação do Pd, foi observado que esse elemento influencia na absorção molecular em 625,315 nm. De acordo com os resultados mostrados na Figura 16, sem o uso de Pd foi obtido um sinal de absorbância, mas esse foi igual ao branco analítico. Com o uso de massas de Pd menores que 15 μg a absorção molecular do CaBr foi menor do que com o uso de 30 μg de Pd ou mais. Dessa forma, optou-se por fazer os demais experimentos utilizando 30 μg de Pd.

4.4.3. Curvas de pirólise e vaporização

O ajuste do programa de aquecimento é parâmetro importante para determinação de halogênios por espectrometria de absorção molecular em forno de grafite. Na Figura 17 estão mostradas as curvas de pirólise a vaporização para a solução de referência aquosa contendo 100 ng de Br (pela adição de 10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de Br). Para

esse estudo, foram adicionados 10 μL das soluções contendo Ca (30 g L^{-1}) e Pd (3000 mg L^{-1}). As curvas de pirólise para amostra sólida não são mostradas, pois os valores obtidos em absorvância foram muito baixos (absorvância $< 0,07$).

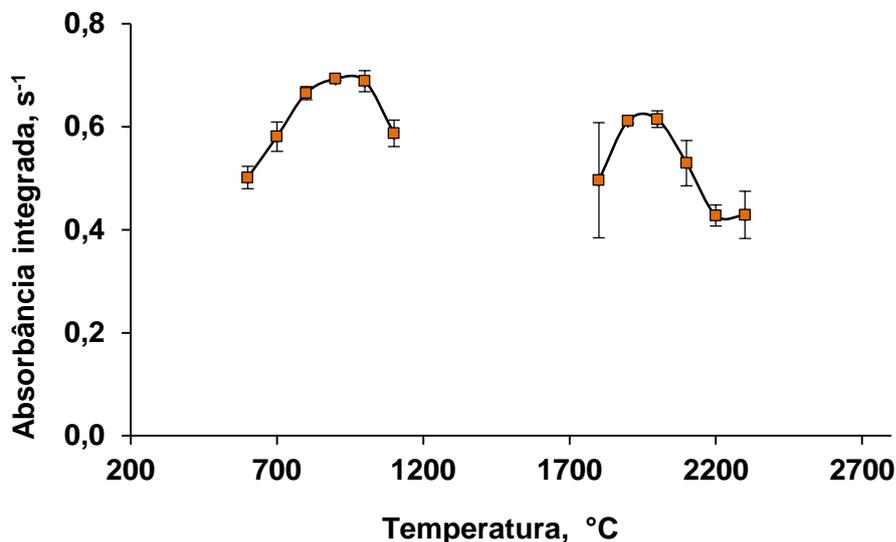


Figura 17. Curvas temperatura de pirólise e vaporização para Br em solução de referência aquosa contendo 100 ng de Br (pela adição de 10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de Br), 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Ca) e 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL de Pd contendo 3000 mg L^{-1}). Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: 1100 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: 2100 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações; barras verticais representam o desvio padrão.

Conforme mostrado na Figura 17, a temperatura de pirólise mais adequada para a determinação de Br foi à de 900 $^{\circ}\text{C}$. Essa temperatura é um pouco mais baixa do que às obtidas nos outros estudos já desenvolvidos usando a absorção molecular de CaBr, em 625,315 nm. Em um trabalho desenvolvido para determinação de Br em polímeros, a temperatura selecionada foi de 1000 $^{\circ}\text{C}$,⁵⁶ enquanto que, no estudo para determinação de Br em fármacos⁵⁷ a melhor temperatura de pirólise foi de 1400 $^{\circ}\text{C}$. Em outro trabalho para a determinação de Br em sais de bromo, a temperatura mais adequada foi de 1300 $^{\circ}\text{C}$ ⁵⁵. Possivelmente, foi utilizada maior temperatura para permitir a completa eliminação da matriz, tendo em vista que essa pode interferir durante a etapa de formação da molécula. Diferentemente do presente trabalho que a curva de pirólise foi feita apenas para soluções de referência aquosas de Br.

⁵⁵ Limburg, T., Einax, J. W., *Microchem. J.* 107 (2013) 31-36

⁵⁶ Flórez, M. R., Resano, M., *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32-39

⁵⁷ Huang, M. D. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 566-570

Em relação à temperatura de vaporização, a utilização de 1900 °C foi considerada como adequada para a formação da molécula de CaBr, em fase vapor. Nesse caso, o valor obtido foi concordante com os demais estudos para determinação de Br por HR-CS-MAS, onde as temperaturas obtidas variaram de 1800 a 2100 °C.⁵⁵⁻⁵⁷ Essas pequenas variações de temperatura podem ser atribuídas à variação dos diferentes equipamentos utilizados.

Posteriormente, embora esses resultados não estejam mostrados no presente trabalho, uma amostra de leite em pó integral foi utilizada para o estudo das temperaturas de pirólise e vaporização para a determinação de Br por HR-CS-MAS. Foi utilizado 1 mg da amostra de leite contendo 20 µg g⁻¹ de Br (resultados obtidos por ICP-MS, após a decomposição da amostra por MIC). Juntamente com o leite, foram adicionados 10 µL da solução contendo 30 g L⁻¹ de Ca e 10 µL da solução contendo 3000 mg L⁻¹ de Pd. O sinal referente à absorção molecular do CaBr resultou em uma absorbância integrada em área de 0,07 s. Entretanto, esperava-se que o valor de absorbância fosse maior, pois foi adicionado o equivalente a 20 ng de Br e os trabalhos previamente desenvolvidos para a determinação de Br por HR-CS-MAS indicaram, como LOD, valores de aproximadamente 1 ng (20 vezes menor do que a massa de Br utilizada). Então, passou-se a investigar se estaria acontecendo algum tipo de interferência durante a etapa de formação da molécula de CaBr em fase vapor, bem como a ocorrência de perdas de analito durante a etapa de pirólise. Ou, então, se estaria acontecendo outro tipo de interferência por parte dos demais íons presentes na amostra de leite em pó.

Neste sentido, existem dados na literatura que sustentaram a hipótese para a possível interferência de cloro e flúor durante a determinação de bromo por HR-CS-MAS. Possivelmente, esses elementos (F e/ou Cl) reagem com o Ca formando as respectivas moléculas, CaF e CaCl em fase vapor, resultando em menor quantidade de Ca livre interagir com o Br. Nesse sentido, foi feito um estudo sistemático para avaliar a possível interferência de F e/ou Cl sobre a formação da molécula de CaBr.

4.4.4. Influência de F e Cl na formação da molécula CaBr

Inicialmente, pensou-se em avaliar a interferência de F e Cl na determinação de Br por absorção molecular. Entretanto, esse estudo foi feito apenas para Cl, pois os valores obtidos para F, na amostra de leite em pó integral utilizada nesse trabalho, foram abaixo do LOD das técnicas de IC e ISE (após a decomposição da amostra por MIC).

⁵⁵ Limburg, T., Einax, J. W., *Microchem. J.* 107 (2013) 31-36

⁵⁶ Flórez, M. R., Resano, M., *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32-39

⁵⁷ Huang, M. D. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 566-570

Nesse sentido, foram avaliadas massas de Cl de 0 a 2500 ng. Cabe destacar que esse estudo foi feito com o uso de soluções de referência aquosas contendo Cl. Além disso, foram adicionados 10 μL da solução contendo 30 mg L^{-1} de Ca. Os resultados obtidos nesse estudo estão mostrados na Figura 18.

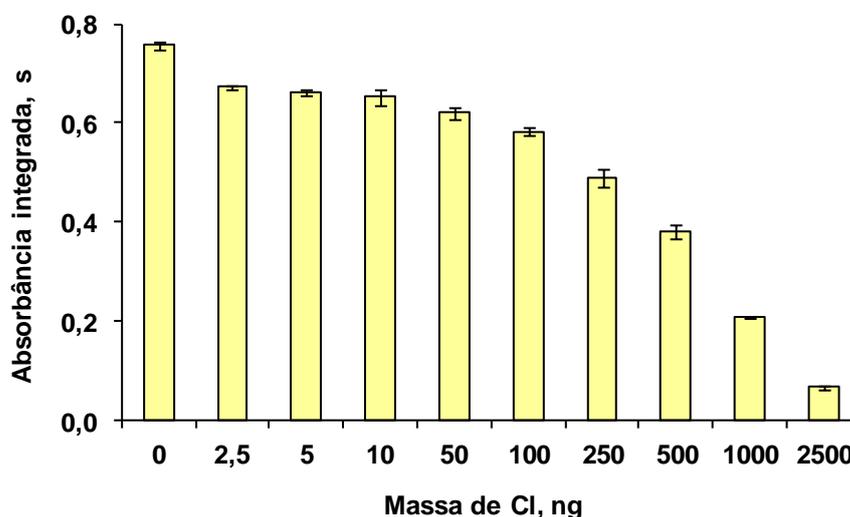


Figura 18. Influência de cloro sobre o sinal de absorção molecular do CaBr em solução aquosa. Condições utilizadas: 100 ng de Br (pela adição de 10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de Br), 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Ca) e 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL de Pd contendo 3000 mg L^{-1}). A temperatura de pirólise durante a curva de vaporização foi de 900 $^{\circ}\text{C}$; a temperatura de vaporização durante a curva de pirólise foi de 1900 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 18, observa-se que a presença de Cl interfere na determinação de Br por HR-CSMAS (absorção molecular em 625,315 nm). Além disso, com o aumento da massa de cloro, o sinal referente à absorção molecular do CaBr diminuiu consideravelmente e, com a adição de 2,5 μg de Cl, o sinal de absorbância do analito foi praticamente zero. Um mg de leite em pó integral contém aproximadamente 10 μg de Cl. De acordo com a Figura 18, essa quantidade já é suficiente para interferir na determinação de Br por HR-CSMAS. Nesse contexto, pode-se inferir que a quantidade de cloro, naturalmente presente na amostra de leite em pó integral, pode ser um dos motivos pela diminuição da intensidade do sinal analítico. É importante destacar que a concentração de cloro em amostras biológicas é, geralmente, elevado (entre 0,1 e 1 %), estando de acordo com o resultado previamente obtido.

4.4.5. Sinais obtidos pela absorção molecular de CaBr

Os sinais analíticos referentes à absorção da molécula CaBr em 625,315 nm são mostrados na Figura 19. Na Figura 19a está mostrado o perfil do sinal obtido pelo uso da solução de referência aquosa contendo 100 ng de Br ($10 \mu\text{L}$ da solução de Br 10 mg L^{-1}). Na Figura 19b está mostrado o perfil do sinal obtido pela absorção molecular do CaBr a partir do 20 ng de Br liberado da amostra de leite em pó (usando 1 mg da amostra contendo $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Br).

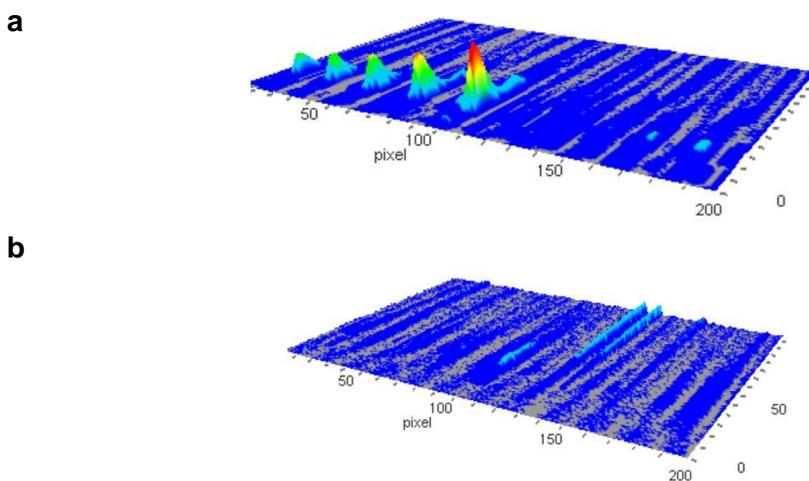


Figura 19. Sinal de absorção molecular obtidos usando: a) 100 ng de I a partir de uma solução de referência em meio aquoso ($10 \mu\text{L}$ da solução contendo 10 mg L^{-1} de Cl); e, b) 20 ng de I a partir da amostra de leite em pó (1 mg da amostra contendo $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Br). Condições empregadas: $300 \mu\text{g}$ de Ca e $30 \mu\text{g}$ de Pd. Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização: $900 \text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura de vaporização durante a curva de pirólise: $1900 \text{ }^\circ\text{C}$.

Conforme pode ser observado, com a adição da amostra contendo 20 ng de Br não foi obtido sinal referente a absorção molecular em 625,315 nm, enquanto que, para a solução de referência contendo 100 ng de Br, foi obtido um sinal de absorção molecular, o qual foi integrado em área e retornou à linha de base em 7 s. Possivelmente, não foi obtido sinal de absorção molecular quando a amostra foi empregada, devido a supressão do sinal de CaBr devido a elevada concentração e cloro presente na amostra.

4.4.6. Estudo para eliminação da interferência de Cl na determinação de Br por HR-CS-MAS

Posteriormente, foi estudada uma forma de diminuir a interferência de cloro e possibilitar, assim, a determinação de Br por HR-CS-MAS. Dessa forma, foi investigada a adição de soluções de NH_4NO_3 e NH_4OH , nas concentrações de 3, 6 e 12 mol L^{-1} . Nesses experimentos, foi utilizado 1 mg de leite em pó integral, 300 μg de Ca e 30 μg de Pd. As temperaturas de pirólise e vaporização empregadas foram de 900 e 1900 $^\circ\text{C}$, respectivamente.

Adicionalmente, foi incluída uma etapa de pré-pirólise no programa de aquecimento. Nessa etapa foram avaliadas as temperaturas de 300, 350 e 400 $^\circ\text{C}$. Esse estudo foi desenvolvido para avaliar a formação de NH_4Cl durante a etapa adicional utilizada e, pela emprego da temperatura de decomposição desse composto (aproximadamente 350 $^\circ\text{C}$), liberar o cloro presente na amostra antes da etapa de formação da molécula. É importante destacar que a temperatura de ebulição do NH_4Br é superior a do NH_4Cl , ou seja, 400 e 350 $^\circ\text{C}$, respectivamente. Essa diferença na temperatura de decomposição serviu de argumento para propor a liberação do Cl da matriz da amostra sem que houvessem perdas de significativas de Br.

Com a adição de NH_4NO_3 e NH_4OH , nas concentrações de 3, 6 e 12 mol L^{-1} , não foi observado aumento no sinal de absorvância (monitorada em 625,315 nm, referente à absorção molecular do CaBr), independente da temperatura empregada. Nesses experimentos, foram selecionadas as temperaturas adequadas para promover a decomposição do NH_4Cl e liberação do Cl na etapa de pré-pirólise. Entretanto, pode ser que o cloro liberado após a decomposição desse sal tenha interagido ao Ca, diminuindo sua disponibilidade para formar CaBr. Como consequência, o sinal de absorvância do analito permaneceu inalterado.

Ainda, é importante mencionar que as temperaturas de decomposição do NH_4Br e NH_4Cl são muito próximas, e o bromo também poderia estar sendo perdido durante a etapa de pré-pirólise. Nesse contexto, um estudo mais aprofundado precisaria ser feito para investigar a possibilidade de utilização dessa alternativa para promover a perda do cloro durante a etapa que antecede a pirólise.

4.4.7. Curva de calibração para determinação de bromo por HR-CS-MAS

Inicialmente, foi feita a calibração do equipamento com o uso de soluções de referência aquosas de Br. Foram utilizadas as condições previamente estabelecidas nesse

trabalho: 10 μL da solução de referência aquosa contendo Br; 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Ca); e, 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL de Pd contendo 3000 mg L^{-1}). As temperaturas de pirólise vaporização foram de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A curva de calibração obtida pode ser vista na Figura 18.

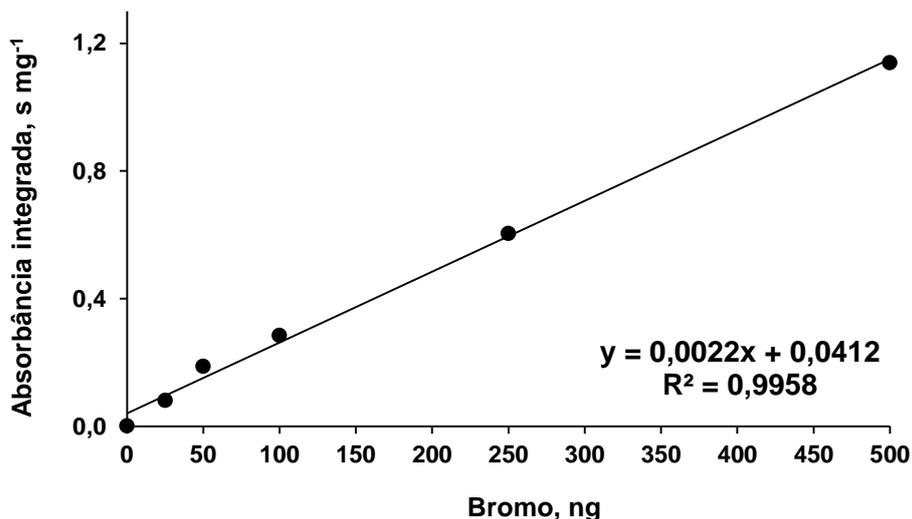


Figura 20. Curva de calibração para Br usando em soluções de referência aquosa. Condições utilizadas: 10 μL da solução de referência aquosa contendo Br; 300 μg de Ca (pela adição de 10 μL da solução contendo 30 g L^{-1} de Ca); e, 30 μg de Pd (pela adição de 10 μL de Pd contendo 3000 mg L^{-1}). Cada valor representa a média de 3 determinações. Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Embora a curva de calibração tenha apresentado boa linearidade ($R^2 = 0,9979$), a determinação de Br não pode ser feita no leite em pó, devido à supressão do sinal analítico. A elevada concentração de cloro, presente naturalmente na amostra, pode ser uma das interferências mais pronunciadas na determinação de Br por HR-CS-MAS. Nesse contexto, a curva de calibração foi inserida nesse trabalho apenas para evidenciar a potencialidade da utilização desse método para determinação de bromo, bem como a linearidade alcançada. Por fim, cabe destacar que, estudos subsequentes precisam ser feitos para a determinação de Br em amostras biológicas por HR-CS-MAS.

Na Tabela 15 estão mostradas, de forma resumida, as características do método proposto para a determinação de Br por HR-CS-MAS. Para a obtenção dos resultados mostrados a seguir foram utilizadas as condições previamente estudadas neste trabalho. Temperaturas de pirólise e vaporização de 900 e 1900 $^{\circ}\text{C}$; massa de Ca e Pd 300 e 30 μg , respectivamente.

Tabela 15. Parâmetros de desempenho do método para determinação de Br por HR-CS-MAS.

Parâmetros	
Frequência de análise, h ⁻¹	15
Massa característica, ng	0,55
Faixa linear, ng de Br	25 a 500
Limite de detecção, µg L ⁻¹	1,95
Limite de quantificação, µg L ⁻¹	6,49
Desvio padrão relativo (n = 5), %	5

Finalmente, o método proposto para determinação de Br por HR-CS-MAS foi comparado com outros estudos reportados na literatura (Tabela 15).⁵⁶⁻⁵⁸ Os parâmetros comparados foram LOD, m_0 e faixa linear. É importante salientar que, até o presente momento existem poucos trabalhos disponíveis na literatura utilizando a HR-CS-MAS para a determinação de Br.

Tabela 16. Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes os métodos para determinação de Br por HR-CS-MAS

Referência	LOD	LOQ	m_0, ng	Faixa linear, ng
Método proposto	1,95 µg L ⁻¹	6,49 µg L ⁻¹	0,55	até 200
Ref. 56	5,4 ng	NI	1,32	até 300
Ref. 58	2 ng	NI	NI	até 250

NI - valor não informado

4.5. Determinação de iodo por HR-CS-MAS

4.5.1. Escolha da molécula para a determinação de iodo por absorção molecular

Dentre os halogênios, I é o que conta com menos estudos sobre a determinação por HR-CS-MSA em forno de grafite. Embora a determinação possa ser feita pela absorção das moléculas de Gal, InI, Bal, somente essa última foi utilizada para determinação de I por HR-CS-MAS. Então, Bal foi escolhida para ser utilizada no presente trabalho.

No presente estudo para a determinação de I em amostras biológicas foi monitorada a absorção da molécula de Bal, em 538,308 nm. Ensaio iniciais foram conduzidos conforme reportado por Huang e colaboradores⁵⁸ em um trabalho desenvolvido para a determinação de iodo em amostras de fármacos.

⁵⁵ Limburg, T., Einax, J. W., *Microchem. J.* 107 (2013) 31-36

⁵⁶ Flórez, M. R., Resano, M., *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32-39

⁵⁷ Huang, M. D. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 566-570

Inicialmente, foram empregadas as mesmas condições utilizadas no trabalho anteriormente citado (temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 2000°C, respectivamente, 10 ng de I e 100 µg de Ba). Entretanto, com relação a massa de iodo, essa precisou ser aumentada para 100 ng de I, uma vez que com a utilização de 10 ng de I o sinal de absorvância integrada em área foi menor que 0,1 e o RSD foi superior a 20%. Nesse sentido, os testes subsequentes foram feitos empregando 100 ng de I, pela adição de 10 µL da solução contendo 10 mg L⁻¹ de I e a massa de Ba foi mantida em 100 µg, pela adição de 10 µL da solução contendo 10 g L⁻¹ de Ba. Nesse experimento, a absorvância integrada foi de 0,3019 ± 0,015 s. Nesse sentido, os ensaios subsequentes foram feitos empregando temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 2100 °C, respectivamente, 100 ng de I e 100 µg de Ba.

4.5.2. Influência da adição de Ba sobre a absorção molecular de BaI

Posteriormente, foram feitos ensaios para avaliar se a massa de Ba adicionada foi suficiente para promover a formação da molécula de BaI₂ durante a etapa de pirólise e, também, para deslocar o equilíbrio químico para a formação de BaI, em fase vapor. Nesses experimentos a massa de I foi fixada em 100 ng (pela adição de 10 µL da solução contendo 10 mg L⁻¹) e a massa de Ba foi variada de 0 a 400 µg. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 21.

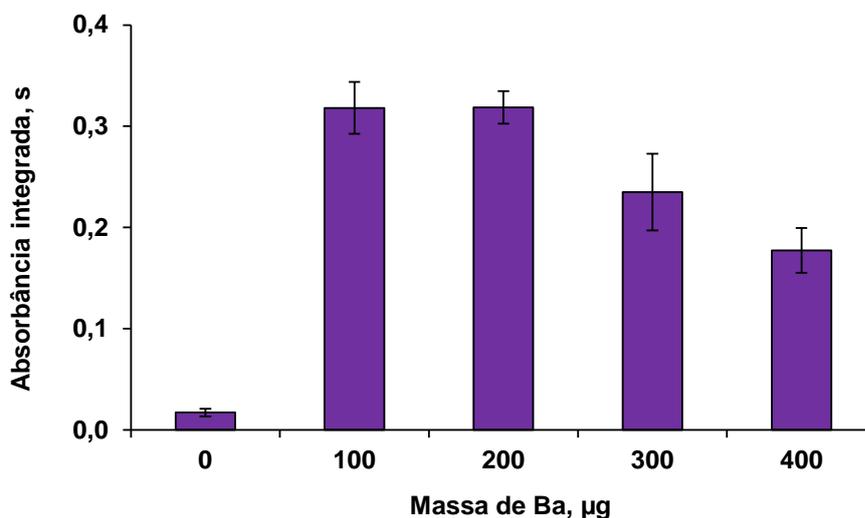


Figura 21. Influência da massa de Ba (0 a 400 µg) sobre a intensidade do sinal de absorção molecular do BaI (sinal integrado em área). Ensaios usando solução contendo 100 ng de I (10 µL de solução contendo 10 mg L⁻¹ de I) e temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 2000 °C, respectivamente. Cada coluna representa a média de cinco valores e as respectivas barras de erros são os valores correspondentes aos desvios padrão.

Inicialmente, foram feitos testes sem a utilização de Ba, ou seja, apenas pela adição de 100 ng de I e, conforme pode ser observado na Figura 21, o sinal de absorbância foi muito próximo de zero, similar ao valor obtido para o branco analítico. Posteriormente, a massa de bário foi aumentada para 100 µg e o sinal relativo à absorção molecular do BaI, em 538,308 nm, aumentou significativamente. Com o aumento da massa de Ba adicionada (200 µg), não foram observadas diferenças entre os resultados prévios obtidos com o uso de 100 µg de Ba. Entretanto, com o emprego de 300 ou 400 µg de Ba, o sinal referente a absorção molecular do BaI diminuiu. Resultados semelhantes foram obtidos nos demais ensaios feitos nesse trabalho para avaliar a massa dos modificadores químicos adequada. O excesso de modificador químico leva a obtenção de sinais analíticos mais alargados, os quais, geralmente, não retornam à linha base no tempo de integração selecionado. Além disso, com o aumento da concentração de Ba, possivelmente, a decomposição da molécula de BaI₂ para formação de BaI pode ser dificultada, o que contribui para a redução da intensidade do sinal analítico. Nesse contexto, os testes subsequentes foram feitos com o adição de 100 µg de Ba.

4.5.3. Curvas de pirólise e vaporização

Para avaliar o programa de aquecimento mais adequado para a formação da molécula de BaI na determinação de I por HR-CS-MAS, foram obtidas curvas de pirólise e vaporização. Nesse estudo, foi utilizado 1 mg de amostra de leite em pó integral contendo 1 µg g⁻¹ de I e 100 µg de Ba (pela adição de 10 µL da solução contendo 10 g L⁻¹ de Ba). Não foi obtido sinal de absorbância referente a molécula de BaI com o uso da amostra sólida (resultados não apresentados). As curvas de pirólise e vaporização obtidas para as soluções de referência aquosas de iodo estão mostradas na Figura 22.

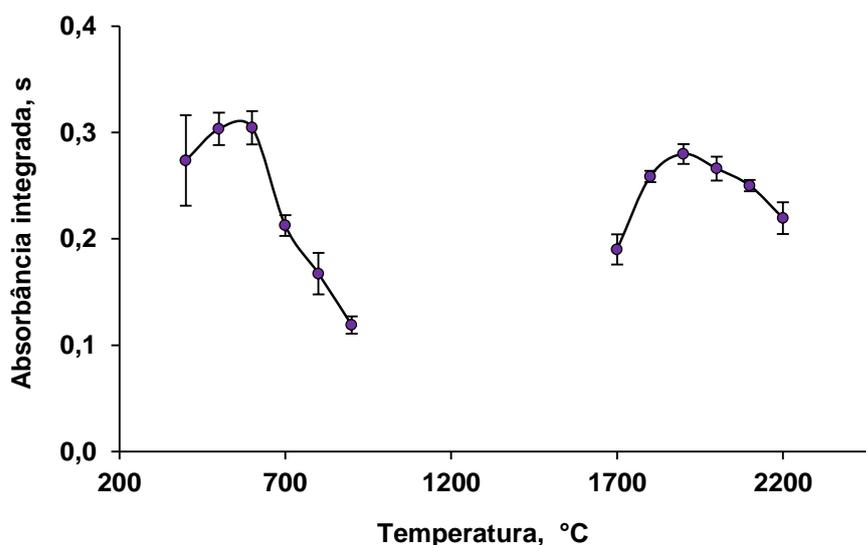


Figura 22. Curvas de pirólise e vaporização para I em solução de referência aquosa contendo 100 ng de I (pela adição de 10 μL de solução contendo 10 mg L^{-1} de I) e 100 μg de Ba (pela adição de 10 μL da solução contendo 10 g L^{-1} de Ba). Temperatura de pirólise durante a curva de vaporização foi de 600 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura de vaporização durante a curva de pirólise foi de 2000 $^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média de 5 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 22, as temperaturas mais adequadas para a determinação de I foram as de 600 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados em um estudo desenvolvido para determinação de iodo em amostras de fármacos (600 e 2000 $^{\circ}\text{C}$, temperaturas de pirólise e vaporização, respectivamente).⁵⁸

4.5.4. Influência de F e Cl na formação da molécula BaI

Da mesma forma como observado para a determinação de Br, alguns trabalhos reportados na literatura apontam que a determinação de I por MAS pode ser prejudicada pela ocorrência de interferências espectrais devido à presença de F e Cl na matriz. Os íons interferentes competem com o I na formação da molécula com o Ba. Como ligação a química dos elementos mais eletronegativos (F ou Cl) com o Ba tem maior energia do que a ligação com o I, o modificador tende a formar BaF_2 e BaCl_2 durante a pirólise e, possivelmente, BaCl e BaF , em fase vapor. Possivelmente, também ocorre a formação de BaI em fase vapor, porém em menor proporção. Além disso, a presença do excesso de Ba é importante para a determinação de I (como BaI) por HR-CS-MAS, favorecendo a formação de BaI em fase vapor.

⁵⁸ Huang, M. D. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 697-701

Nesse contexto, a massa de Ba foi aumentada para 200 μg para avaliar se esse excesso favoreceria o aumento do sinal analítico. Com o uso de massas ainda maiores de Ba (300 a 500 μg) o sinal obtido não retornou à linha base e um perfil bastante alargado foi observado. Então, optou-se por estudar se os íons F e/ou Cl presentes na amostra de leite em pó estariam, realmente, interferindo na determinação de I por HR-CS-MAS. Nesse sentido, primeiramente, foi introduzido no forno de grafite 100 ng de I e 100 μg de Ba (temperaturas de pirólise e vaporização utilizadas foram de 600 e 2000 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente). O sinal de absorvância obtido foi de $0,221 \pm 0,016$ s. Posteriormente, foi adicionado 1 mg de leite em pó, 100 ng de I e 100 μg de Ba e o mesmo programa de aquecimento foi utilizado. O sinal de absorvância foi de $0,004 \pm 0,001$ s. Esse resultado indicou que havia interferência de algum dos constituintes da amostra, possivelmente, F ou Cl.

A interferência do flúor não foi avaliada, pois a concentração desse elemento está abaixo do LOD de todas as técnicas analíticas utilizadas (HR-CS-MAS, IC e ISE). Por outro lado, a concentração de cloro na amostra de leite em pó é de, aproximadamente, 1%. De maneira geral, amostras biológicas, apresentam a concentração de cloro variando de 0,1 a 2%. Nesse sentido, foram adicionadas massas de Cl de 0 a 100 ng para avaliar a interferência sobre o sinal analítico de 100 ng de I usando 100 μg de Ba (temperaturas de pirólise e vaporização utilizadas foram de 600 e 2000 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente). Na Figura 23 estão mostrados os resultados obtidos.

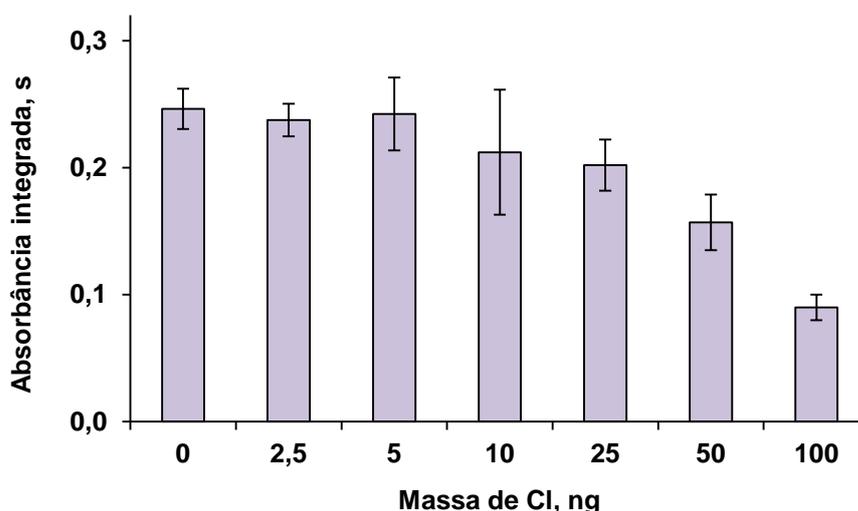


Figura 23. Influência de cloro sobre o sinal de absorção molecular do BaI em solução aquosa. Condições utilizadas: solução contendo 100 ng de I (10 μL da solução contendo 10 mg L^{-1} de I), 100 μg de Ba (10 μL da solução contendo 10 g L^{-1}) e 10 μL das soluções contendo de 0,25 a 10 mg L^{-1} de Cl. Cada barra representa a média de 3 determinações e as barras verticais representam o desvio padrão.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 23 ficou evidente que, dependendo da concentração de cloro presente na amostra, esse elemento pode interferir na absorção molecular do BaI. Enquanto massas de cloro até 10 ng não evidenciaram redução do sinal analítico a adição de 25 ng de Cl contribuiu para a diminuição do sinal analítico referente a molécula de BaI, indicando a possível competição do Cl pelo Ba. Massas de 50 ou 100 ng de Cl levaram à obtenção de sinais da molécula de BaI ainda menores (cerca de 65% a menos do valor de absorbância obtido sem a adição de cloro).

Adicionalmente, foram feitos os mesmos experimentos descritos no resultados obtidos para Br (4.3.3. *Estudo para eliminação da interferência de Cl na determinação de Br por HR-CS-MAS*). Entretanto, assim como para Br, não foram obtidos resultados satisfatórios. Nesse sentido, um estudo mais aprofundado precisa ser feito para eliminar a interferência de Cl na determinação de I por HR-CS-MAS em amostras biológicas.

4.5.5. Curva de calibração para determinação de iodo por HR-CS-MAS

Inicialmente, foi feita a calibração do equipamento com o uso de soluções de referência aquosas, utilizando as condições previamente estabelecidas nesse trabalho: 10 μL da solução de referência aquosa contendo I e 100 μg de Ba (10 μL da solução contendo 10 g L^{-1}). Foram empregadas temperaturas de pirólise vaporização de 600 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A curva de calibração obtida pode ser vista na Figura 24.

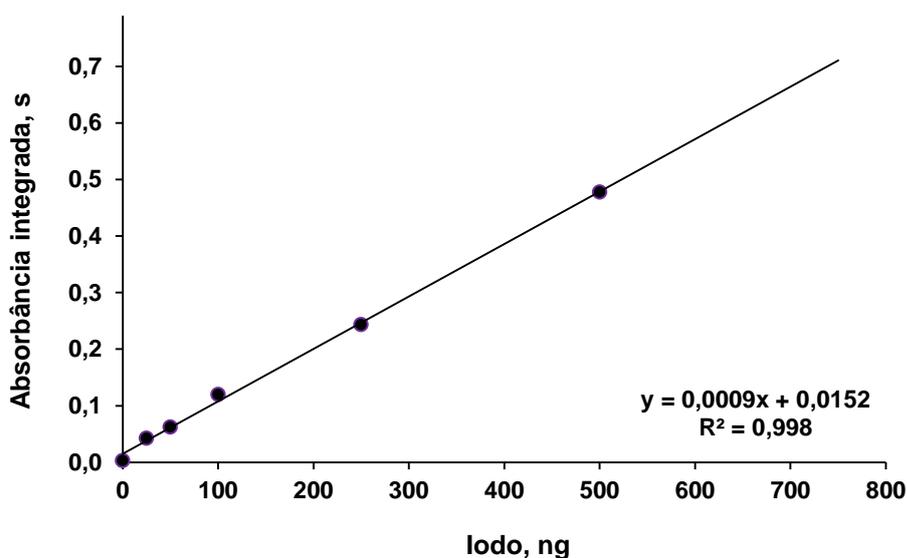


Figura 24. Curva de calibração para I usando em soluções de referência aquosa. Condições utilizadas: 10 μL da solução de referência aquosa contendo I e 100 μg de Ba (10 μL da solução contendo 10 g L^{-1}). Cada valor representa a média de 3 determinações. Temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 1900 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Embora tenha sido feita a calibração com soluções de referência, a determinação de iodo não pode ser feita em amostras biológicas, possivelmente, devido a interferência do cloro naturalmente presente na amostra. Assim, a curva de calibração foi inserida nesse trabalho, apenas, para mostrar a potencialidade de utilização desse método para determinação de iodo. Estudos subsequentes precisam ser feitos para que o método possa ser empregado para a determinação de iodo usando a absorção molecular da Bal em 538,308 nm em amostras contendo elevada concentração de cloro.

4.5.6. Sinais obtidos pela absorção molecular de Bal

Os sinais referentes à absorção da molécula Bal em 538,308 nm são mostrados na Figura 25. Na Figura 25a está mostrado o perfil do sinal obtido pelo uso da solução de referência aquosa contendo 100 ng de I ($10 \mu\text{L}$ da solução de I 10 mg L^{-1}). Na Figura 25b está mostrado o perfil do sinal obtido pela absorção molecular do Bal a partir do 10 ng de I liberado da amostra de leite em pó (usando 1 mg da amostra contendo $10,0 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ de I).

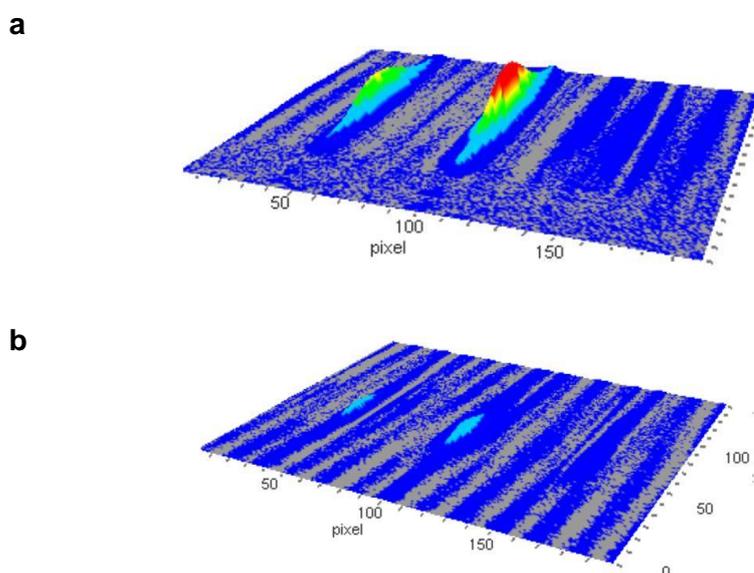


Figura 25. Sinal de absorção molecular obtidos usando: a) 100 ng de Br a partir de uma solução de referência em meio aquoso ($10 \mu\text{L}$ da solução contendo 10 mg L^{-1} de Cl); e, b) 1 ng de Br a partir da amostra de leite em pó (1 mg da amostra contendo $1,08 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ de I). Condições empregadas: $100 \mu\text{g}$ de Ba. Temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e $1900 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Conforme pode ser observado, com a adição da amostra contendo 10 ng de I não foi obtido sinal referente a absorção molecular em 538,308 nm, enquanto que, para a solução de referência contendo 100 ng de Br, foi obtido um sinal de absorção molecular, o qual foi integrado em área e retornou à linha de base em 7 s. Possivelmente, não foi obtido sinal de absorção molecular quando a amostra foi empregada, devido a supressão do sinal de BaI devido a elevada concentração e cloro presente na amostra.

Na Tabela 17 estão mostradas, de forma resumida, as características do método proposto para determinação de I por HR-CS-MAS. Para a obtenção dos resultados mostrados a seguir foram utilizadas as condições previamente estudadas neste trabalho. Temperaturas de pirólise e vaporização de 600 e 1900 °C, respectivamente; 100 ng de I e 100 µg de Ba. As informações mostradas na Tabela 17 foram calculadas a partir do uso apenas de soluções de referência aquosas.

Tabela 17. Parâmetros de mérito do método para determinação de I por HR-CS-MAS.

Parâmetros	
Frequência de análise, h ⁻¹	15
Massa característica, ng	3,66
Faixa linear, ng de I	25 a 500
Limite de detecção, µg L ⁻¹	3,01
Limite de quantificação, µg L ⁻¹	10,1
Desvio padrão relativo (n = 5), %	< 5

Por fim, o método proposto foi comparado com outros estudos reportados na literatura para determinação de iodo usando a HR-CS-MAS (Tabela 18). Os parâmetros comparados foram LOD, m_0 e faixa linear. É importante salientar que, até o presente momento há poucos trabalhos disponíveis na literatura usando a HR-CS-MAS para a determinação de iodo.

Tabela 18. Comparação dos principais parâmetros analíticos entre diferentes os métodos para determinação de I por HR-CS-MAS.

Referência	LOD	LOQ	m_0, ng	Faixa linear, ng
método proposto	3 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	1,5	0,25 a 5,00
Ref. 58	0,6 ng	ND	1,0	até 250
NI - valor não informado				

⁵⁸ Huang, M. D. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 697-701

Conforme pode ser observado na Tabela 18, os valores de limite de detecção e quantificação, obtidos nesse estudo, foram informados em $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses valores não foram convertidos para massa (ng de I), pois não foi possível fazer a determinação de iodo nas amostras sólidas, devido a interferências e cloro durante a etapa de determinação.

Por outro lado, foram comparados os valores de LOD e LOQ obtidos no presente trabalho, com os valores obtidos por outras técnicas analíticas, as quais requerem amostragem de líquidos, como é o caso da cromatografia de íons. Os LOD e LOQ obtidos pela técnica cromatográfica estão na faixa de 4 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Desse modo, os LOD e LOQ obtidos no presente trabalho foram consideravelmente mais baixos que aqueles obtidos por IC. Neste sentido, o método proposto, embora que não tenha sido aplicado para determinação de iodo em amostras sólidas, pode ser considerado um método adequado para determinação de iodo em soluções obtidas após a etapa de decomposição.

Na Figura 26 estão apresentadas, de forma resumida, as condições escolhidas para a determinação de halogênios em amostras biológicas por HR-CS-MAS.

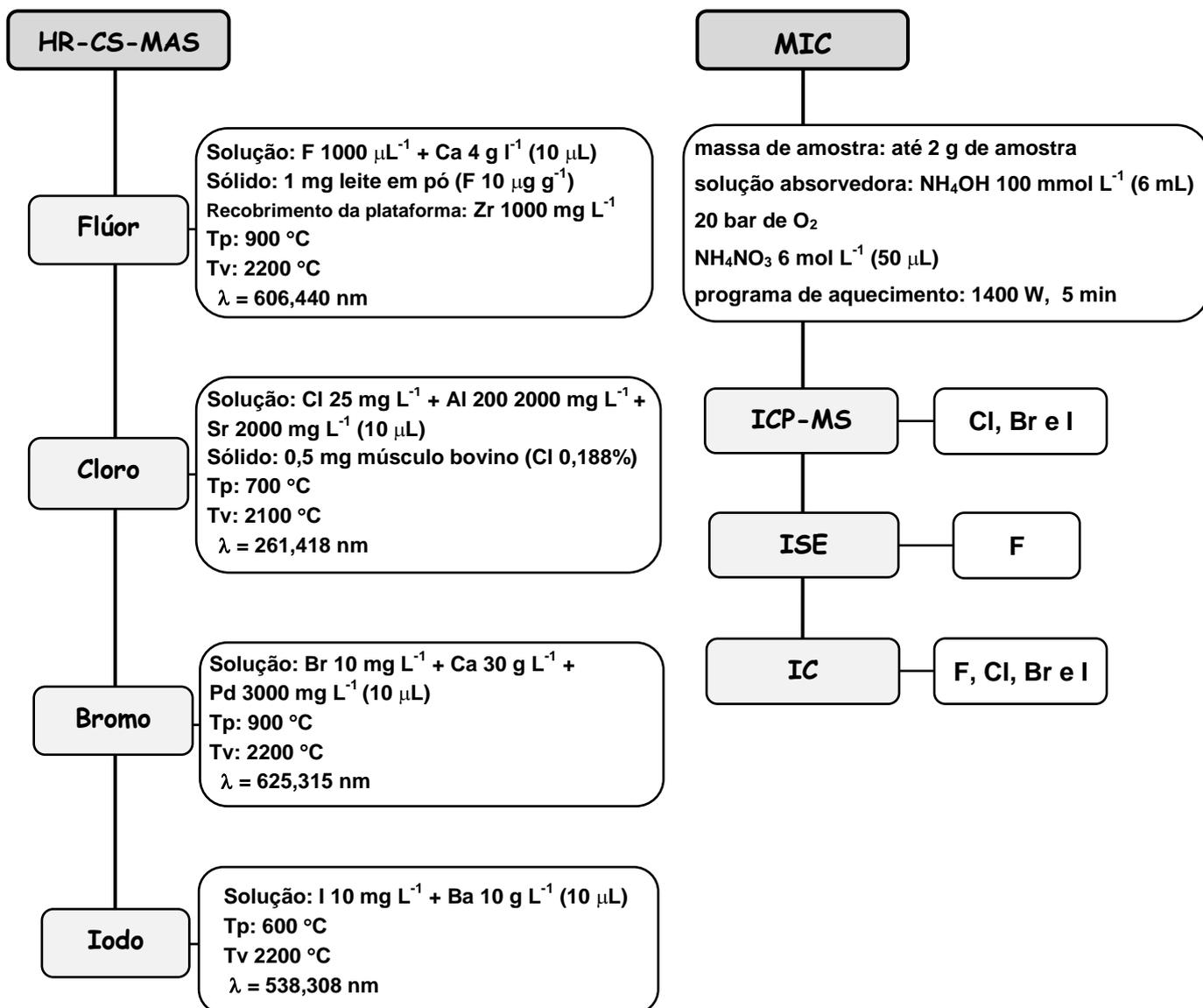


Figura 26. Condições escolhidas para a determinação de F, Cl, Br e I por HR-CS-MAS. (Tp e Tv: temperaturas de pirólise e vaporização, respectivamente).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da MAS com vaporização em forno de grafite mostrou-se adequada para a determinação de halogênios em amostras biológicas. Nesse trabalho foi possível utilizar um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite para fazer a amostragem direta de sólidos.

O uso da amostragem direta de sólidos contribuiu para tornar a técnica ainda mais simples e rápida, principalmente, por dispensar a aplicação de um procedimento de digestão de amostras, previamente à etapa de determinação

Para F, Cl, Br e I foram obtidas as curvas de pirólise e vaporização usando soluções de referência aquosas e amostra sólida. Para F, o comportamento térmico foi muito semelhante com o uso de ambas. Por isso a curva de calibração foi feita com o uso de padrões aquosos. As temperaturas de pirólise e vaporização foram de 700 e 2200 °C, respectivamente. A m_0 , LOD e LOQ foram 50,6 pg, 0,72 e 2,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A exatidão foi avaliada pela comparação com os resultados empregando a ICP-MS e ISE após a decomposição das amostras por MIC.

A calibração do equipamento para Cl precisou ser feita pelo uso de um CRM, uma vez que não foi obtida uma condição de mesmo comportamento térmico entre o analito presente na amostra e nos padrões aquosos. As temperaturas de pirólise e vaporização 700 e 2100 °C, respectivamente. A m_0 , LOD e LOQ foram 6,15 ng, 34 e 112 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A exatidão foi avaliada pela comparação com materiais de referência certificados de fígado bovino (NIST 1577), músculo bovino (NIST 8414) e farelo de milho (NIST 8433).

As curvas de pirólise e vaporização para Br e I foram obtidas apenas com o uso de solução de referência, pois foi observada interferência, possivelmente do cloro presente na amostra sólida. As temperaturas de pirólise e vaporização selecionadas para Br e I foram 900 e 1900 °C e 600 e 1900 °C, respectivamente. Nesse contexto, é importante salientar a necessidade do desenvolvimento estudos adicionais para minimizar as interferências promovidas pela elevada concentração de Cl, viabilizando a determinação de Br e I por HR-CS-MAS com amostragem direta de sólidos.

Por fim, é importante salientar que o método proposto foi adequado para a determinação de halogênios em amostras biológicas, mostrando-se promissor para ser utilizado para a determinação de halogênios em outros tipos de materiais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Prystupa, J. Fluorine - A current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides, *Toxicol. Mech. Methods* 21 (2011) 103-170
- 2 Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edn. (2004)
- 3 Lag, M., Soderlund, E. J., Omichinski, J. G., Brunborg, G., Holme, J. A., Dahl, J. E., Nelson, S. D., Dybing, E., Effect of bromine and chlorine positioning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1991) 528-534
- 4 Zimmermann, M. B., Jooste, P. L., Pandav, C. S., Iodine-deficiency disorders. *Lancet* 372 (2008) 1251-1262
- 5 Flores, E. M. M., Krug, F. J., Barin, J. S., Arruda, M. A. Z., Decomposições de materiais orgânicos por via úmida in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 252-255
- 6 Welz, B., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., High Resolution Continuum Source AAS, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005
- 7 Arruda, M. A. Z., Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, New York, 2006
- 8 Warf, J. C., Cline, W. D. Tevebaugh, R. D., Pyrohydrolysis in the determination of fluoride and other halides, *Anal. Chem.* 26 (1954) 342-346
- 9 Sulcek, Z., Povindra, P., Methods of decomposition in inorganic analysis, CRC Press, Boca Raton, EUA, 1989, pp 325-350
- 10 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
- 11 Costa, A. C. S., Krug, F. J. Oliveira, E., Nobrega, J. A. N., Matias, T. B. Decomposições e solubilização de sólidos inorgânicos in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 158-167
- 12 Flores, E. M. M., Krug, F. J., Barin, J. S., Arruda, M. A. Z., Decomposições de materiais orgânicos por via úmida in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 252-255
- 13 Nogueira, A. R. A., Moraes, D. P., Flores, E. M. M., Krug, F. J., Knapp, G., Nóbrega, J. A., Barin, J. S., Mesko, M. F., Decomposições assistidas por radiação micro-ondas in: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, 1ª ed., Piracicaba, 2010, pp. 276-289
- 14 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, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 245-252
- 15 Souza, G. B., Carrilho, E. N. V. M., Oliveira, C. V., Nogueira, A. R. A., Nobrega, J. A., Oxygen bomb combustion of biological samples for inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2195-2201
- 16 Fecher, P.A., Ruhnke, G., Cross contamination of lead and cadmium during dry ashing of food samples, *Anal. Bional. Chem.*, 373 (2002)787-791

- 17 Koh, S., Aoki, T., Katayama, Y., Takada, J., Losses of elements in plant samples under the the dry ashing process, *J. Radional. Nucl. Chem.* 239 (1999) 591-594
- 18 Nadkarni, R. A., Multitechnique multielemental analysis of coal and fly ash, *Anal. Chem.* 52 (1980) 929-935
- 19 Flores, E. M. M., Barin, J. S., Paniz, J. N. G., Medeiros, J. A., Knapp, G., Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3525-3529
- 20 Barin, J. S., Tischer, B., Picoloto, R. S., Antes, F. G., Silva, F. E. B., Paula, F. R. Paula, Flores, E. M. M., Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, 29, 352-358
- 21 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, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1865-1870
- 22 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, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1125-1131
- 23 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 elastomers digestion for further halogens determination, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 563-570
- 24 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, *Anal. Chem.* 85 (2013) 374-380
- 25 Naozuka, J., Veiga, M. A. M. S., Oliveira, P. V., Oliveira, E., Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 917-921
- 26 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, *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012) 1889-1894
- 27 Hernandez, H. A., Nitrogen, sulphur and chlorine analysis in petroleum, Application note, AnalytikJena, Alemanha, 2005, em www.analytik-jena.de, acessado em 05/2014
- 28 Pereira, J. S. F., Diehl, L. O., Duarte, F. A., Santos, M. F. P., Guimarães, R. C. L., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 249-252
- 29 Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: pesticide, drug and toxic substance residues, *J. Chromatogr. A*, 727 (1996) 153-184
- 30 Meyer, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons: Saint Gallen 1998
- 31 Wang, J. Analytical Electrochemistry, 2a ed. John Wiley & Sons, New York, 2000
- 32 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, *Anal. Methods* 4 (2012) 1565-1572
- 33 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, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 117-123
- 34 Melicherik, J., Szijarto, L., Hill, A. R., Comparison of ion-specific electrode and high performance liquid chromatography methods for the determination of iodide in milk, *J. Dairy Sci.* 89 (2006) 934-937

- 35 Grindlay, G., Mora, J., 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, *Spectrochim. Acta Part B* 86 (2013) 42-49
- 36 Tanner, S. D., Baranov, V. I., Bandura, D. R., Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1361-1452
- 37 Nölte, J. ICP Emission spectrometry - a practical guide, Wiley - VCH: New York, 2003
- 38 Kruger, P., Principles of Activation Analysis. Wiley Intescience, New Work, 1971 W. D. Ehmann, D. E. Vance radiochemistry and nuclear methods of analysis. John Wiley and Sons, New York, 1991
- 39 Pavelka, S., Vobecky, M., Babicky, A., Halogen speciation in the rat thyroid: simultaneous determination of bromine and iodine by short-term INAA, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 278 (2008) 575-579
- 40 Isaac-Olive, K., Chatt, A., Studies of total, organic and inorganic iodine in Canadian bovine milk samples with varying milk fat content using ion-exchange chromatography and neutron activation analysis, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 29 (2012) 479-486
- 41 Miah, M. Y., Wang, M. K., Chino, M., Energy dispersive X-ray fluorescence for rapid potassium, calcium, and chloride diagnosis in barley, *J. Plant Nutrition* 1999 (22) 229-235
- 42 Butcher, D. J., Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 1-15
- 43 Fender, M. A., Butcher, D. J., Comparison of deuterium arc and Smith-Hieftje background correction for graphite furnace molecular absorption spectrometry of fluoride and chloride, *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 167-176
- 44 Butcher, D. J., Determination of fluorine, chlorine and bromine by molecular absorption spectrometry, *Microchem. J.* 48 (1993) 303-317
- 45 Zhi-He, Y., Hui-Ming, H., Determination of iodine by molecular absorption spectrometry of thallium iodide in the graphite furnace, *Spectrochim. Acta 44B* (1989) 617-623
- 46 Gleisner, H., Welz, B., Einax, J. W., Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer, *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 864-869
- 47 Gleisner, H., Einax, J. W., Morés, S., Welz, B., Carasek, E., A fast and accurate method for the determination of total and soluble fluorine in toothpaste using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and its comparison with established techniques, *J. Pharmaceut. Biom.* 54 (2011) 1040-1046
- 48 Krüger, M., Huang, Mao-Dong., Becker-Roß, H., Florek, S. M., Ott, I., Gust, R., Quantification of the fluorine containing drug 5-fluorouracil in cancer cells by GaF molecular absorption via high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 69 (2012) 50-55
- 49 Ozbek, N., Akman, S., Determination of fluorine in milk samples via calcium-monofluoride by electrothermal molecular absorption spectrometry, *Food Chem.* 138 (2013) 650-654
- 50 Morés, S., Monteiro, G. C., Santos, S. F., Carasek, E., Welz, B., Determination of fluorine in tea using high-resolution molecular absorption spectrometry with electrothermal vaporization of the calcium mono-fluoride CaF, *Talanta* 85 (2011) 2681-2685
- 51 Ozbek, N., Akman, S., Method Development for the Determination of Fluorine in Water Samples via Molecular Absorption of CaF Using A High-Resolution Continuum Source Electrothermal Atomic Absorption Spectrophotometer, *E3S Web of Conferences* 1, 05006 (2013)
- 52 Ozbek, N., Akman, S., Method development for the determination of fluorine in water samples via the molecular absorption of strontium monofluoride formed in an electrothermal atomizer,

- Spectrochim. Acta Part B* 69 (2012) 32-37
- 53 Heitmann, U., Becker-Ross, H., Florek, S., Huang, M. D., Okruss, M., Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1314-1320
- 54 Fechetia, M., Tognon, A. L., Veiga, M. A. M. S., Determination of chlorine in food samples via the AlCl molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, *Spectrochim. Acta Part B* 71-72 (2012) 98-101
- 55 Limburg, T., Einax, J. W., Determination of bromine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, *Microchem. J.* 107 (2013) 31-36
- 56 Flórez, M. R., Resano, M., Direct determination of bromine in plastic materials by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 88 (2013) 32-39
- 57 Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M., High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine, *Spectrochim. Acta Part B* 63 (2008) 566-570
- 58 Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Okruss, M., Welz, B., Morés, S., Determination of iodine via the spectrum of barium mono-iodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 697-701
- 59 Dittrich, K., Hanisch, B., Stark, H. J., Molecule formation in electrothermal atomizers – interferences and analytical possibilities by absorption, emission and fluorescence processes, *Fresenius J. Anal. Chem.* 324 (1986) 497-506
- 60 Tsunoda, K., Haraguchi, H., Fuwa, K., Halide interference in an electrothermal graphite-furnace atomic-absorption spectrometry with group-IIIB elements as studied by atomic and molecular absorption signal profiles, *Spectrochim. Acta Part B* 40 (1985) 10-12
- 61 Dittrich, K., Vorberg, B., Funk, J., Beyer, V., Determination of some nonmetals by using diatomic molecular absorbance in a hot graphite furnace, *Spectrochim. Acta*, 39B (1984) 349-363
- 62 Yuzefovsky, A. I., Michel, R. G., Role of barium chemical modifier in the determination of fluoride by laser-excited molecular fluorescence of magnesium fluoride in a graphite tube furnace, *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 1203-1207
- 63 Styris, D. L., Atomization mechanism for barium in furnace atomic-absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1070-1076
- 64 Lenardão, E. J., Freitag, R. A., Dabdoub, M. J., Batista, A. C. F., Silveira, C. C., “Green Chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de Ensino e pesquisa, *Quim. Nova* 26 (2003) 123-129
- 65 Nomura, C. S., Silva, C. S., Oliveira, P. V., Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão, *Quim. Nova* 31 (2008) 104-113
- 66 Kurfürst, U., Solid Sample Analysis, 1 st Ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New Work, 1998, pp 26-31
- 67 Venkateswarlu, P., Lacroix, M.A., Kirsch, G.W., Determination of organic (covalent) fluorine in blood-serum by furnace molecular absorption spectrometry, *Microchem. J.* 48 (1993) 78-85
- 68 Takatsu, A., Chiba, K., Ozaki, M., Fuwa, K., Haraguchi, H., Direct determination of trace fluorine in milk by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry utilizing an electrothermal graphite furnace, *Spectrochim. Acta* 39B (1984) 365-370
- 69 Flores, E. L. M., Barin, J. S., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., A new approach for fluorine determination by solid sampling graphite furnace molecular absorption spectrometry,

- Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 918-923
- 70 Dittrich, K., Molecular absorption spectrometry (mas) by electrothermal evaporation in a graphite furnace-XI, *Talanta* 32 (1985) 1019-1022
- 71 Gunduz, S., Akman, S. Determination of bromine by high resolution molecular absorption of strontium mono bromide generated in a graphite furnace, *Microchem. J.* 116 (2014) 1-6
- 72 W. Horwit, The Official Methods of Analysis of AOAC International (OMA), 18th Edition, AOAC International, Gaithersburg, USA, 2005
- 73 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, *Microchem. J.* 109 (2013) 29-35
- 74 Flores, E. L. M., Determinação direta de halogênios em alumina, carvão e coque de petróleo por GF MAS com amostragem direta de sólidos, Tese de Doutorado, UFSM, 2010
- 75 Belarra, M. A., Crespo, C., Garbayo, M. P. M., Castillo, J. R., Direct determination of metals in solid samples by graphite-furnace atomic absorption spectrometry: Does sample mass influence the analytical results? *Spectrochim. Acta B* 52 (1997) 1855-1860
- 76 Mello, P. A., Rodrigues, L. F., Nunes, M. A. G., Mattos, J. C. P., Müller, E. I., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Determination of metal impurities in carbon nanotubes by direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.*, 22 (2011) 1040-1049
- 77 Huang, M.D., Krivan, V., A direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry method for the determination of silicon in biological materials, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 297-303
- 78 Mattos, J. C. P., Rodrigues, L. F., Flores, E. M. M., Krivan, V., Determination of trace impurities in aluminum nitride by direct solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 637-643
- 79 Parvinen, P., Lajunen, L. H. J., Determination of chloride in drinking and ground water by AlCl molecular absorption spectrometry using graphite furnace atomic absorption spectrometer, *Talanta* 50 (1999) 67-71
- 80 Dittrich, K., Molecular absorption spectrometry by electrothermal evaporation in the graphite furnace-X determination of chloride traces by AlCl MA in graphite cuvettes after liquid-liquid extraction, *Talanta* 31 (1984) 341-345
- 81 Tsunoda, Kin-ichi, Fujiwara, K., Fuwa, K., Determination of chlorine and bromine by molecular absorption of aluminum monohalides at high temperature, *Anal. Chem.* 50 (1978) 861-865
- 82 Butcher, D. J., Determination of fluorine, chlorine and bromine by molecular absorption spectrometry, *Microchem. J.* 48 (1993) 303-307