

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

Morgana Doneda

**COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA A ABSORÇÃO
SIMULTÂNEA DE METAIS E HALOGÊNIO E DETERMINAÇÃO
POR ICP-MS, ISE E F AAS**

Santa Maria, RS

2016

**COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA A ABSORÇÃO
SIMULTÂNEA DE METAIS E HALOGÊNIO E DETERMINAÇÃO POR
ICP-MS, ISE E F AAS**

por

Morgana Doneda

Dissertação 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
Mestre em Química

Santa Maria, RS, Brasil

2016

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA A ABSORÇÃO SIMULTÂNEA
DE METAIS E HALOGÊNIO E DETERMINAÇÃO POR ICP-MS, ISE E F AAS**

Elaborada por

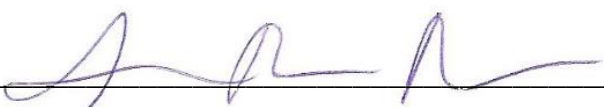
Morgana Doneda

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

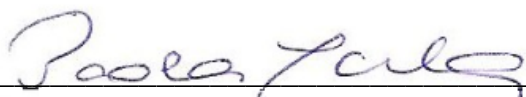
COMISSÃO EXAMINADORA:



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



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

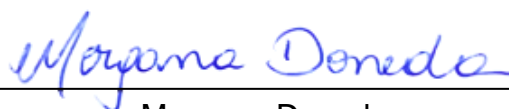


Profa. Dra. Paola de Azevedo Mello (UFSM-RS)

Santa Maria, 5 de março de 2016

Declaração

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



Morgana Doneda

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.*

John F. Kennedy

AGRADECIMENTOS

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

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo de dedicação profissional, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio, amizade e incentivo.

À Prof. Dra. **Rochele Sogari Picoloto**, por participar como membro no exame de qualificação, pelas valiosas contribuições e colaboração direta neste trabalho, pela amizade, apoio e convívio.

Ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte** e a Prof. Dra. **Paola de Azevedo Mello**, por participar como membro no exame de qualificação e da banca examinadora desta dissertação, respectivamente, pelas valiosas contribuições, amizade e convívio.

Ao Prof. Dr. **Sergio Roberto Mortari** pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Profs. Drs, **Cezar Augusto Bizzi**, **Edson Irineu Muller**, **José Neri Gottfried Paniz**, **Juliano Smanioto Barin**, **Rodrigo Cordeiro Bolzan** e **Valderi Luiz Dressler** pelas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como a amizade e convívio.

Aos colegas e funcionários do **LAQIA/CEPETRO**, pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial, à **Alice P. Holkem**, **Gabriel T. Druzian**, **Letícia S. F. Pereira**, **Mariele S. Nascimento**, **Matheus A. G. Nunes**, **Michele S. P. Enders** e **Sindy R. Krzyzaniak** e, também, à **Alessandra S. Henn** e à **Caroline M. Senger** pela disposição e colaboração direta durante toda a execução deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, **Ademir** e **Valéria**, pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

Em especial, agradeço aos meus pais, **Nilo e Marta** pelo incentivo, suporte, compreensão e apoio incondicional nas minhas decisões. Agradeço, também, ao meu irmão **Alexandre** que me inspirou e apoiou durante todos estes anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>ix</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xi</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xiii</i>
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Importância da determinação de metais e halogênios em materiais biológicos.....	4
2.2 Métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de halogênios	5
2.2.1 Decomposição por via úmida	8
2.2.2 Métodos de combustão	14
2.2.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas.....	16
2.3 Técnicas analíticas empregadas na determinação de metais e halogênios	23
2.3.1 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	24
2.3.2 Potenciometria	26
2.3.3 Cromatografia de íons.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Instrumentação	29
3.2 Reagentes	31
3.3 Amostras e materiais de referência	33
3.4 Procedimentos de descontaminação.....	34
3.5 Procedimentos de decomposição.....	34
3.5.1 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas	34

3.5.2	Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas.....	35
3.5.2.1	Otimização do método de MIC para absorção de metais e não metais em uma solução absorvedora única.....	36
3.6	Determinação de Cl, Br, I e metais por ICP-MS	37
3.7	Determinação de F por ISE	37
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	40
4.1	Procedimentos de descontaminação.....	41
4.2	Determinação da concentração de metais e halogênios em leite em pó integral para ensaios de otimização	42
4.2.1	Combustão iniciada por micro-ondas para a posterior determinação de F, Cl, Br e I	43
4.2.2	Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas para a posterior determinação de metais	47
4.3	Adição de F e metais em leite em pó integral.....	49
4.4	Determinação de F por ISE	50
4.5	Determinação de Cl, Br e I por ICP-MS.....	52
4.6	Combustão iniciada por micro-ondas para a posterior determinação de metais e halogênios usando solução absorvedora única	57
4.6.1	Avaliação da massa de amostra	57
4.6.2	Avaliação da solução absorvedora	58
4.6.3	Avaliação do tempo de refluxo	64
4.7	Avaliação da estabilidade de F, Cl, Br e I em meio ácido.....	67
4.8	avaliação da exatidão e aplicação para materiais biológicos	69
4.9	Limites de Quantificação para metais e halogênios	72
5	CONCLUSÕES.....	75
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Resumo dos métodos de preparo de amostras empregados e dos parâmetros avaliados neste trabalho.	39
Figura 2.	Cromatograma obtido após a decomposição por MIC (500 mg de material de referência NIST 8435, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) da amostra de leite em pó integral, onde 1: Cl^- , 2: Br^- , 3: NO_3^- ; 4: PO_4^{3-} e 5: SO_4^{2-}	45
Figura 3.	Cromatogramas obtido após a decomposição por MIC (300 mg de amostra, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) do RM de leite em pó integral NIST 8435 em que A: Replicata 1 e B: Replicata 2. Identificação dos sinais cromatográficos: 1: Cl^- , 2: Br^- , 3: NO_3^- , 4: PO_4^{3-} e 5: SO_4^{2-}	46
Figura 4.	Curvas de calibração para F por ISE em solução ácida equivalente às soluções absorvedoras de \blacklozenge A: H_2O , \bullet B: HNO_3 1 mol L^{-1} , \blacktriangle C: HNO_3 5 mol L^{-1} e \blacksquare D: HNO_3 10 mol L^{-1}	51
Figura 5.	Curvas de calibração para I por ICP-MS em solução de \blacklozenge A: NH_4OH 10 mmol L^{-1} , \bullet B: HNO_3 0,7 mol L^{-1} e \blacktriangle C: HNO_3 0,7 mol L^{-1} após lavagem com NH_4OH 10 mmol L^{-1}	53
Figura 6.	Curvas de calibração para Cl e Br por ICP-MS em solução de \blacklozenge A: NH_4OH 10 mmol L^{-1} , \bullet B: HNO_3 0,7 mol L^{-1} e \blacktriangle C: HNO_3 0,7 mol L^{-1} após lavagem com NH_4OH 10 mmol L^{-1}	55
Figura 7.	Pressão máxima atingida no sistema em função da massa de leite em pó integral utilizada na decomposição por MIC.	57
Figura 8.	Concordância em relação ao valor de referência para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de solução absorvedora, 5 min de refluxo) usando diferentes soluções absorvedoras (média \pm desvio padrão, n=3).	59
Figura 9.	Concordância em relação ao valor de referência para Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS), após decomposição por MIC (300 mg de leite em pó integral, 6 mL de solução absorvedora, 5 min de refluxo) usando diferentes soluções absorvedoras (média \pm desvio padrão, n=3).	62
Figura 10.	Concordância em relação ao valor de referência para Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (300 mg de leite em pó integral, 6 mL de solução absorvedora, 5 min de refluxo) usando diferentes soluções absorvedoras (média \pm desvio padrão, n=3).	63
Figura 11.	Concordância em relação ao valor de referência para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora), usando \blacksquare 5 min, \blacksquare 10 min e \blacksquare 15 min de irradiação (média \pm desvio padrão, n=3).	65

- Figura 12.** Concordância em relação ao valor de referência para Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) após decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de HNO₃ 5 mol L⁻¹ como solução absorvedora), usando ■ 5 min, ■ 10 min e ■ 15 min de irradiação (média ± desvio padrão, n=3). 66
- Figura 13.** Concordância em relação ao valor de referência para Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (300 mg de leite em pó integral, 6 mL de HNO₃ 5 mol L⁻¹ como solução absorvedora), usando ■ 5 min, ■ 10 min e ■ 15 min de irradiação (média ± desvio padrão, n=3). 66
- Figura 14.** Resultados obtidos para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de HNO₃ 5 mol L⁻¹ como solução absorvedora, 5 min de refluxo) em 0, 7 e 15 dias de estocagem (média ± desvio padrão, n=3). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Aplicações envolvendo o uso de métodos de decomposição por via úmida para a posterior determinação de halogênios em materiais biológicos.....	10
Tabela 2.	Aplicações selecionadas utilizando combustão como método de preparo de amostras para a posterior determinação de metais e não metais em materiais biológicos.	18
Tabela 3.	Parâmetros operacionais para a determinação metais e halogênios por ICP-MS.	29
Tabela 4.	Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas.....	35
Tabela 5.	Resultados para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC (5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) de leite em pó integral e dos materiais de referência. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$	43
Tabela 6.	Resultados para Ag, Cd, Co, Pb, e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por F AAS após decomposição por MAWD (500 mg, 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1}) de leite em pó integral e dos materiais de referência. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$	48
Tabela 7.	Resultados para F por ISE após decomposição por MIC (500 mg de amostra, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) e metais por ICP-MS após decomposição por MAWD (500 mg de amostra, 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1}) de leite em pó integral enriquecida com F e metais. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$	50
Tabela 8.	Resultados para I por ICP-MS após decomposição por MIC (300 mg, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora) nos materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$	54
Tabela 9.	Resultados para Cl e Br por ICP-MS após decomposição por MIC (300 mg, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora) nos materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$	56
Tabela 10.	Resultados para F (ISE) e Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (500 mg, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora) de materiais biológicos. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$	69
Tabela 11.	Resultados obtidos para F (ISE), Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) após a decomposição por MIC (300 mg, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora) nos materiais de referência. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$	70

- Tabela 12.** Resultados para F (ISE) e Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb, e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (700 mg de leite em pó integral, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora). Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n=3. 71
- Tabela 13.** Limites de quantificação (10σ) obtidos para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC para o método de referência (500 mg de leite em pó integral, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) e para o método proposto (700 mg de leite em pó integral, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora). Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ 72
- Tabela 14.** Limites de quantificação (10σ) obtidos para Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) para o método de referência (MAWD usando HNO_3 14,4 mol L^{-1} , 500 mg de leite em pó integral) e para o método proposto (MIC, 700 mg de leite em pó integral, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora). Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$ 74

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC international*.

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

DRC-ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com uso de cela dinâmica de reação, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry using dynamic reaction cell*.

CDTA, ácido ciclohexano diamino tetraacético, do inglês *cyclohexanediaminetetraacetic acid*.

F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectroscopy*.

FI-CVG-ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor a frio e injeção em fluxo do, inglês *flow injection cold vapor generation coupled inductively coupled plasma mass spectrometry*.

HPA, sistema de decomposição em alta temperatura e pressão, do inglês *high pressure asher*.

HR-CS-MAS, espectrometria de absorção molecular usando forno de grafite de fonte contínua, do inglês *high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry*.

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

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

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

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

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

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

MAWD, decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês *microwave-assisted wet digestion*.

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

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

PFA, perfluoralcóxi, do inglês *perfluoralkoxy polymer resin*.

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

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

TISAB, tampão de ajuste de força iônica total, do inglês, *total ionic strength adjustment buffer*.

TMAH, hidróxido de tetrametilamônio, do inglês *tetramethylammonium hydroxide*.

PVG-ICP-MS, geração fotoquímica de vapor por radiação ultravioleta acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *UV photochemical vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry*.

XRF, fluorescência de raios-X, do inglês *X-ray fluorescence*.

RESUMO

Neste trabalho foi proposto um método de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas (MIC), usando solução absorvedora única para a posterior determinação de metais e halogênios em materiais biológicos. Para demonstração do princípio, foram utilizadas amostras de leite em pó integral e a determinação de F foi feita por potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE); Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). Para MIC, os seguintes parâmetros foram avaliados: massa de amostra, concentração de HNO₃ da solução absorvedora e o tempo de refluxo empregado. Massas de amostra de até 700 mg foram decompostas por MIC, utilizando HNO₃ 5 mol L⁻¹ como solução absorvedora e 5 min de refluxo. Para a determinação de F, as soluções de calibração foram preparadas em HNO₃ e as amostras digeridas, assim como as soluções de calibração, foram ajustadas quanto ao pH (pH 5) previamente às medidas por ISE. A determinação de Cl, Br e I por ICP-MS foi feita empregando-se curvas de calibração preparadas em NH₄OH 10 mmol L⁻¹, sendo necessária a prévia diluição e ajuste do pH (pH 10) das amostras digeridas, para contornar efeitos de memória em meio ácido. Perdas de iodo foram observadas quando foram empregados tempos de refluxo maiores que 5 min (10 e 15 min). Após decomposição por MIC, as soluções podem ser armazenadas por até 7 dias sob refrigeração (4 °C), sem que perdas sejam observadas para F, Cl, Br e I. Cabe destacar que estes experimentos de estabilidade não foram feitos para metais. Os resultados obtidos pelo método proposto foram concordantes com os resultados obtidos por MIC usando NH₄OH 25 mmol L⁻¹ como solução absorvedora para os halogênios e com os resultados obtidos por decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD) usando HNO₃ 14,4 mol L⁻¹, para metais. A exatidão foi avaliada empregando materiais de referência de leite em pó integral (NIST 8435) e tecido de ostra (NIST 1566a) e os valores encontrados foram concordantes com os valores de referência. Os limites de quantificação (LOQs) obtidos foram menores que 19,2 e 1,8 µg g⁻¹ para os halogênios e metais, respectivamente. O método proposto foi, também, aplicado para amostras de fígado bovino e crustáceos (camarão, *Penaeus subtilis*, e corrupto, *Callichirus major*).

ABSTRACT

In this work, a sample preparation method using microwave-induced combustion (MIC) using a single absorbing solution was applied for further determination of both halogens and metals in biological samples. A whole milk powder sample was used for method evaluation. Fluorine was determined by potentiometry with ion selective electrode (ISE), Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and Ca, K, Mg and Na by flame atomic absorption spectroscopy (F AAS). The following parameters were evaluated for MIC: sample mass, nitric acid concentration used as absorbing solution and time of reflux step. According to the results, it was possible to observe that sample masses up to 700 mg were efficiently digested by MIC using 5 mol L⁻¹ HNO₃ as absorbing solution an 5 min of reflux. For F determination by ISE, standard solutions were prepared using nitric acid, and the digests, as well standard solutions, were adjusted to pH 5 previous the determination step. For Cl, Br and I determination by ICP-MS, calibration was carried out using 10 mmol L⁻¹ NH₄OH solution. Digests were diluted and the pH was adjusted (pH 10), in order to avoid memory effects for I. Losses of I were observed when reflux step was higher than 5 min (10 and 15 min). Digested solutions obtained by using MIC can be stored up to 7 days at 4 °C since no losses of F, Cl, Br and I were observed in this period. It is important to mention that these experiments were not carried out for metals determination. The results obtained by the proposed method (MIC) were in agreement with those obtained by MIC using 25 mmol L⁻¹ NH₄OH as absorbing solution for halogens and by microwave-assisted wet digestion (MAWD) using concentrated HNO₃ for metals. The accuracy was also evaluated using reference materials (NIST 8435, whole milk powder and NIST 1566a, oyster tissue) and obtained results were in agreement with the reference values. Limits of quantification (LOQs) were lower than 19.2 and 1.8 µg g⁻¹ for halogens and metals determination, respectively. The proposed method was applied to bovine liver and crustaceans samples (*Penaeus subtilis* and *Callichirus major*).

1 INTRODUÇÃO

Diversos metais e não metais presentes em materiais biológicos podem ser considerados como essenciais ou tóxicos, dependendo da natureza e concentração em que se encontram. A informação da concentração destes elementos pode trazer informações importantes sobre os níveis destes no organismo humano, bem como identificar a rota metabólica em sistemas biológicos.¹⁻³

Entre as técnicas mais utilizadas para a determinação de halogênios, destacam-se a cromatografia de íons (IC), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE). Estas técnicas exigem, normalmente, que a amostra esteja na forma de solução para introdução nos equipamentos. Assim, necessitam de uma etapa prévia de preparo de amostras que é, geralmente, a mais morosa do processo analítico sendo, também, a qual está sujeita aos principais erros, além de riscos de contaminação.^{1,4,5}

Dentre os métodos de preparo de amostra empregados para materiais biológicos e posterior determinação de halogênios, podemos destacar a extração, a piroidrólise, a decomposição por via úmida e os métodos de combustão.^{1,5} Porém, alguns destes métodos podem não ser adequados para a posterior determinação de halogênios devido à eliminação incompleta da matriz e possibilidade de perdas de analitos devido à formação de compostos voláteis. Dentre os métodos de combustão, a combustão iniciada por radiação micro-ondas (MIC) permite a completa destruição da matriz orgânica e possibilita o uso de diferentes soluções

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

² Mesko, M. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

³ Pereira, J. S. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.

⁴ Arruda, M. A. Z., *Trends in sample preparation*, Nova Science Publishers, New York, 2007, p. 29-82.

⁵ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras*, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.

absorvedoras, além de permitir uma etapa de refluxo. Além disso, é um método rápido e que permite a utilização de reagentes diluídos.^{1,6}

A maior parte dos métodos de preparo de amostras são desenvolvidos de acordo com a matriz e os analitos a serem determinados. Ou seja, métodos para a posterior determinação de metais e halogênios são, normalmente, executados com diferentes condições experimentais.¹ Por exemplo, a absorção de metais, geralmente, é feita com o uso de soluções ácidas sendo que, a absorção de halogênios é, normalmente, feita utilizando soluções alcalinas.^{1,4,5} Assim, análises que necessitam a determinação de metais e halogênios na mesma amostra demandam maior tempo e, conseqüentemente, maior custo, resultando em um consumo maior de reagentes.

Tendo em vista a necessidade, principalmente, de métodos mais simples e rápidos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método que possibilite empregar as mesmas condições, em um método de preparo de amostras único por MIC, que permite a posterior determinação de metais e não metais (incluindo halogênios), na mesma solução de decomposição. Para tanto, foi avaliada a possibilidade de recuperação de halogênios em soluções absorvedoras ácidas, empregando a MIC como método de preparo de amostra. Além disso, foi avaliada a estabilidade destes halogênios em função do tempo de estocagem, nas diferentes soluções ácidas avaliadas para absorção. A determinação de F foi feita por ISE; Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). A exatidão do método proposto foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos utilizando métodos distintos de preparo de amostra e através do emprego de materiais de referência.

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁶ Flores, E. M. M., *Microwave-assisted sample preparation for trace element determination*, Elsevier, Amsterdam, 2014, p. 400.

⁴ Arruda, M. A. Z., *Trends in sample preparation*, Nova Science Publishers, New York, 2007, p. 29-82.

⁵ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras*, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica aqui apresentada inclui uma compilação de dados reportados na literatura acerca da importância da determinação de metais e não metais em materiais biológicos. Após, são apresentados os principais métodos de preparo de amostras, bem como as técnicas analíticas frequentemente utilizadas para a determinação destes analitos.

2.1 IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE METAIS E HALOGÊNIOS EM MATERIAIS BIOLÓGICOS

A determinação de metais e não metais em materiais biológicos é um importante parâmetro de qualidade devido, principalmente, ao uso destas amostras na alimentação.³ Além disso, a quantificação destes analitos pode trazer informações importantes sobre os níveis destes elementos no organismo, bem como identificar a rota metabólica em sistemas biológicos.^{1,2}

A presença de halogênios, como F, Cl e I, seus efeitos e distribuição em amostras biológicas são mais conhecidos do que para Br.¹ O consumo de flúor é necessário a fim de garantir boa saúde bucal. Entretanto, em concentrações elevadas, o F pode se acumular, principalmente, em áreas ricas em cálcio, podendo causar fluorose.^{1,7} O cloro é um elemento essencial ao organismo humano, sendo que participa de várias funções, como a regulação da pressão osmótica e no controle do pH sanguíneo. Porém, em doses elevadas, pode causar inúmeras disfunções no organismo, principalmente quando em presença de sódio, aumentando a pressão arterial.^{1,8} O iodo, assim como o Cl, é essencial ao organismo humano, principalmente, ao funcionamento da glândula tireoide, sendo que o seu excesso ou falta causa disfunções nesta glândula.^{1,9} O efeito do bromo no organismo ainda não é muito conhecido. Alguns estudos trazem a essencialidade deste elemento para os animais, pois a sua deficiência pode causar alterações nas membranas de base, observadas em doenças relacionadas ao tabagismo.¹⁰ Entretanto, o excesso de Br pode causar diminuição da quantidade de I na glândula da tireoide. Além disso, cabe salientar que, geralmente, a presença de Br é proveniente de fontes externas, como produtos de desinfecção ou, até mesmo, pelo uso de retardantes de chama.^{1,11,12}

³ Pereira, J. S. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

² Mesko, M. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

⁷ Prystupa, J., *Toxicology Mechanisms and Methods* 21 (2011) 103-170.

⁸ Fechetia, M. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 71-72 (2012) 98-101.

⁹ Zimmermann, M. B. *et al.*, *Lancet* 372 (2008) 1251-1262.

¹⁰ McCall, A. S. *et al.*, *Cell* 157 (2014) 1380-1392.

¹¹ Picoloto, R. S. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

¹² Lag, M. *et al.*, *Chemical Research in Toxicology* 4 (1991) 528-534.

Assim como para os halogênios, a determinação de metais é importante, pois estes elementos podem ser essenciais ao organismo ou tóxicos, dependendo da sua espécie e concentração em que se encontram.³ O excesso ou deficiência de metais e não metais pode causar diversas desordens clínicas, como retardo no crescimento, anemia, câncer respiratório, decréscimo na imunidade, alterações na pele, entre outros problemas.^{3,13} Elementos como Cd e Pb, são considerados tóxicos, e podem causar vários danos ao organismo, mesmo em níveis muito baixos de exposição.^{3,14} Por outro lado, Ca, por exemplo, é um elemento majoritário presente no organismo humano, sendo que a deficiência deste pode causar vários problemas, como a osteoporose.¹⁵

Tendo em vista a essencialidade e a toxicidade associadas à presença de metais e não metais em amostras biológicas, o conhecimento da concentração destes elementos é fundamental. Muitas vezes, o limite entre estas concentrações que causam efeitos tóxicos ou essenciais é próximo, o que exige o emprego de métodos precisos, exatos e com baixos limites de quantificação. A seguir, serão abordados com mais detalhes, os principais métodos de preparo de amostras empregados para a posterior determinação de halogênios.

2.2 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIOS

Em geral, as técnicas analíticas usadas para determinação de metais e não metais requerem que os analitos estejam presentes em uma solução. Para isso, quando se trabalha, em especial, com amostras sólidas, é necessário que um método de preparo seja aplicado, previamente à determinação dos analitos, para converter a amostra a uma forma adequada para ser introduzida no equipamento. É importante que o procedimento de preparo de amostra seja simples, rápido e

³ Pereira, J. S. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.

¹³ Fraga, C. G., *Molecular Aspects of Medicine* 26 (2005) 235-244.

¹⁴ Codex alimentarius commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, 2003.

¹⁵ Quesada-Gómez, J. M. *et al.*, Low calcium intake and inadequate vitamin D status in postmenopausal osteoporotic women, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 136 (2013) 175-177.

eficiente, fornecendo resultados com precisão e exatidão adequados. Cabe salientar que, para a escolha do método de preparo de amostra adequado, deve se levar em consideração os analitos e o nível de concentração que se quer determinar, bem como a técnica de determinação disponível para este fim.^{1,4,5}

Quando se visa à determinação de halogênios, é necessária maior atenção aos métodos de preparo de amostra utilizados, principalmente devido às possíveis perdas destes por formação de espécies voláteis quando soluções ácidas são utilizadas, mesmo em sistemas fechados.^{1,16,17} Estas perdas são observadas principalmente quando ácidos concentrados são utilizados na etapa de decomposição. Assim, a maior parte dos métodos de preparo de amostras reportados na literatura para a posterior determinação de halogênios, empregam soluções alcalinas.¹ Neste caso, dentre os métodos de preparo de amostras, destaca-se o uso da extração, piroidrólise, métodos de combustão e, em menor número, a decomposição por via úmida.

A extração tem sido utilizada, principalmente, devido a sua simplicidade, além da possibilidade de uso de reagentes diluídos e temperaturas mais brandas. Os extratores mais comumente utilizados são soluções alcalinas, como hidróxido de amônio¹¹, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH)^{11,18,19} e soluções de aminas terciárias²⁰. Entretanto, por ser um método que não elimina a matriz, podem ocorrer interferências durante a etapa de determinação pela presença de teores elevados de carbono, dependendo da técnica analítica utilizada.²¹

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁴ Arruda, M. A. Z., Trends in sample preparation, Nova Science Publishers, New York, 2007, p. 29-82.

⁵ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.

¹⁶ Leppänen, K. *et al.*, *Food Analytical Methods* 7 (2013) 1103-1108.

¹⁷ Todoli, J. L. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 54 (1999) 895-929.

¹¹ Picoloto, R. S. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

¹⁸ Knapp, G. *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 (1998) 508-513.

¹⁹ Rose, M. *et al.*, *Journal of Environmental Monitoring* 3 (2001) 361-365.

²⁰ Nobrega, J. A. *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12 (1997) 1243-1246.

²¹ Grindlay, G. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

A piroidrólise, embora seja aplicada, principalmente, para matrizes inorgânicas²² e combustíveis fósseis^{23,24}, pode ser empregada também para materiais biológicos²⁵⁻²⁷ para a posterior determinação de halogênios. A principal vantagem da piroidrólise é a separação dos analitos da matriz, já que é baseada na hidrólise dos analitos a altas temperaturas. Os halogênios são volatilizados e convertidos, normalmente, em seus respectivos ácidos inorgânicos na presença de vapor de água, sendo posteriormente absorvidos em uma solução adequada. As soluções absorvedoras geralmente empregadas, são soluções diluídas de carbonato ou hidróxido de amônio, ou até mesmo água, dependendo do analito e da técnica de determinação utilizada. A instrumentação requerida é simples e de baixo custo. Entretanto, geralmente, apresenta baixa frequência analítica (2 a 5 amostras podem ser processadas por hora).^{1,5} Embora a piroidrólise possa ser empregada para outros elementos, como B e S, para a maioria dos metais ela não é adequada, devido a maior dificuldade de formação de espécies voláteis.¹

Considerando a incompleta extração dos analitos e as possíveis interferências dos métodos de extração, tais como o elevado teor de carbono em solução e a inadequabilidade para a volatilização de metais por piroidrólise, faz-se necessário que métodos de preparo que permitam a completa decomposição da matriz da amostra sejam empregados. A decomposição por via úmida é uma alternativa. Entretanto, o uso de ácidos concentrados pode provocar perdas de halogênios por volatilização. Já os métodos de combustão, possuem alta eficiência de decomposição e possibilitam o emprego de soluções diluídas, podendo ser empregados na posterior determinação de halogênios.

A seguir, serão apresentados com mais detalhes os métodos de decomposição por via úmida e de combustão, com ênfase na MIC, que foi utilizada neste trabalho.

²² Taflik, T. *et al.*, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2012) 488-495.

²³ Antes, F. G. *et al.*, *Quimica Nova* 33 (2010) 1130-1134.

²⁴ Antes, F. G. *et al.*, *Analytical Methods* 3 (2011) 288-293.

²⁵ Dressler, V. L. *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 466 (2002) 117-123.

²⁶ Shinoda, T. *et al.*, *Analytical Letters* 45 (2012) 862-871.

²⁷ Schnetger, B. *et al.*, *Analyst* 121 (1996) 1627-1631.

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁵ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.*

2.2.1 Decomposição por via úmida

A decomposição por via úmida tem sido amplamente aplicada para amostras biológicas para a posterior determinação de metais e não metais.^{4,5} Geralmente, o HNO_3 é utilizado como agente oxidante, podendo este ser combinado com outros ácidos concentrados, tais como HCl , HClO_4 , H_2SO_4 e HF ou, também, com peróxido de hidrogênio.²⁸

A decomposição por via úmida pode ser feita em sistemas abertos ou fechados. Os sistemas abertos possibilitam, geralmente, a decomposição de maior massa de amostra com instrumentação mais simples. Porém, há susceptibilidade à contaminação e perda de analitos por volatilização, combinada com maior consumo de reagentes e maior tempo de decomposição. Além disso, a temperatura do sistema é limitada pela temperatura de ebulição do ácido ou da mistura ácida, podendo, em alguns casos, não fornecer a condição adequada para a completa decomposição das amostras.^{5,28}

Por outro lado, a utilização de sistemas fechados para a decomposição por via úmida aumenta a eficiência e reduz o tempo requerido para a decomposição das amostras em relação aos sistemas abertos.²⁸ O uso desses sistemas possibilita a determinação de elementos passíveis de volatilização, o que não é possível quando utiliza-se o sistema com frascos abertos. Além disso, em sistemas fechados, ocorre um aumento da pressão interna do sistema, acarretando o aumento da temperatura da solução e, conseqüentemente, do poder de oxidação do ácido empregado.⁵ Cabe salientar que, as decomposições por via úmida podem ser feitas sob aquecimento convencional ou com o uso da radiação micro-ondas. Este último, na maioria dos casos, proporciona decomposições em menor tempo que aquelas que utilizam aquecimento convencional. Além disso, os sistemas de decomposição por via úmida com radiação micro-ondas, geralmente, são equipados com sensores de pressão e temperatura, que possibilitam decomposições com maior controle operacional.^{5,28,29}

⁴ Arruda, M. A. Z., Trends in sample preparation, Nova Science Publishers, New York, 2007, p. 29-82.

⁵ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.

²⁸ Flores, E. M. M., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.

²⁹ Kingston, H. M. *et al.*, Introduction to microwave sample preparation - theory and practice, ACS Professional Reference Book, Washington, 1988, p. 263.

Apesar da decomposição por via úmida possibilitar alta eficiência de decomposição, para a posterior determinação de halogênios, este método pode apresentar inconvenientes, tais como perdas destes analitos quando se utilizam sistemas abertos e ácidos concentrados. Além disso, podem ocorrer, também, interferências em algumas técnicas de determinação, quando alta concentração de ácido é usada.^{1,16,17}

Alguns trabalhos reportados na literatura usam a decomposição por via úmida empregando ácidos concentrados para a decomposição de amostras e posterior determinação de halogênios.¹ Na Tabela 1, são apresentados alguns trabalhos relacionados com o preparo de amostras biológicas utilizando ácidos, para a posterior determinação de halogênios.

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

¹⁶ Leppänen, K. *et al.*, *Food Analytical Methods* 7 (2013) 1103-1108.

¹⁷ Todoli, J. L. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 54 (1999) 895-929.

Tabela 1. Aplicações envolvendo o uso de métodos de decomposição por via úmida para a posterior determinação de halogênios em materiais biológicos.

Amostra	Elemento	Preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Leite em pó	Cl, Br e I	MAWD: 250 mg de amostra foram decompostas usando 4 mL de HNO ₃ 14,3 mol L ⁻¹ e 1 mL de H ₂ O ₂ 30%. Posteriormente foram adicionadas de 1 mL de AgNO ₃ 1 mol L ⁻¹ e as soluções obtidas foram centrifugadas e o precipitado, previamente separado e lavado com água, foi diluído com 2 mL de solução concentrada de amônia.	ICP-OES LODs, em µg g ⁻¹ : Cl: 15 Br: 20 I: 40	Cl: 97 a 105% Br: 87 a 104% I: 85 a 102%	30
Leite em pó, músculo de bacalhau, tecido de ostra, ovo em pó, feno em pó, rim suíno	I	MAWD: 100 mg de amostra foram decompostos usando 0,3 mL de HNO ₃ 14,3 mol L ⁻¹ e 0,5 mL de HClO ₄ 16,6 mol L ⁻¹ . HPA (sistema de alta pressão): 100 mg de amostra foram decompostos usando 0,3 mL de H ₂ O, 2,1 mL de HNO ₃ 14,3 mol L ⁻¹ e 0,5 mL de HClO ₄ 16,6 mol L ⁻¹ .	ICP-MS LOD, em µg g ⁻¹ : I: 0,01	MAWD: 98 a 102% HPA: 92 a 94%	18
Leite em pó, folhas de <i>citrus</i> , tecido de ostra	I	MAWD: 500 mg de amostra foram decompostos utilizando 7 mL de HNO ₃ concentrado. Após resfriamento, foi adicionado 0,2 mL de H ₂ O ₂ e foi repetido o programa de irradiação.	PVG-ICP-MS LOD: não informado	I: 60-85%	31

³⁰ Naozuka, J. *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 917-921.

¹⁸ Knapp, G. *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 (1998) 508-513.

³¹ Grinberg, P. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 235-241.

Tabela 1. Aplicações envolvendo o uso de métodos de decomposição por via úmida para a posterior determinação de halogênios em materiais biológicos.

(continuação)

Amostra	Elemento	Detalhes do preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Soro sanguíneo	F	Decomposição por via úmida: 20 µL de amostra foram decompostos utilizando 500 µL de éter e 5 µL de HClO ₄ . Após agitação, foram adicionados e 2 mL de complexo de bifenil sódio (em éter) e posteriormente 500 µL de água. A solução foi centrifugada e o sobrenadante foi extraído com éter, adicionado de 450 µL de H ₂ NaPO ₄ .H ₂ O 5 g L ⁻¹ e 1000 µL de NH ₃ 65%. Os extratos, após aquecimento, foram centrifugados e o precipitado foi dissolvido em 100 µL de ácido fórmico 20%, adicionado de 100 µL de Al 0,01 mol L ⁻¹ e feita diluição a 1 mL com água.	GF MAS LOD: não informado	F: 98 a 100%	32
Leite em pó	I, Cu, Fe e Pb	Decomposição por via úmida: 500 mg de amostra foram decompostos utilizando 5 mL de HNO ₃ 15,2 mol L ⁻¹ e 3 mL de H ₂ O ₂ . Após, foi adicionada uma solução de 20% (m/V) de Na ₂ S ₂ O ₈ e o digerido foi submetido ao aquecimento novamente.	ICP-MS: I ICP-OES: Cu, Fe e Pb LODs: não informados	I: 99% Cu:100% Fe:97% Pb: 88%	16

³² Venkateswarlu, P. et al., *Microchemical Journal* 48 (1993) 78-85.

¹⁶ Leppänen, K., et al., *Food Analytical Methods* 7 (2013) 1103-1108.

Tabela 1. Aplicações envolvendo o uso de métodos de decomposição por via úmida para a posterior determinação de halogênios em materiais biológicos.

					(conclusão)
Amostra	Elemento	Detalhes do preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Leite em pó e músculo bovino	Cl	Decomposição por via úmida: (1) 100 mg de amostra foram decompostos em frascos de polipropileno com de 1,5 mL de HNO ₃ 14,3 mol L ⁻¹ . A solução foi mantida em repouso, e posteriormente, filtrada. (2) 100 mg de amostra, foram decompostos usando 4 mL de HNO ₃ 14,3 mol L ⁻¹ e 1 mL de H ₂ O ₂ 30%, adicionado de 1 mL de AgNO ₃ 1 mol L ⁻¹ . As soluções obtidas foram centrifugadas e o precipitado, previamente separado e lavado com água, foi diluído com 2 mL de solução concentrada de amônia.	HR-CS-GF MAS LODs, em µg g ⁻¹ : 1) Cl: 18 2) Cl: 9	1): 25 a 49% 2): 79 a 115%	8

ICP-OES: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; ICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; HR-CS-GF MAS: espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua empregando forno de grafite; GF MAS: espectrometria de absorção molecular com forno de grafite; MAWD: decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas; HPA: sistema de decomposição a alta pressão; PVG-ICP-MS: geração fotoquímica de vapor por radiação ultravioleta acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

⁸ Fechetia, M. et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 71–72 (2012) 98-101.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, na maior parte dos trabalhos apresentados envolvendo a decomposição por via úmida, geralmente, é feita mais uma etapa de decomposição, tornando o método moroso. Além disso, pode ser observado, também, que além de HNO_3 , outros reagentes são utilizados, para melhorar a eficiência de decomposição, como é o caso do H_2O_2 ou para evitar possíveis perdas de analito, como é o caso do AgNO_3 . Entretanto, a adição de um maior número de reagentes como, também, um maior número de etapas, pode levar à contaminação. Além disso, podem ocorrer interferências na etapa da determinação, dependendo do reagente e da técnica analítica empregada.

Nos trabalhos de Fechetia *et al.*⁸ e Naozuca *et al.*³⁰, após a decomposição das amostras de leite em pó e músculo bovino empregando HNO_3 e H_2O_2 , foi feita a adição de AgNO_3 a fim de precipitar os halogênios nos digeridos. Após, o precipitado foi dissolvido em uma solução de amônia concentrada e, depois, diluído em água. No mesmo trabalho de Fechetia *et al.*⁸, foi feita a decomposição das amostras utilizando HNO_3 $14,3 \text{ mol L}^{-1}$ e a solução foi mantida em repouso e filtrada. A exatidão para Cl ficou entre 25 e 49%, indicando a ineficiência do método proposto. Já Gringberg *et al.*³¹, após uma etapa de decomposição das amostras utilizando HNO_3 por MAWD, repetiu o programa de irradiação adicionando H_2O_2 no digerido. Os resultados apresentaram perdas para I de 15 a 40%, e a presença de uma concentração relativamente alta de HNO_3 nos digeridos ocasionando interferências na etapa de determinação.

Em outro trabalho, desenvolvido por Venkateswarlu *et al.*³², para a determinação de F por GF-MAS, os autores fizeram a decomposição de soro sanguíneo utilizando HClO_4 na presença de éter. Posteriormente, após a adição de complexo de bifenil sódio (em éter), foi feita a extração com éter e nos extratos foi adicionado de uma solução de $\text{H}_2\text{NaPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 g L^{-1} e solução de amônia concentrada. O precipitado foi dissolvido em ácido fórmico e, posteriormente, foi adicionada uma solução de alumínio (formação da molécula). Os resultados mostraram recuperações para F de 98 a 100%.

⁸ Fechetia, M. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 71–72 (2012) 98-101.

³⁰ Naozuka, J. *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 917-921.

³¹ Grinberg, P. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 235-241.

³² Venkateswarlu, P. *et al.*, *Microchemical Journal* 48 (1993) 78-85.

2.2.2 Métodos de combustão

A combustão é uma reação de decomposição de matéria orgânica na presença de oxigênio, tendo como produtos principais CO₂ e H₂O. É utilizada como método de preparo de amostra por ser relativamente simples, envolvendo essencialmente a ação do oxigênio, que pode ser obtido com um teor mínimo de contaminantes quando comparado aos ácidos inorgânicos usados nos processos de decomposição. Além disso, geralmente é um processo que leva a oxidação completa da amostra, e os analitos são retidos em uma solução adequada para a determinação.^{28,33}

Assim como a decomposição por via úmida, os métodos de combustão podem ser conduzidos em sistemas abertos ou fechados. Em sistemas abertos, a oxidação da matéria orgânica é feita pela presença do oxigênio presente no ar atmosférico. O método mais comum de combustão em sistema aberto é por via seca, utilizando forno do tipo mufla, além do método de combustão de Wickbold³⁴ e sistema dinâmico (Trace-O-Mat)³⁵, os quais são menos usados.

Na combustão por via seca, é utilizado um forno do tipo mufla e o sistema é aquecido em temperaturas na faixa de 450 a 550 °C. O sistema permanece aquecido até que sobre somente um resíduo inorgânico não volátil. Este resíduo deve ser solúvel em ácido diluído. O método requer o uso de instrumentação simples e possibilita decomposição de elevada massa de amostra, com baixo consumo de reagentes. Entretanto, além da possibilidade de contaminação, por ser um sistema aberto, pode haver a perda parcial ou completa de analitos voláteis, como é o caso de alguns metais e não metais, o que inclui os halogênios.⁵

²⁸ Flores, E. M. M., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.

³³ Fung, Y. S. *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 315 (1995) 347-355.

³⁴ Čápková, V. R. *et al.*, *Talanta* 64 (2004) 869-878.

³⁵ Gelinas, Y. *et al.*, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 1021-1025.

⁵ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.*

Dentre os métodos de combustão em sistema fechado, destacam-se a bomba de combustão, o frasco de Schöniger e a MIC. A decomposição utilizando bomba de combustão ocorre em uma bomba de aço, pressurizada com oxigênio, contendo uma solução absorvedora adequada para os analitos. A amostra, geralmente prensada na forma de comprimido, é posicionada no suporte e a ignição é feita através do contato elétrico entre dois eletrodos. Apesar de possuir alta eficiência de decomposição, a etapa de refluxo é manual, bem como somente uma amostra pode ser decomposta por vez. A bomba de combustão possui uso limitado para a posterior determinação de metais, devido aos possíveis problemas de contaminação pelo contato com as partes metálicas.^{5,28}

A combustão utilizando frasco de Schöniger consiste na queima da amostra, envolvida em um papel filtro, posicionada em um suporte de platina, que é colocado dentro de um erlenmeyer. A solução absorvedora é adicionada e o frasco é preenchido com oxigênio. A ignição é feita eletricamente, por lâmpadas de infravermelho ou de forma manual. Com o início da combustão, o frasco é invertido rapidamente para que a solução absorvedora faça a vedação do sistema, minimizando possíveis perdas de analito. Após a queima, o frasco é lavado com a própria solução absorvedora para promover a lixiviação dos analitos aderidos às paredes internas. A principal vantagem deste método é a instrumentação utilizada, que é de baixo custo e fácil aquisição. Entretanto, a massa de amostra é limitada pelo tamanho do frasco (50 mg de amostra necessitam de um frasco de 500 mL).⁵ Cabe ressaltar que a combustão utilizando frasco de Schöniger é o método recomendado para a posterior determinação de Cl, Br e I por titulometria em amostras de leite em pó pela *Official Methods of Analysis of AOAC International* (Método 974.36).³⁶

Considerando os métodos de combustão discutidos anteriormente, podemos observar que eles apresentam baixa frequência analítica, ou seja, apenas uma amostra pode ser decomposta por vez. Na combustão por via seca, massas maiores de amostra podem ser empregadas, entretanto, há maior risco de contaminação e perdas por volatilização.

⁵ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras*, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.

²⁸ Flores, E. M. M., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.

³⁶ *Official Methods of Analysis of AOAC International* AOAC International, Gaithersburg, USA, 2012.

Tendo em vista as desvantagens dos métodos de combustão apresentados, a MIC vem sendo utilizada com sucesso, na decomposição de amostras das mais diversas matrizes,^{11,37-44} para a posterior determinação de metais e não metais. As principais vantagens da MIC, em relação aos outros métodos de combustão, referem-se à possibilidade de efetuar uma etapa de refluxo posteriormente à queima da amostra, além da elevada frequência analítica (até 8 amostras podem ser decompostas em 5 min).^{5,6} Com base nestas peculiaridades, a MIC foi escolhida no presente trabalho, e será dado maior enfoque para este método nesta revisão.

2.2.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas

A MIC, desenvolvida por Barin⁴⁵ e Flores *et al.*⁴⁶, tem sido usada com sucesso para a decomposição e posterior determinação de metais e não metais^{2,46-48}, incluindo os halogênios^{2,11,38,47,49,50} em materiais biológicos e outras matrizes de difícil decomposição^{39-44,51}. Sua primeira aplicação foi para a decomposição de produtos farmacêuticos, utilizando oxigênio líquido e um forno micro-ondas doméstico.⁴⁵ A amostra foi alocada em um suporte de quartzo, inserido em um frasco de perflúoralcói (PFA).⁴⁵ Posteriormente, o sistema foi adaptado para a

¹¹ Picoloto, R. S. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

³⁷ Barbosa, J. T. P. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.

³⁸ Costa, V. C. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

³⁹ Cruz, S. M. *et al.*, *Microchemical Journal* 123 (2015) 28-32.

⁴⁰ Cruz, S. M. *et al.*, *Fuel* 160 (2015) 108-113.

⁴¹ Flores, E. M. M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 374-380.

⁴² Muller, A. L. H. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2012) 258-264.

⁴³ Pereira, J. S. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

⁴⁴ Pereira, R. M. *et al.*, *Talanta* 147 (2016) 76-81.

⁵ Krug, F. J., *Métodos de preparo de amostras*, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.

⁶ Flores, E. M. M., *Microwave-assisted sample preparation for trace element determination*, Elsevier, Amsterdam, 2014, p. 400.

⁴⁵ Barin, J. S., *Dissertação de mestrado*, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Maria-RS, (2003).

⁴⁶ Flores, E. M. M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

² Mesko, M. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

⁴⁷ Barin, J. S. *et al.*, *Microwave-induced combustion*, E. M. M. Flores (Ed.) *Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 143-177.

⁴⁸ Maciel, J. V. *et al.*, *Food Chemistry* 145 (2014) 927-931.

⁴⁹ Silva, S. V. *et al.*, *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.

⁵⁰ Mesko, M. F. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.

⁵¹ Mello, P. A. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 105 (2015) 95-102.

utilização em forno micro-ondas comercial, desenvolvido inicialmente para a decomposição de amostras por via úmida em sistema fechado.⁵²

Para o procedimento de MIC, a amostra é prensada na forma de um comprimido e posicionada em um suporte de quartzo, sobre um papel filtro umedecido com uma solução de nitrato de amônio. Este suporte é, então, colocado no frasco de decomposição de quartzo, contendo a solução absorvedora. O frasco é então fechado e pressurizado com oxigênio e, ao ser submetido à radiação micro-ondas, ocorre a queima da amostra, que pode ser seguida por uma etapa de refluxo opcional.^{5,46}

Além da elevada eficiência de decomposição, a MIC também permite que se aplique uma etapa de refluxo posterior à etapa da queima, o que possibilita lavagem eficiente das paredes internas dos frascos, diminuindo os desvios padrão relativos (RSDs). A MIC combina vantagens da MAWD, pelo aquecimento por radiação micro-ondas, com a elevada eficiência de decomposição dos métodos de combustão em sistema fechado (baixos teores de carbono residual), obtendo-se soluções compatíveis com os métodos de determinação. Além disso, possibilita maior frequência analítica que os métodos convencionais de combustão e permite o uso de soluções diluídas, o que minimiza interferências na etapa de determinação.^{5,46,47} Cabe salientar, também, que a única alteração em relação à instrumentação utilizada para MAWD, é a inserção de um suporte de quartzo e a necessidade de pressurização com oxigênio.

Foram selecionados alguns trabalhos na literatura utilizando métodos de combustão para o preparo de amostras para a posterior determinação de metais e não metais. Os principais aspectos dos trabalhos selecionados encontram-se na Tabela 2.

⁵² Anton Paar GmbH, Multiwave 3000®, Microwave Sample Preparation System, Software Version v1.27-Synt, Graz, Austria, (2003).

⁵ Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.

⁴⁶ Flores, E. M. M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

⁴⁷ Barin, J. S. *et al.*, Microwave-induced combustion, E. M. M. Flores (Ed.) *Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 143-177.

Tabela 2. Aplicações selecionadas utilizando combustão como método de preparo de amostras para a posterior determinação de metais e não metais em materiais biológicos.

Amostra	Elemento	Detalhes do preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Leite em pó, músculo de bacalhau, tecido de ostra, feno em pó, rim suíno e ovo em pó	I	Frasco de Schöniger: 20 a 50 mg de amostra foram decompostos em um erlenmeyer de 500 mL, utilizando TMAH 5% como solução absorvedora.	ICP-MS LOD, em $\mu\text{g g}^{-1}$ I: 0,005	I: 94 a 101%	18
Fígado bovino, amido de milho, leite em pó, farinha de trigo	I	MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora e 50 μL de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 15 bar de O_2 .	ICP-MS e IC LODs, em $\mu\text{g g}^{-1}$: ICP-MS: 0,0007 IC: 3	I: 96 a 103%	50
Leite em pó desnatado, alface do mar	I	MIC: 80 a 180 mg de amostra (leite e planta, respectivamente) foram decompostos, utilizando 10 mL de NaOH 0,25 mol L^{-1} e 0,2 mL de H_2O_2 30% como solução absorvedora e 2-3 gotas de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 10 bar de O_2 .	ICP-OES com geração prévia de vapor LODs, em $\mu\text{g g}^{-1}$: Leite: 0,037 Planta: 0,018	I: 98 a 100%	53

¹⁸ Knapp, G. et al., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 (1998) 508-513.

⁵⁰ Mesko, M. F. et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.

⁵³ Vtorushina, E. A. et al., *Journal of Analytical Chemistry* 64 (2009) 129-135.

Tabela 2. Aplicações selecionadas utilizando combustão como método de preparo de amostras para a posterior determinação de metais e não metais em materiais biológicos.

(continuação)					
Amostra	Elemento	Detalhes do preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Proteína do soro do leite	Br e I	MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de NH ₄ OH 25 mmol L ⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH ₄ NO ₃ 6 mol L ⁻¹ como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O ₂ .	ICP-MS LODs, em µg g ⁻¹ : Br: 0,095 I: 0,008	Br: 102% I: 105%	49
Leite em pó	Br e I	MIC: 500 a 700 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de NH ₄ OH 25 mmol L ⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH ₄ NO ₃ 6 mol L ⁻¹ como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O ₂ .	ICP-MS LODs em µg g ⁻¹ : Br: 0,007 I: 0,003	Br: 103% I: 97 a 105%	11
Mel	Br e I	MIC: 1000 mg de amostra, juntamente com 400 mg de celulose microcristalina e 100 µL NH ₄ NO ₃ 6 mol L ⁻¹ foram decompostos, utilizando 6 mL de NH ₄ OH 50 mmol L ⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH ₄ NO ₃ 6 mol L ⁻¹ como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 25 bar de O ₂ .	ICP-MS LODs em µg g ⁻¹ : Br: 0,034 I: 0,003	Br: 101 a 105% I: 98 a 106%	38
Camarão	Br e I	MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de NH ₄ OH 50 mmol L ⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH ₄ NO ₃ 6 mol L ⁻¹ como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O ₂ .	ICP-MS LODs em µg g ⁻¹ : Br: 0,12 I: 0,013	Br: 99% I: 106%	54

⁴⁹ Silva, S. V. *et al.*, *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.

¹¹ Picoloto, R. S. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

³⁸ Costa, V. C. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

⁵⁴ Hartwig, C. A. *et al.*, *Analytical Methods* 6 (2014) 7540-7546.

Tabela 2. Aplicações selecionadas utilizando combustão como método de preparo de amostras para a posterior determinação de metais e não metais em materiais biológicos.

(continuação)

Amostra	Elemento	Detalhes do preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Tabaco	F, Cl e Br	MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol L ⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH_4NO_3 6 mol L ⁻¹ como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O ₂	IC LODs em µg g ⁻¹ : Cl: 0,1 Br: 0,2 I: 0,5	F: 98 a 103% Cl: 97 a 100% Br: 99 a 104%	55
Peixe (<i>Engraulis anchoita</i>)	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se e Zn	MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de HNO ₃ 5 mol L ⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH_4NO_3 6 mol L ⁻¹ como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O ₂ .	ICP-MS LODs, em µg g ⁻¹ : As: 0,003 Mn: 0,002 Cd: 0,001 Mo: 0,005 Co: 0,002 Ni: 0,004 Cr: 0,005 Se: 0,016 Cu: 0,004 Zn: 0,006 Fe: 0,015	As: 97 a 99% Cd: 98 a 100% Co: 104 a 108% Cr: 98 a 106% Cu: 95 a 96% Fe: 94 a 104% Mn: 95 a 97% Mo: 95% Ni: 102 a 106% Se: 96 a 103% Zn: 95 a 100%	48

⁵⁵ Muller, A. L. H. *et al.*, *Analytical Letters* 45 (2012) 1004-1015.

⁴⁸ Maciel, J. V. *et al.*, *Food Chemistry* 145 (2014) 927-931.

Tabela 2. Aplicações selecionadas utilizando combustão como método de preparo de amostras para a posterior determinação de metais e não metais em materiais biológicos (continuação).

(continuação)

Amostra	Elemento	Detalhes do preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Leite em pó, folhas de citrus, tecido de ostra	I	Tubo de combustão: 20 a 400 mg de amostra foram decompostos em uma câmara de combustão constituída de um tubo de quartzo, utilizando ácido acético 5% como solução absorvedora e fluxo contínuo de vapor de água.	PVG-ICP-MS LOD, em $\mu\text{g g}^{-1}$: I: 0,075	I: 60 a 85%	31
Soja e derivados	Cl, Br e I	MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de NH_4OH 100 mmol L^{-1} como solução absorvedora e 50 μL de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O_2 .	ICP-MS LODs em $\mu\text{g g}^{-1}$: Cl: 1,25 (DRC-ICP-MS) Br: 0,03 I: 0,002	Cl: 93 a 100% Br: 98 a 102% I: 96 a 97%	37
Nozes	As, Cd, Hg e Pb	MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e 50 μL de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O_2 .	ICP-MS LODs, em $\mu\text{g g}^{-1}$: As: 0,003 Cd:0,002 Pb: 0,006 Hg: 0,007 (FI-CVG-ICP-MS)	As: 97 a 105% Cd:100 a 108% Pb: 98 a 103% Hg:97 a 104%	42

³¹ Grinberg, P. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 235-241.

³⁷ Barbosa, J. T. P. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.

⁴² Muller, A. L. H. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2012) 258-264.

Tabela 2. Aplicações selecionadas utilizando combustão como método de preparo de amostras para a posterior determinação de metais e não metais em materiais biológicos.

(conclusão)					
Amostra	Elemento	Detalhes do preparo de amostra	Técnica de determinação e LODs	Exatidão	Referência
Leite em pó	Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr, V e Zn	<p>FMIC: 3000 mg de amostra foram decompostos, utilizando 10 mL de HNO₃ 2 mol L⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹ como iniciador de combustão. Foi empregada vazão de O₂ de 2 L min⁻¹ antes da ignição e imediatamente após aumentada pra 15 L min⁻¹.</p> <p>MIC: 500 mg de amostra foram decompostos, utilizando 6 mL de HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora e 50 µL de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹ como iniciador de combustão. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O₂.</p>	<p>ICP-OES</p> <p>LODs*, em µg g⁻¹:</p> <p>Ba: 0,015 Mg: 0,03</p> <p>Ca:0,03 Mn: 0,009</p> <p>Co:0,009 Sr: 0,015</p> <p>Cr: 0,015 V: 0,009</p> <p>Cu:0,015 Zn: 0,009</p> <p>Fe:0,015</p> <p>*LODS para FMIC</p>	<p>Ba: 105%</p> <p>Ca: 96 a 105%</p> <p>Co: -</p> <p>Cr: 104%</p> <p>Cu: 98 a 103%</p> <p>Fe: 75 a 99%</p> <p>Mg: 96 a 108%</p> <p>Mn: 96 a 117%</p> <p>Sr: 98%</p> <p>V: -</p> <p>Zn: 94 a 101%</p>	3

ICP-OES: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; ICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado; DRC-ICP-MS: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com uso de cela dinâmica de reação; IC: cromatografia de íons; FI-CVG-ICP-MS: geração de vapor frio acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplada e injeção em fluxo; PVG-ICP-MS: geração fotoquímica de vapor por radiação ultravioleta acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

³ Pereira, J. S. F. et al., *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.

Como pode ser observado na Tabela 2 a maior parte das aplicações recentes empregando métodos de combustão para a posterior determinação de metais e não metais utilizam a MIC. Para a determinação de halogênios, a MIC é empregada utilizando, geralmente, soluções alcalinas diluídas para absorção dos analitos. Estas soluções alcalinas, na maior parte das aplicações, são de NH_4OH ^{11,37,38,49,54} ou de Na_2CO_3 ^{50,55} diluídos. Já para a determinação de metais e outros não metais, a solução absorvedora, na maior parte das aplicações, é HNO_3 ^{3,42,48} diluído. A vantagem do uso dessas soluções absorvedoras diluídas é a compatibilidade com as técnicas de determinação, evitando possíveis interferências, além do menor consumo de reagentes e segurança.

A seguir, após a breve revisão dos métodos de preparo de amostras com potencial aplicação para decomposição de materiais biológicos e posterior determinação de halogênios e metais, serão abordadas as principais técnicas analíticas empregadas para a determinação destes analitos.

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE METAIS E HALOGÊNIOS

Dentre as técnicas analíticas empregadas para determinação de halogênios, as mais comuns são a cromatografia de íons (IC)^{1,44,56-60} a espectrometria de massa

¹¹ Picoloto, R. S. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

³⁷ Barbosa, J. T. P. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.

³⁸ Costa, V. C. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

⁴⁹ Silva, S. V. *et al.*, *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.

⁵⁴ Hartwig, C. A. *et al.*, *Analytical Methods* 6 (2014) 7540-7546.

⁵⁰ Silva, S. V. *et al.*, *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.

⁵⁵ Muller, A. L. H. *et al.*, *Analytical Letters* 45 (2012) 1004-1015.

³ Pereira, J. S. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.

⁴² Muller, A. L. H. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2012) 258-264.

⁴⁸ Maciel, J. V. *et al.*, *Food Chemistry* 145 (2014) 927-931.

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁴⁴ Pereira, R. M. *et al.*, *Talanta* 147 (2016) 76-81.

⁵⁶ Cataldi, T. I. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 134-141.

⁵⁷ Divjak, B. *et al.*, *Journal of Chromatography A* 862 (1999) 39-47.

⁵⁸ Flores, E. M. M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.

⁵⁹ Novic, M. *et al.*, *Journal of Chromatography A* 704 (1995) 530-534.

⁶⁰ Nunes, T. S. *et al.*, *Analytical Methods* 7 (2015) 2129-2134.

com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS),^{11,35,37,38,49,50} e potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE),^{34,61-63} que foram as usadas neste trabalho e serão discutidas brevemente. Outras técnicas de determinação também são empregadas, como a análise por ativação neutrônica (NAA),⁶⁴ espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES),³⁰ fluorescência de raios-X (XRF)¹ e espectrometria de absorção molecular (MAS).^{8,32,65}

2.3.1 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A ampla utilização da ICP-MS para a determinação de metais e halogênios deve-se, principalmente, aos seus baixos limites de quantificação, capacidade multielementar e ampla faixa linear de trabalho.^{1,66} A ICP-MS baseia-se na separação de íons positivamente carregados, gerados nos plasma, em função das suas razões m/z, por um espectrômetro de massa que, geralmente, é um quadrupolo.⁶⁷

Os halogênios são parcialmente ionizados em plasma de argônio, devido a suas elevadas energias de ionização, piorando os LODs para estes elementos. Entretanto, estes ainda são melhores que os obtidos por outras técnicas de determinação, como a ICP-OES. Devido ao alto potencial de ionização do F, este é pouco ionizado em plasma de argônio, podendo ser determinado nesta condição somente utilizando espectrômetros de alta resolução.¹

¹¹ Picoloto, R. S. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

³⁵ Gelinas, Y. *et al.*, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 1021-1025.

³⁷ Barbosa, J. T. P. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.

³⁸ Costa, V. C. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.

⁴⁹ Silva, S. V. *et al.*, *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.

⁵⁰ Mesko, M. F. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.

³⁴ Čápková, V. R. *et al.*, *Talanta* 64 (2004) 869-878.

⁶¹ Rakiás, F. *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 121 (1980) 93-99.

⁶² Krishna, M. V. B. *et al.*, *Analytical Methods* 4 (2012) 1565-1572.

⁶³ Antes, F. G. *et al.*, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2012) 1193-1198.

⁶⁴ Gelinas, Y. *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 (1998) 483-488.

³⁰ Naozuka, J. *et al.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 917-921.

¹ Mello, P. A. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁸ Fechetia, M. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 71-72 (2012) 98-101.

³² Venkateswarlu, P. *et al.*, *Microchemical Journal* 48 (1993) 78-85.

⁶⁵ Welz, B. *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 647 (2009) 137-148.

⁶⁶ Dressler, V. L. *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry* 307 (2011) 149-162.

⁶⁷ Becker, J. S., *Inorganic mass spectrometry - principles and applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, p. 496.

Apesar das vantagens da determinação de Cl, Br e I por ICP-MS, deve-se levar em consideração possíveis interferências que podem ocorrer nas determinações.^{1,30,68} Algumas dessas interferências são causadas pela formação de espécies poliatômicas no plasma, dentre as quais podem ser citadas: $^{35}\text{Cl}^+(\text{}^{18}\text{O}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+, \text{}^{34}\text{S}^{1}\text{H}^+, \text{}^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^+)$, $^{37}\text{Cl}^+(\text{}^1\text{H}^{36}\text{Ar}^+)$, $^{79}\text{Br}^+(\text{}^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^{1}\text{H}^+, \text{}^{63}\text{Cu}^{16}\text{O}^+, \text{}^{78}\text{Se}^{1}\text{H}^+)$ e $^{81}\text{Br}^+(\text{}^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^{1}\text{H}^+)$ e $^{127}\text{I}^+(\text{}^{111}\text{Cd}^{16}\text{O}^+, \text{}^{115}\text{In}^{12}\text{C}^+, \text{}^{126}\text{Te}^{1}\text{H}^+)$. As interferências causadas por espécies poliatômicas são mais pronunciadas na determinação de Cl. Além disso, alternativas como o uso da cela dinâmica de reação e da cela de colisão podem ser usadas para minimizar estas interferências.^{67,69}

Além das interferências espectrais, são relatados na literatura problemas relacionados com a utilização de soluções ácidas para a determinação de Cl, Br e I.¹⁷ As soluções ácidas podem favorecer a formação das espécies voláteis dos halogênios, alterando as propriedades físicas e podendo causar efeitos de memória, por permanecerem mais tempo no sistema de introdução de amostras. Estes efeitos podem ser facilmente contornados com o uso de soluções alcalinas, que são geralmente empregadas nos métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de halogênios.^{1,30} Ainda, soluções com elevado teor de carbono também podem causar interferências nas determinações, ocasionando um aumento de sinal, principalmente para Br e I. Entretanto, pode ocorrer entupimento e incrustação na interface do equipamento.^{1,21}

Cabe salientar que, a ICP-MS, além de ser utilizada para a determinação de halogênios, é amplamente utilizada para a determinação de metais e outros não metais^{16,39,42,43,51,66}.

¹ Mello, P. A. et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

³⁰ Naozuka, J. et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 917-921.

⁶⁸ Stewart, I. I. et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1249-1256.

⁶⁷ Becker, J. S., *Inorganic mass spectrometry - principles and applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, p. 496.

⁶⁹ Robert, T., *Practical guide to ICP-MS*, CRC Press, Boca Raton, 2008, p. 324.

¹⁷ Todoli, J. L. et al., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 54 (1999) 895-929.

²¹ Grindlay, G. et al., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

¹⁶ Leppänen, K. et al., *Food Analytical Methods* 7 (2013) 1103-1108.

³⁹ Cruz, S. M. et al., *Microchemical Journal* 123 (2015) 28-32.

⁴² Muller, A. L. H. et al., *Food Analytical Methods* 6 (2012) 258-264.

⁴³ Pereira, J. S. F. et al., *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

⁵¹ Mello, P. A. et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 105 (2015) 95-102.

⁶⁶ Dressler, V. L. et al., *International Journal of Mass Spectrometry* 307 (2011) 149-162.

2.3.2 Potenciometria

A potenciometria utilizando eletrodos íon seletivos é baseada na capacidade de responder a variações de potencial elétrico nas membranas do eletrodo, de modo proporcional ao logaritmo da atividade de uma espécie iônica.⁷⁰ Esta seletividade depende da estrutura e constituição das membranas dos eletrodos empregados. Na determinação de halogênios, a potenciometria usando ISE tem sido amplamente empregada na determinação de F.^{34,61-63}

A utilização de ISE para F resulta em LOQs mais altos que, por exemplo, a cromatografia de íons com detecção por condutividade. Entretanto, a ISE é uma técnica mais robusta e que apresenta menores interferências. Porém, o pH da solução e a presença de diferentes concentrações de íons, como cátions metálicos e íons hidroxila, podem interferir nas determinações. Para contornar este problema, é usado um tampão de ajuste da força iônica do meio (TISAB), constituído de NaCl, ácido acético glacial e ácido ciclohexano diamino tetraacético (CDTA). Este tampão garante uma força iônica constante, por meio da adição do sal inerte (NaCl). Além disso, o uso da solução TISAB também faz o ajuste do pH, uma vez que ácido acético é utilizado, formando um tampão na presença do NaCl. Ainda, os íons metálicos são complexados pela presença do CDTA, deixando os íons F⁻ livres em solução.^{63,71}

⁷⁰ Torres, K. Y. C. *et al.*, *Química Nova* 29 (2006) 1094-1100.

³⁴ Čápková, V. R. *et al.*, *Talanta* 64 (2004) 869-878.

⁶¹ Rakiás, F. *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 121 (1980) 93-99.

⁶² Krishna, M. V. B. *et al.*, *Analytical Methods* 4 (2012) 1565-1572.

⁶³ Antes, F. G. *et al.*, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2012) 1193-1198.

⁷¹ Frant, M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 40 (1968) 1169-1171.

2.3.3 Cromatografia de íons

A IC é uma técnica de separação, baseada em interações específicas entre os íons da solução e uma matriz polimérica contendo grupos funcionais de carga oposta àquela do analito.⁷² Para a determinação de halogênios, a fase estacionária geralmente empregada é de grupos quaternários de amônio e as soluções para fase móvel são compostas de Na_2CO_3 e NaHCO_3 . De acordo com a retenção dos analitos nesta fase estacionária, os íons são eluídos em diferentes tempos. A detecção geralmente é feita por detector de condutividade. Para minimizar espécies interferentes do eluente, um supressor químico é utilizado, convertendo o eluente iônico em uma espécie não iônica, não interferindo assim na detecção condutométrica dos analitos.^{72,73}

A principal vantagem da IC é a possibilidade de determinação simultânea de F, Cl, Br e I. Entretanto, para a determinação por IC, é necessária decomposição da amostra tão completa quanto possível, de modo a evitar eventuais interferências.⁵⁵ Alguns estudos reportados na literatura usam a IC, empregando métodos de decomposição variados e para diversos tipos de materiais.^{26,44,55-60,74}

⁷² Schäfer, H. *et al.*, Ion chromatography, theory, columns and eluents, monografia 50143, Herisau, Metrohm AG, (2003) p. 54.

⁷³ Saari-Nordhaus, R. *et al.*, *Journal of Chromatography A* 956 (2002) 15-22.

⁵⁵ Muller, A. L. H. *et al.*, *Analytical Letters* 45 (2012) 1004-1015.

²⁶ Shinoda, T. *et al.*, *Analytical Letters* 45 (2012) 862-871.

⁴⁴ Pereira, R. M. *et al.*, *Talanta* 147 (2016) 76-81.

⁵⁶ Cataldi, T. I. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 134-141.

⁵⁷ Divjak, B. *et al.*, *Journal of Chromatography A* 862 (1999) 39-47.

⁵⁸ Flores, E. M. M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.

⁵⁹ Novic, M. *et al.*, *Journal of Chromatography A* 704 (1995) 530-534.

⁶⁰ Nunes, T. S. *et al.*, *Analytical Methods* 7 (2015) 2129-2134.

⁷⁴ Romarís-Hortas, V. *et al.*, *Food Chemistry* 124 (2011) 1747-1752.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, são descritos os métodos de preparo de amostras utilizados, bem como as otimizações do método de MIC e da determinação de metais e halogênios utilizando uma solução absorvedora única para todos os analitos.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para os procedimentos de decomposição por MAWD e MIC, foi utilizado um forno de micro-ondas (Multiwave 3000®, Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Áustria), equipado com oito frascos de quartzo, com capacidade individual de 80 mL. Neste sistema, a temperatura, potência e pressão máximas de trabalho foram 280 °C, 1400 W e 80 bar, respectivamente. Para o procedimento de MIC, um suporte de quartzo foi utilizado para inserção da amostra no interior do frasco.

A determinação de metais e halogênios foi feita utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (NexION 300X, PerkinElmer, Canadá), com tocha e tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.), equipado com nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica. As condições operacionais utilizadas para determinação de metais e halogênios por ICP-MS estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros operacionais para a determinação metais e halogênios por ICP-MS.

Parâmetro	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência, W	1300
Vazão de argônio principal, L min ⁻¹	18
Vazão de argônio auxiliar, L min ⁻¹	1,2
Vazão de argônio do nebulizador, L min ⁻¹	0,95
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	Pt
Analito	Isótopo (<i>m/z</i>)
Ag	109
Br	79
Cd	112
Cl	35
Co	59
I	127
Pb	208
Sr	86

A determinação de Ca, K, Mg e Na foi feita utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica (Vario 6, Analytik Jena, Alemanha), equipado com queimador convencional para chama ar-acetileno. Lâmpadas de cátodo oco foram usadas como fonte de radiação e uma lâmpada de deutério foi usada para correção de fundo. Os comprimentos de onda selecionados para Ca, K, Mg e Na foram 422,7, 769,9, 285,2 e 589,0 nm, respectivamente.

A determinação de fluoreto foi feita em um potenciômetro digital (781 pH/Ion Meter, Metrohm, Suíça) equipado com eletrodo íon seletivo para fluoreto (6.0502.150, Metrohm, Suíça) e com eletrodo de referência de Ag/AgCl (6.0726.100, Metrohm, Suíça).

A determinação de F, Cl e Br também foi feita utilizando um cromatógrafo de íons (850 Professional IC, Metrohm, Suíça) equipado com detector de condutividade, supressora química e amostrador automático. A coluna de troca iônica utilizada foi de grupos de amônio quaternário suportados em poli(álcool vinílico) com 250 x 4 mm de d. i. e 5 µm de diâmetro de partícula (Metrosep A Supp 5, Metrohm), com vazão máxima de 0,8 mL min⁻¹ e faixa de pH de trabalho de 3 a 12. Uma pré-coluna com 5 x 4 mm de diâmetro (Metrosep A Supp 4/5 Guard, Metrohm, Suíça) do mesmo material de preenchimento da coluna de troca iônica, também foi utilizada. A vazão da bomba foi ajustada para 0,7 L min⁻¹ e a alça de amostragem utilizada foi de 100 µL.

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Optima 4300 DV, Perkin Elmer, EUA) foi utilizado para determinação de carbono nos digeridos. O espectrômetro é equipado com nebulizador concêntrico e câmera de nebulização ciclônica. A potência do gerador de radiofrequência foi de 1400 W, com vazões de argônio principal, auxiliar, e de nebulização de 15, 0,2 e 0,7 L min⁻¹, respectivamente. Para a determinação de C, foi utilizado ítrio (1 mg L⁻¹) como padrão interno e os digeridos foram previamente submetidas a um fluxo de argônio (0,1 L min⁻¹ por 2 min) para remoção de gases dissolvidos.⁵¹

⁵¹ Mello, P. A. et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 105 (2015) 95-102.

Os procedimentos de pesagem foram todos efetuados em balança analítica (AY220, Shimadzu, Brasil) com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Uma estufa convencional com circulação de ar (400/5 ND, Nova Ética, Brasil) foi usada na secagem dos reagentes sólidos, das amostras e para o procedimento de determinação de umidade. Um liofilizador (LH 2000/3, Terroni Fauvel, Brasil) foi usado na secagem da amostra após o procedimento de adição de analitos. Para o preparo dos comprimidos, foi usada uma prensa de aço (*Manual Hydraulic Press 15 Ton*, Specac, Inglaterra), operando em 3 ton min⁻¹. Um banho de ultrassom (P 120 H, Elmasonic, Alemanha) com potência de 300 W e frequência de 37 KHz foi utilizado na descontaminação dos papéis filtro utilizados na MIC, bem como uma capela de fluxo laminar (CFLH 12, Veco do Brasil, Brasil) foi usada na secagem destes. Uma chapa de aquecimento com agitação (Velp Scientifica, Itália) foi usada no procedimento de descontaminação dos materiais com água purificada e para homogeneização da amostra na etapa de adição de analito.

Os resultados foram avaliados empregando teste estatístico para comparação de médias (teste *t-Student*, com nível de confiança de 95%), utilizando o software GraphPad InStat, versão 3.0, 1997 (GraphPad InStat Software, EUA).

3.2 REAGENTES

A água utilizada neste trabalho foi previamente destilada e desionizada, em uma coluna de troca iônica e, posteriormente, purificada em um sistema Milli-Q® (Milli-Q® Ultrapure Water Purification Systems, Gradient System, Millipore, EUA) apresentando resistividade final de 18,2 MΩ cm. O ácido nítrico concentrado p.a (65% 1,4 kg L⁻¹, Merck, Alemanha) foi bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição em um sistema de destilação de quartzo (duoPUR®, Subboiling Distillation System, Milestone, Itália).

As soluções estoque usadas na calibração em ICP-MS e IC para F, Cl, Br e I (1000 mg L⁻¹), foram preparadas a partir da dissociação de sais de NaF, NaCl, KBr e KI (Merck) em água. As soluções de calibração usadas nas determinações de Cl, Br e I por ICP-MS foram preparadas a partir da diluição da solução estoque em solução de NH₄OH 10 mmol L⁻¹. As soluções contendo todos os halogênios para calibração do cromatógrafo de íons e a solução contendo F para calibração do ISE foram

preparadas a partir da diluição das soluções estoque em água. Para o preparo das soluções de calibração para a determinação de metais por ICP-MS foi usada uma solução de referência multielementar de 10 mg L⁻¹ (SCP33MS, SCP Science, Canadá), diluída em HNO₃ 0,7 mol L⁻¹. As soluções de calibração em F AAS foram preparadas em HNO₃ 0,7 mol L⁻¹ a partir de soluções monoelementares de 1000 mg L⁻¹ (Merck) de Ca, K, Mg e Na. As soluções de calibração em ISE foram preparadas em água e diferentes concentrações de HNO₃, sendo neutralizadas com NaOH (Merck). A solução estoque de carbono foi preparada pela dissolução de ácido cítrico (Vetec) em água. As soluções de calibração foram feitas a partir da diluição da solução estoque em HNO₃ 0,7 mol L⁻¹.

Para adição de F e metais na amostra, foi usada uma solução multielementar de 1000 mg L⁻¹ (Merck IV, Alemanha) e também uma solução de F contendo 10000 mg L⁻¹, preparada a partir de NaF (Merck).

A fase móvel utilizada para a cromatografia foi preparada a partir da dissolução de Na₂CO₃ (Merck) e NaHCO₃ (Merck) em água, tendo como concentração final 3,2 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃ e 1 mmol L⁻¹ de NaHCO₃.

Na determinação de F por ISE foi utilizada uma solução tampão (TISAB).⁷¹ A solução foi preparada com ácido acético glacial (Merck), ácido ciclohexano diamino tetraacético (CDTA) (Merck) e NaCl (Merck). Após a dissolução completa dos reagentes, a solução teve seu pH ajustado a 5,5 com NaOH (Merck).

Como iniciador de combustão para MIC, foi utilizada uma solução (6 mol L⁻¹) de nitrato de amônio p.a. (Merck), preparada a partir da dissolução do respectivo sal em água purificada. Discos de papel filtro com baixo teor de cinzas (Black Ribbon Ashless nº 5891, Schleicher & Schüll, Alemanha) foram usados para auxiliar no processo de combustão.

Uma solução de amônia (28-30%, 0,90 kg L⁻¹, Merck, Alemanha) foi usada para o ajuste de pH das soluções para as determinações por ICP-MS e também no preparo das soluções absorvedoras alcalinas usadas na MIC. As soluções absorvedoras ácidas foram preparadas a partir da diluição de HNO₃ bidestilado em água.

⁷¹ Frant, M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 40 (1968) 1169-1171.

O gás utilizado para ICP-MS e ICP-OES e purga de amostras para determinação de C por ICP-OES foi argônio, com pureza de 99,998% (White Martins, Brasil). Oxigênio de pureza mínima 99,6% (White Martins, Brasil) foi usado na pressurização dos frascos no procedimento de MIC. Acetileno (White Martins, Brasil) de pureza mínima de 99,8% foi utilizado para compor a chama na determinação de metais por F AAS.

3.3 AMOSTRAS E MATERIAIS DE REFERÊNCIA

As amostras de leite em pó integral, fígado bovino e de crustáceos (camarão, *Penaeus subtilis*, e corrupto, *Callichirus major*) foram adquiridas em comércio local (Santa Maria, RS, Brasil). A amostra de leite em pó foi a utilizada para a otimização do método proposto. De acordo com o fabricante, o teor de gordura é de 3,5% em leite em pó integral. As amostras foram secas em estufa a 60 °C, por 120 min, previamente ao uso.

Devido à baixa concentração de F na amostra de leite em pó integral utilizada para otimização do método, foi feita a adição de analito em concentração adequada para determinação por IC e ISE (100 µg g⁻¹). Além disso, foi feita a adição de uma solução multielementar contendo Ag, Cd, Co, Pb e Sr, para a otimização do método de preparo de amostra proposto. Para este procedimento, foram pesados aproximadamente 250 g de leite em pó integral, que foram colocados em um béquer, juntamente com 400 mL de água. Após, foram adicionados 2500 µL de uma solução padrão de F (10000 mg L⁻¹) e 125 µL de solução multielementar (1000 mg L⁻¹), equivalendo a 100 µg g⁻¹ de F e 0,5 µg g⁻¹ de Ag, Cd, Co, Pb e Sr. A solução foi mantida sob agitação por 4 horas a aproximadamente 50 °C, inicialmente para homogeneização da amostra e, também, para evaporação da água. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e moídas em gral de ágata.

Para avaliação da exatidão dos métodos de preparo de amostras empregados neste trabalho, utilizou-se o material de referência de leite em pó integral (RM NIST 8435, *whole milk powder*, National Institute of Standards & Technology, EUA) e material de referência certificado de tecido de ostra (SRM NIST 1566a, *oyster tissue*, National Institute of Standards & Technology, EUA). Assim como as

amostras, os materiais de referência foram secos em estufa a 60 °C por 2 h previamente ao uso.

3.4 PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO

As vidrarias e materiais comuns de laboratório foram primeiramente lavados com água e posteriormente descontaminados por imersão em HNO₃ 10% (v/v) por, pelo menos, 24 h. Após este tempo, os materiais foram novamente lavados com água purificada.

Os frascos de quartzo, utilizados nos procedimentos de decomposição em forno micro-ondas foram descontaminados com HNO₃ 14,4 mol L⁻¹. O programa de irradiação utilizado foi constituído de uma etapa de 10 min de irradiação, a 1400 W de potência seguidos de 20 min a 0 W de potência para o arrefecimento dos frascos.

A descontaminação dos papéis filtro utilizados nos suportes de quartzo no procedimento da MIC foi feita utilizando-se solução de ácido nítrico 20% (v/v), etanol p.a. (Vetec) e água purificada. Os papéis foram imersos primeiramente em solução de HNO₃ e submetidos a um tratamento em banho de ultrassom por 20 min. Após, o material foi imerso em etanol e posteriormente em água e submetidos ao mesmo procedimento em banho de ultrassom. Em seguida, o material foi lavado e seco em capela de fluxo laminar.

3.5 PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO

3.5.1 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas

Para o procedimento de MAWD, 500 mg de amostra foram pesados e transferidos para os frascos de quartzo. Após foram adicionados 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹. Os frascos foram fechados, fixados no rotor e transferidos para a cavidade do forno de micro-ondas. O programa de irradiação utilizado foi constituído de uma etapa de 10 min de irradiação a 1400W, com 5 min de rampa seguidos de 20 min a 0 W para arrefecimento dos frascos.⁵²

⁵² Anton Paar GmbH, Multiwave 3000®, Microwave Sample Preparation System, Software Version v1.27-Synt, Graz, Austria, (2003).

Após a etapa de resfriamento, os frascos foram despressurizados, a solução resultante foi transferida para frascos de polipropileno e o volume foi completado a 25 mL, com água ultrapura.

3.5.2 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas

As amostras, na forma de comprimidos (500 a 800 mg), foram colocadas em um papel filtro, de aproximadamente 15 mm de diâmetro, na base do suporte de quartzo. Este papel filtro foi umedecido pela adição 50 μL de uma solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} diretamente sobre ele. O suporte foi inserido, com auxílio de uma haste, no frasco de quartzo, no qual foram previamente adicionados 6 mL de solução absorvedora (H_2O e HNO_3 0,5 a 14,4 mol L^{-1}).

Após o fechamento dos frascos, estes foram fixados no rotor e, então, pressurizados com oxigênio (20 bar). A capa protetora foi colocada no rotor e este foi posicionado na cavidade do forno de micro-ondas. O programa de irradiação do forno de micro-ondas para a MIC está mostrado na Tabela 4.^{2,46} Cabe salientar que foram avaliados tempos maiores (10 e 15 min) de irradiação em potência de 1400 W.

Tabela 4. Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas.

Etapa	Potência, W	Rampa, min	Tempo, min	Exaustão
1	1400	-	5	1
2	0		20	2

Taxa de aumento de pressão: 3 bar s^{-1} , temperatura máxima: 280 °C e pressão máxima: 80 bar

Após a etapa de resfriamento, os frascos foram lentamente despressurizados, a solução resultante foi transferida para frascos de polipropileno e o volume foi completado a 25 mL.

² Mesko, M. F. *et al.*, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

⁴⁶ Flores, E. M. M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

3.5.2.1 Otimização do método de MIC para absorção de metais e não metais em uma solução absorvedora única

A fim de encontrar uma solução absorvedora única para retenção de metais e não metais (incluindo os halogênios), os seguintes parâmetros foram avaliados na MIC: massa de amostra, tipo e concentração da solução absorvedora e tempo de refluxo. Os procedimentos estão detalhados nos itens seguintes.

Cabe salientar que, para metais, a concordância dos resultados obtidos nas otimizações foi calculada a partir dos resultados provenientes da decomposição por via úmida assistida por micro-ondas (MAWD) de 500 mg da amostra de leite em pó integral usando HNO_3 14,4 mol L^{-1} . A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) de 500 mg da amostra de leite em pó integral usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora foi usada como método de referência para os valores de halogênios.

3.5.2.1.1 Avaliação da massa de amostra

A massa máxima de amostra da amostra de leite em pó integral que pode ser utilizada, sem riscos de pressão excessiva e que resultasse em completa decomposição da amostra foi avaliada. Para isso, foi utilizada uma pressão inicial de 20 bar de oxigênio e massas de amostra de 500 a 800 mg foram avaliadas. Cabe salientar que para os testes de otimização do método proposto foram utilizados apenas 300 mg de amostra.

3.5.2.1.2 Avaliação da solução absorvedora

Uma solução absorvedora única, adequada para a posterior determinação de metais e halogênios foi avaliada. Para isso, soluções de HNO_3 nas concentrações de 0,5, 1, 3, 5, 7, 10 e 14,4 mol L^{-1} e H_2O foram utilizadas. Os valores obtidos para os digeridos foram comparados quanto aos valores obtidos como referência.

3.5.2.1.3 Avaliação do tempo de refluxo

O tempo de refluxo foi avaliado a fim de obter melhor recuperação tanto de metais quanto de halogênios, como também menores RSDs.⁴⁶ As recuperações foram calculadas a partir dos resultados obtidos por MAWD para metais e por MIC usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora para halogênios. Foram avaliados tempos de 5, 10 e 15 min de irradiação.

3.6 DETERMINAÇÃO DE Cl, Br, I e METAIS POR ICP-MS

A determinação de Cl, Br e I por ICP-MS foi feita utilizando-se curvas de calibração preparadas em solução de NH_4OH 10 mmol L^{-1} . As amostras foram diluídas e ajustadas para pH 10, utilizando-se solução de amônia $3,7 \text{ mol L}^{-1}$. Esse ajuste foi necessário para que as amostras e os padrões utilizados para a calibração do equipamento estivessem em mesmo pH.

A determinação de metais foi feita utilizando-se curva de calibração preparada em solução de HNO_3 $0,7 \text{ mol L}^{-1}$. As amostras foram diluídas e ajustadas para a mesma concentração ácida utilizada para a calibração do equipamento.

3.7 DETERMINAÇÃO DE F POR ISE

A determinação de F nas soluções absorvedoras alcalinas ou água foi feita utilizando-se uma curva de calibração preparada em H_2O . As amostras foram adicionadas de TISAB e a determinação foi feita por ISE. Já as amostras em solução absorvedora ácida, foram determinadas em curvas preparadas em soluções ácidas de concentrações equivalentes às utilizadas nas diferentes soluções absorvedoras. As soluções para as curvas de calibração ácidas tiveram o pH ajustado para valores próximos ao do TISAB (5,5) com adição de NaOH previamente à adição de padrão e TISAB. As amostras tiveram seu pH ajustado próximo a 5,5, com NaOH, previamente à adição de TISAB e determinação por ISE.

⁴⁶ Flores, E. M. M. *et al.*, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

Na Figura 1 é mostrado um resumo dos métodos de preparo de amostras empregados para a decomposição da amostra de leite em pó integral, bem como os parâmetros avaliados no método proposto.

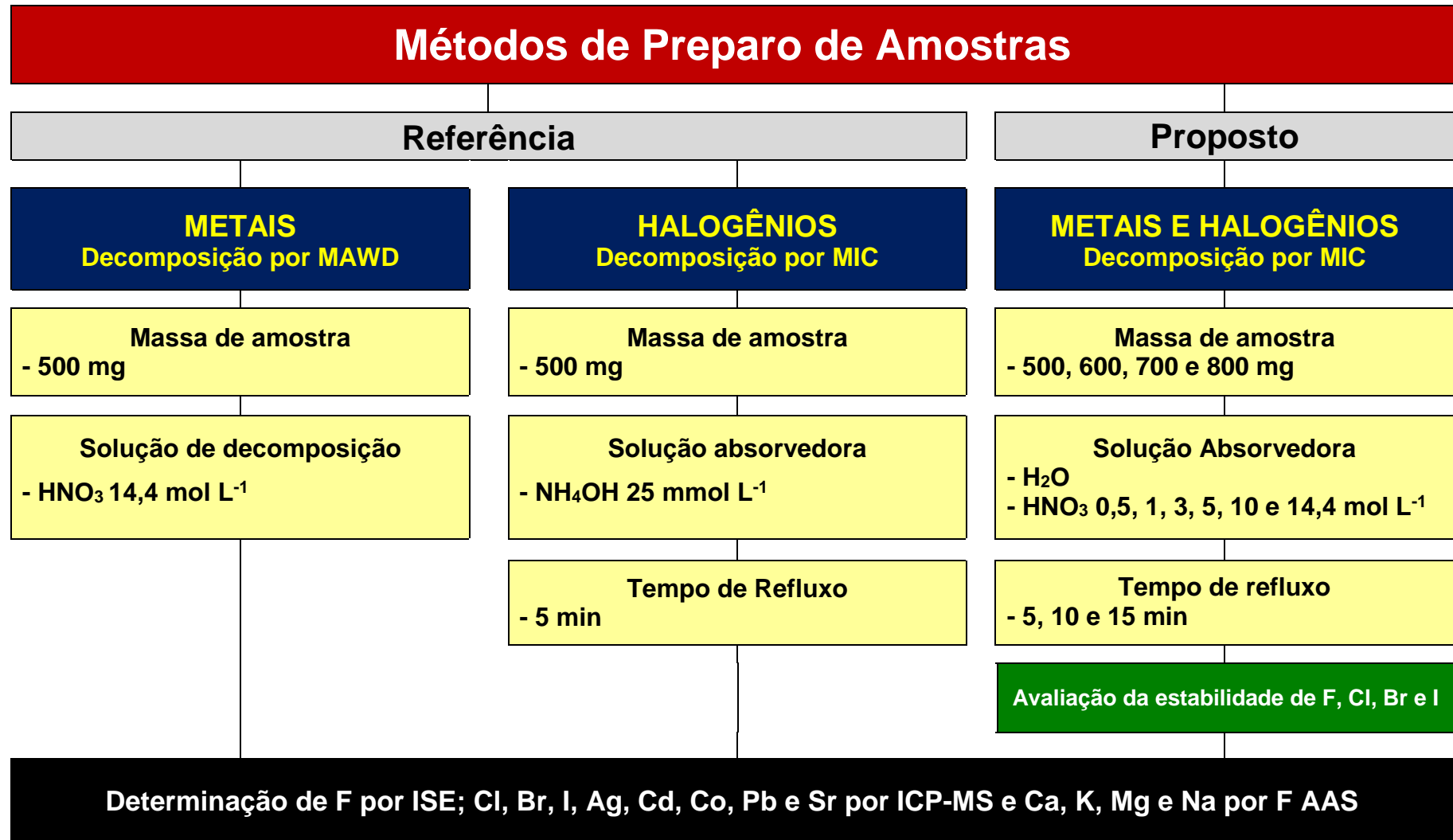


Figura 1. Resumo dos métodos de preparo de amostras empregados e dos parâmetros avaliados neste trabalho.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos após a decomposição das amostras por MIC utilizando H₂O e HNO₃ como soluções absorvedoras para a determinação de metais e halogênios por ISE, ICP-MS e F AAS. Inicialmente estão apresentados os resultados da otimização dos parâmetros relacionados à determinação de halogênios em meio ácido. Em seguida, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as avaliações do método proposto por MIC.

4.1 PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Para evitar possíveis contaminações tanto para metais quanto para halogênios, os materiais utilizados neste trabalho foram descontaminados conforme os procedimentos descritos em Materiais e Métodos (*item 3.4 Procedimentos de descontaminação*).

Os papéis filtro utilizados para MIC foram descontaminados duas vezes, primeiramente com HNO₃ 20% (v/v), que é o procedimento convencionalmente adotado para a posterior determinação de metais e, posteriormente, com etanol e água que é o procedimento de descontaminação convencionalmente usado para a posterior determinação de halogênios.⁷⁵ Para verificar a eficiência desta descontaminação, os papéis foram submetidos a decomposição por MIC utilizando água como solução absorvedora (*Materiais e Métodos, item 3.5.2 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas*) e posterior determinação de metais e não metais. Os valores encontrados para todos os halogênios, bem como para todos os metais, ficaram abaixo dos limites de quantificação ($< 2,7 \mu\text{g g}^{-1}$) para as técnicas empregadas neste trabalho. Assim, este foi o procedimento adotado para a descontaminação dos papéis filtro usados na MIC.

Foi avaliada também a necessidade de uma etapa de descontaminação dos frascos e suportes utilizados na MIC com água após a descontaminação com ácido para a determinação de halogênios. Para isso, após a decomposição por MIC de 500 mg de leite em pó integral, os frascos foram descontaminados com HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ (*Materiais e Métodos, item 3.4 Procedimentos de descontaminação*) e foi feita a combustão de papel filtro descontaminado, conforme citado anteriormente, utilizando água como solução absorvedora. Foi feita, também, após a decomposição por MIC de leite em pó integral, a descontaminação dos frascos com ácido, seguida de uma etapa de descontaminação com água (*Materiais e Métodos, item 3.4 Procedimentos de descontaminação*). Após estes procedimentos, foi feita a decomposição do papel filtro por MIC utilizando água como solução absorvedora a fim de avaliar a eficiência da descontaminação com água para a posterior determinação de halogênios. A determinação de Cl, Br e I foi feita

⁷⁵ Crizel, M. G. *et al.*, *Analytical Methods* 7 (2015) 4315-4320.

por ICP-MS, e os valores encontrados para as duas soluções avaliadas ficaram abaixo dos limites de quantificação para os três elementos.

A determinação dos halogênios foi feita também por IC, e os valores encontrados foram menores que 15,8, 123, 10,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para solução após descontaminação com HNO_3 e 15,8, 40, 10,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para solução após descontaminação com H_2O , para F, Cl, Br e I, respectivamente. Como pode ser observado, a descontaminação com água melhora os brancos para Cl, não tendo diferença para F, Br e I. Porém, mesmo que o valor para Cl encontrado após a descontaminação apenas com HNO_3 seja 3 vezes maior do que quando é feita a etapa de descontaminação com água, estes valores representam menos de 1% da concentração de Cl em solução para a amostra. Assim, a etapa de descontaminação com água após a descontaminação com ácido não foi efetuada nos testes subsequentes do presente trabalho.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS E HALOGÊNIOS EM LEITE EM PÓ INTEGRAL PARA ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO

Primeiramente, foi avaliada a concentração de halogênios e metais na amostra de leite em pó integral utilizada neste trabalho. Para a determinação de halogênios, foi escolhido como método de preparo de amostra a MIC empregando solução absorvedora alcalina, tendo em vista sua ampla utilização para a decomposição de materiais biológicos para a posterior determinação de halogênios.^{6,11,37,49,50} Para a determinação de metais foi escolhida a MAWD como método de preparo de amostra, de modo a garantir a completa decomposição da amostra sem perdas de analito.^{52,76} Cabe salientar que os valores obtidos com estes métodos serão usados como referência para a otimização do método proposto neste trabalho.

⁴⁹ Flores, E. M. M., *Microwave-assisted sample preparation for trace element determination*, Elsevier, Amsterdam, 2014, p. 400.

¹¹ Picoloto, R. S. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

³⁷ Barbosa, J. T. P. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.

⁴⁹ Silva, S. V. *et al.*, *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.

⁵⁰ Mesko, M. F. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.

⁵² Anton Paar GmbH, Multiwave 3000®, Microwave Sample Preparation System, Software Version v1.27-Synt, Graz, Austria, (2003).

⁷⁶ Bizzi, C. A. *et al.*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66 (2011) 394-398.

4.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas para a posterior determinação de F, Cl, Br e I

Para a MIC como método de referência, 500 mg de leite em pó integral foram decompostos utilizando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora. As condições utilizadas para este procedimento estão descritas em *Materiais e Métodos* (item 3.5.2 *Decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas*). Os resultados encontrados neste método foram utilizados como referência para F, Cl, Br e I na otimização das demais condições avaliadas por MIC. Cabe salientar que, a exatidão empregando a MIC foi avaliada, também, para determinação de F, Cl, Br e I pela decomposição de materiais de referência de leite em pó integral (NIST 8435) e de tecido de ostra (NIST 1566a). Os resultados obtidos para F por ISE e Cl, Br e I por ICP-MS após decomposição por MIC da amostra de leite em pó integral e dos materiais de referência estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC (5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) de leite em pó integral e dos materiais de referência. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$.

Analito	Leite em pó integral	NIST 8435		NIST 1566a	
		Valor de referência	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
F	< 12,7	0,17 ^a	< 12,7	240 ^a	241 \pm 9
Cl ^b	0,835 \pm 0,022	0,842 \pm 0,044	0,870 \pm 0,029	0,829 \pm 0,014	0,808 \pm 0,004
Br	8,34 \pm 0,19	20 \pm 10	20,8 \pm 0,4	-	62,0 \pm 4,5
I	3,13 \pm 0,15	2,30 \pm 0,40	2,28 \pm 0,19	4,46 \pm 0,42	5,00 \pm 0,21

^a Valor informado

^b Valores em porcentagem (%)

Como pode ser observado na Tabela 5, os resultados obtidos para o NIST 8435 e NIST 1566a não apresentam diferença significativa (teste *t-Student*) com os valores de referência. Assim, os resultados obtidos para halogênios em leite em pó integral após a decomposição por MIC com NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora foram usados como referência neste trabalho.

Os valores encontrados para F na amostra de leite em pó integral após a decomposição por MIC ficaram abaixo do LOQ por ISE. Em virtude disso, foi feita adição de analito na amostra de leite em pó integral, para que F pudesse ser quantificado por ISE. O procedimento adotado para a adição deste analito está descrito em *Materiais e Métodos (item 3.3 Amostras e materiais de referência)*. Assim, o valor usado como referência para F foi o obtido após a decomposição da amostra de leite em pó integral com adição de analito. O valor encontrado para F, após a adição de analito está mostrado a seguir, em *Apresentação e Discussão dos Resultados (item 4.3 Adição de F e metais na amostra de leite pó)*.

A determinação de halogênios foi feita, também, por IC, e os valores encontrados para Cl por IC e ICP-MS não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*). Para I, os resultados encontrados por IC ficaram abaixo limite de quantificação ($12 \mu\text{g g}^{-1}$).

A determinação de Br por IC não foi possível devido às interferências, mesmo utilizando as condições recomendadas pelo fabricante. Além disso, os resultados não foram reprodutíveis, sendo que, em alguns casos, o sinal cromatográfico saiu dividido, não sendo possível a integração do mesmo. Na Figura 2 é representado o cromatograma obtido para a determinação de Br na amostra de leite em pó integral utilizada para as otimizações neste trabalho.

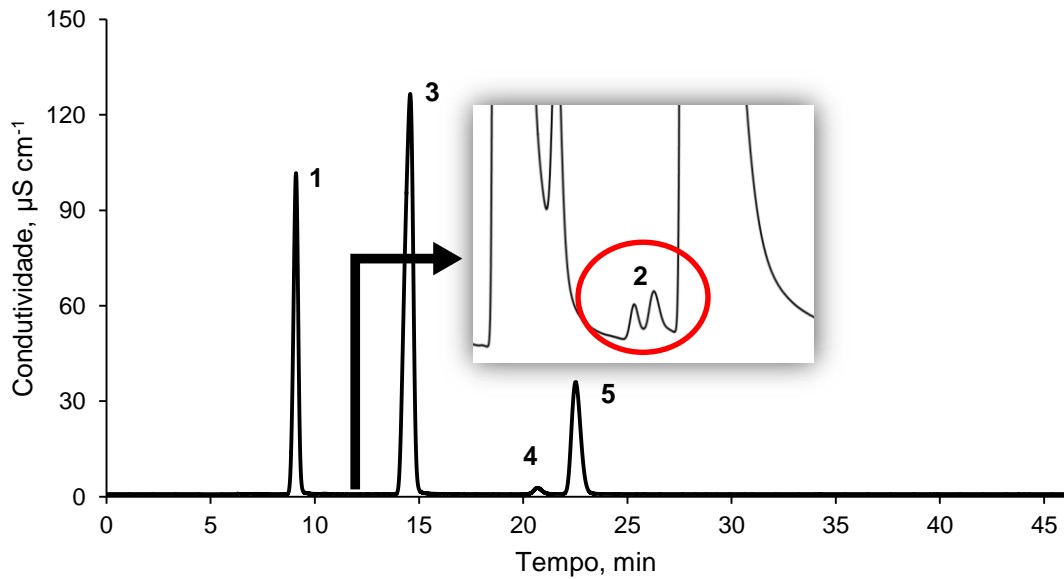


Figura 2. Cromatograma obtido após a decomposição por MIC (500 mg de material de referência NIST 8435, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) da amostra de leite em pó integral, onde 1: Cl^- , 2: Br^- , 3: NO_3^- ; 4: PO_4^{3-} e 5: SO_4^{2-} .

Como pode ser observado na Figura 2, para a amostra de leite em pó integral, o sinal cromatográfico para Br saiu dividido, diferentemente do que acontece com a solução de referência. A integração da área de qualquer um dos sinais cromatográficos (sinal com ou sem divisão) não reproduz o valor obtido para Br por ICP-MS. A concordância entre os valores para Br obtidos por IC e ICP-MS ficou menor que 50%. O mesmo comportamento pode ser observado para os digeridos por MIC, nas mesmas condições, do material de referência de leite em pó integral (NIST 8435), mostrado nos cromatogramas da Figura 3.

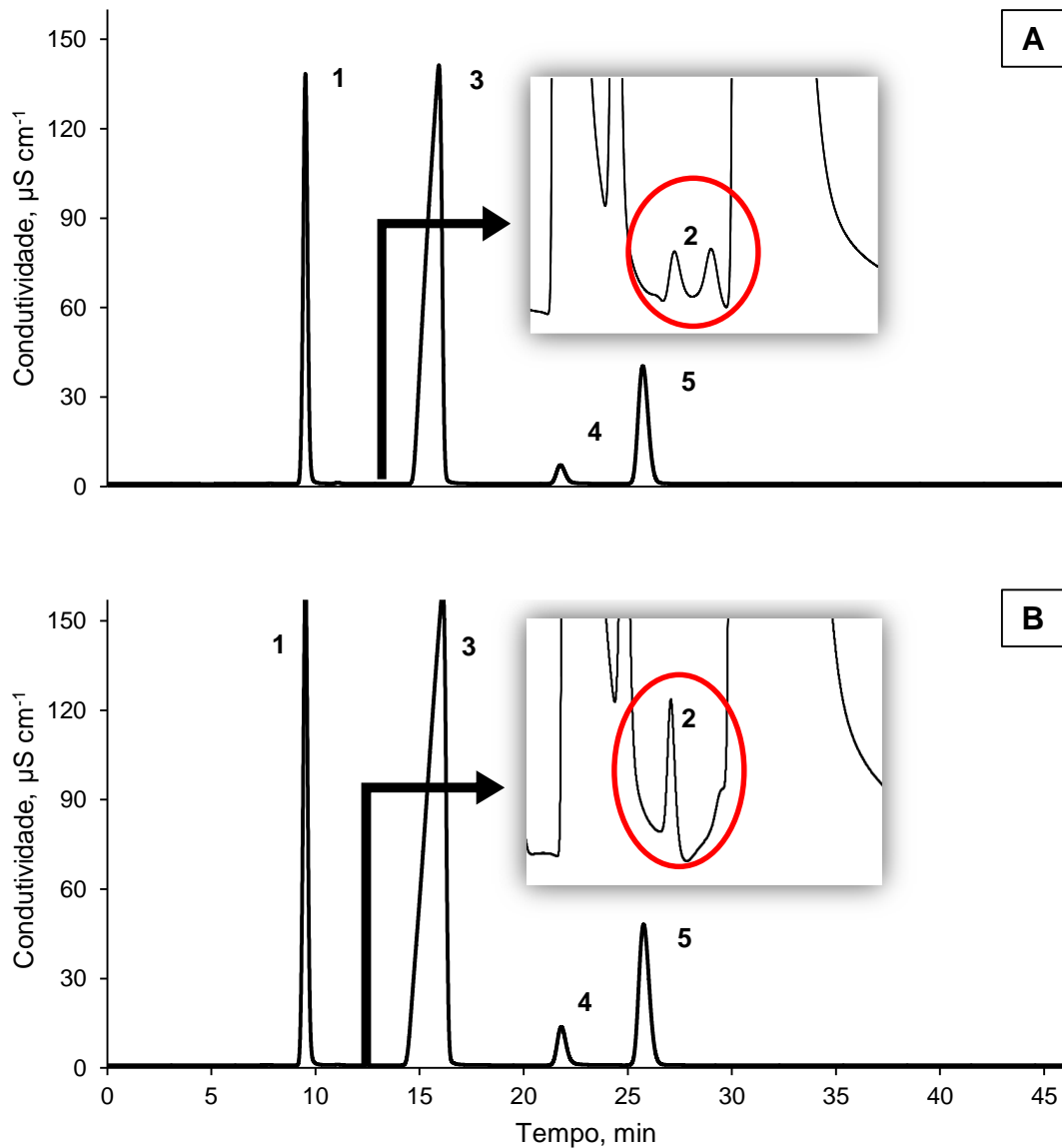


Figura 3. Cromatogramas obtido após a decomposição por MIC (300 mg de amostra, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) do RM de leite em pó integral NIST 8435 em que A: Replicata 1 e B: Replicata 2. Identificação dos sinais cromatográficos: 1: Cl^- , 2: Br^- , 3: NO_3^- , 4: PO_4^{3-} e 5: SO_4^{2-} .

A Figura 3 mostra os dois cromatogramas obtidos para as replicatas da decomposição do NIST 8435, indicando que não há reprodutibilidade nos resultados, bem como a presença de sinais cromatográficos divididos. Além disso, para o cromatograma em que o perfil do sinal saiu com o perfil sem divisão, os valores apresentam concordância de aproximadamente 40% com aqueles obtidos por

ICP-MS. Adicionalmente, foi feito um ensaio de recuperação, no qual foi adicionado $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Br⁻, no digerido obtido (diluído duas vezes) após a decomposição do material de referência NIST 8435 por MIC. Os valores encontrados indicaram uma recuperação de Br de 98,7% em relação ao valor obtido para Br por IC nos digeridos. Possivelmente, devido à alta concentração de Cl⁻ e NO₃⁻ nos digeridos, o sinal cromatográfico para o Br foi suprimido, gerando resultados menores do que os obtidos por ICP-MS.

4.2.2 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas para a posterior determinação de metais

No procedimento de MAWD, 500 mg de amostra de leite em pó integral foram decompostos utilizando HNO₃ concentrado. O procedimento utilizado está descrito em *Materiais e Métodos (item 3.5.1 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas)*. Cabe salientar que, os valores encontrados para os metais utilizando este método foram usados como referência na otimização das demais condições avaliadas no trabalho. A exatidão empregando MAWD para a posterior determinação de metais foi avaliada, também, pela decomposição de materiais de referência de leite em pó integral (NIST 8435) e tecido de ostra (NIST 1566a). Os resultados obtidos para metais por ICP-MS após decomposição por MAWD na amostra de leite em pó integral e nos materiais de referência estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados para Ag, Cd, Co, Pb, e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por F AAS após decomposição por MAWD (500 mg, 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹) de leite em pó integral e dos materiais de referência. Valores em µg g⁻¹, média ± desvio padrão, n=3.

Analito	Leite em pó integral	NIST 8435		NIST 1566a	
		Valor de referência	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
Ag	< 0,020	-	< 0,020	1,68 ± 0,15	1,70 ± 0,08
Cd	< 0,0004	0,0002 ^a	< 0,0004	4,15 ± 0,38	3,82 ± 0,14
Co	< 0,010	0,003 ^a	< 0,010	0,57 ± 0,11	0,476 ± 0,018
Pb	< 0,010	0,11 ± 0,05	0,073 ± 0,005	0,371 ± 0,014	0,342 ± 0,023
Sr	4,65 ± 0,13	4,35 ± 0,50	4,16 ± 0,15	11,1 ± 1,0	10,2 ± 0,4
Ca ^b	1,55 ± 0,04	0,922 ± 0,049	1,11 ± 0,15	0,196 ± 0,019	0,197 ± 0,012
K ^b	1,18 ± 0,04	1,363 ± 0,047	1,41 ± 0,01	0,790 ± 0,047	0,732 ± 0,036
Mg ^b	0,089 ± 0,001	0,0814 ± 0,0076	0,080 ± 0,005	0,118 ± 0,017	0,110 ± 0,009
Na ^b	0,365 ± 0,002	0,356 ± 0,040	0,359 ± 0,010	0,417 ± 0,013	0,395 ± 0,015

^a Valor informado.

^b Resultados em porcentagem.

Os resultados para metais nos materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a não apresentam diferença significativa (teste *t-Student*) em relação aos valores encontrados na decomposição por MAWD. Assim, os valores encontrados para metais utilizando a MAWD como método de preparo de amostra puderam ser usados como referência nas condições otimizadas neste trabalho.

Para a amostra de leite em pó integral, os valores para alguns metais, como Ag, Co, Cd, e Pb, estão abaixo do limite de quantificação por ICP-MS. Para estes casos, foi feita a adição de solução de referência empregando solução multielementar em uma faixa de concentração que os analitos pudessem ser determinados por ICP-MS (*Materiais e Métodos, item 3.3 Amostras e materiais de referência*).

4.3 ADIÇÃO DE F e METAIS EM LEITE EM PÓ INTEGRAL

De acordo com os resultados mostrados nas Tabela 5 e 6, as amostras de leite em pó possuem concentração de F abaixo do limite de quantificação obtido por ISE e baixas concentrações para a maior parte dos metais estudados. A fim de obter concentrações adequadas para o desenvolvimento do trabalho, foi feita a adição de F e metais na amostra de leite em pó integral. Para isso, foi adicionada à amostra, solubilizada em água, uma solução de F e metais, para que, após a decomposição por MIC, os digeridos apresentassem concentração que pudessem ser determinadas por ISE (F) e ICP-MS. O procedimento utilizado para o enriquecimento da amostra está descrito em *Materiais e Métodos (item 3.3 Amostras e materiais de referência)*. A amostra enriquecida com F e metais foi decomposta por MIC, usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} para determinação de F por ISE, e por MAWD, usando HNO_3 14,4 mol L^{-1} para a posterior determinação de metais. Os procedimentos utilizados para a MIC e para MAWD estão descritos nos *Materiais e Métodos (item 3.5.2 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas e item 3.5.2. Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas)*. Os resultados obtidos para F e metais na amostra de leite em pó integral enriquecida pode ser observada na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados para F por ISE após decomposição por MIC (500 mg de amostra, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) e metais por ICP-MS após decomposição por MAWD (500 mg de amostra, 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1}) de leite em pó integral enriquecida com F e metais. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$.

Analito	Amostra de leite em pó enriquecida com F e metais
F	101 \pm 4
Ag	0,427 \pm 0,011
Cd	0,451 \pm 0,024
Co	0,441 \pm 0,018
Pb	0,444 \pm 0,018
Sr	5,21 \pm 0,20

Conforme pode ser observado na Tabela 7, a adição de analito possibilitou a determinação de F por ISE e metais por ICP-MS. Além disso, pode ser observado que a adição desses elementos ocorreu de forma homogênea na amostra, devido aos baixos valores de RSDs encontrados na determinação de F e metais. Assim, a amostra enriquecida foi utilizada em todos os experimentos de otimização feitos neste trabalho, e estes valores foram usados como referência.

4.4 DETERMINAÇÃO DE F POR ISE

A determinação de F por ISE é convencionalmente feita usando curva de calibração em H_2O . Além disso, é adicionado TISAB a fim de ajustar as condições do meio, como força iônica e pH, para que amostras e padrões tenham o mesmo comportamento. Geralmente, as amostras estão em H_2O ou solução alcalina diluída. Entretanto, quando são utilizadas soluções de HNO_3 , pode haver a alteração da força iônica do meio, dificultando a ação do tampão TISAB, além do pH ser muito baixo, podendo prejudicar o tamponamento das soluções.

Assim, para a determinação de F por ISE, foi feita a avaliação da influência da presença de ácido nas curvas de calibração. Para isso, foram feitas curvas de

calibração em diferentes concentrações, equivalendo às soluções absorvedoras de HNO_3 1, 5, 10 mol L^{-1} e H_2O . As curvas de calibração obtidas estão mostradas na Figura 4.

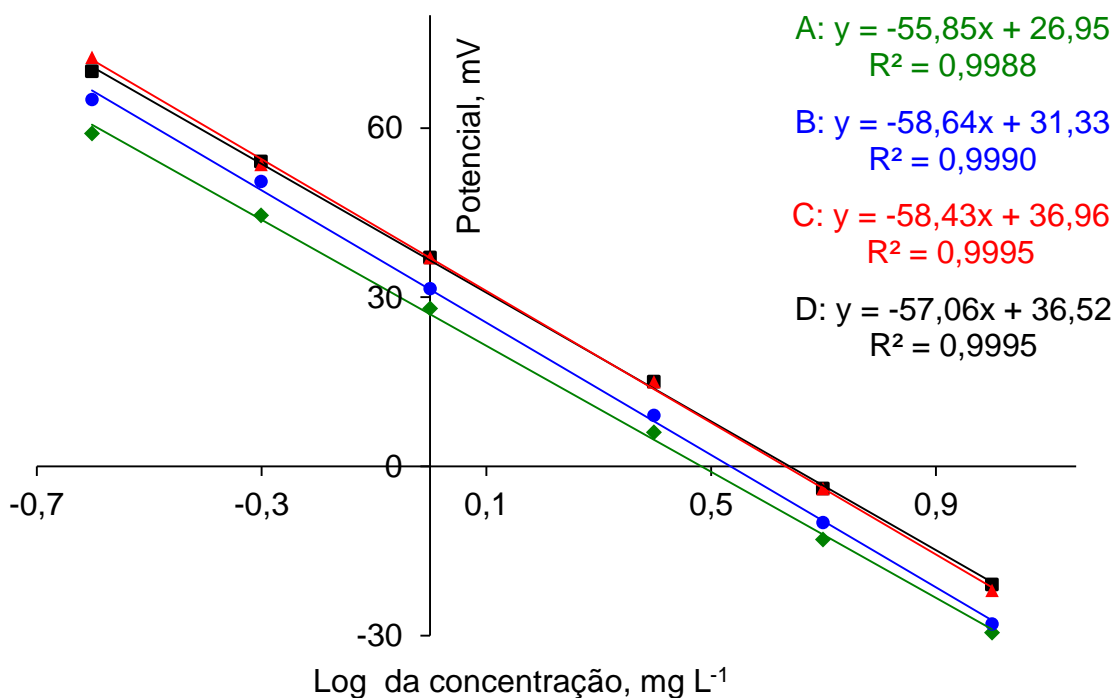


Figura 4. Curvas de calibração para F por ISE em solução ácida equivalente às soluções absorvedoras de \blacklozenge A: H_2O , \bullet B: HNO_3 1 mol L^{-1} , \blacktriangle C: HNO_3 5 mol L^{-1} e \blacksquare D: HNO_3 10 mol L^{-1} .

Como pode ser visto na Figura 4, há diferença entre as equações de reta da curva feita em solução aquosa para as curvas em solução ácida. Isto deve-se ao fato de que, quando as curvas de calibração são preparadas em meio ácido, a concentração de íons em solução é maior do que quando comparada com a calibração feita em H_2O , alterando a atividade dos íons, e conseqüentemente a diferença de potencial causada por estes na solução. Porém, pode se observar que não há diferença entre as curvas feitas em solução equivalente às soluções absorvedoras de HNO_3 5 e 10 mol L^{-1} . Neste caso, a diferença de concentração de íons em solução é apenas 2 vezes maior, diferentemente do que quando comparada com a curva de calibração com solução equivalente a HNO_3 1 mol L^{-1} , que a concentração é 5 vezes maior. Os valores obtidos para os digeridos empregando curvas de calibração de concentração equivalente a HNO_3 5 mol L^{-1} e

HNO₃ 10 mol L⁻¹, não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*). Os valores dos digeridos em solução absorvedora de HNO₃ 3 mol L⁻¹, determinados usando curva de calibração de concentração equivalente a 1 mol L⁻¹ foram concordantes com o valor de referência. Assim, pode ser observado que podem ser medidos, nas curvas preparadas em meio ácido, digeridos com soluções absorvedoras de concentrações de HNO₃ até 3 vezes maior do que a usada no preparo da curva de calibração. Dessa forma, optou-se por usar curvas de calibração soluções de três concentrações diferentes nas determinações por ISE: curva em H₂O para as amostras com soluções absorvedoras de H₂O e NH₄OH 25 mmol L⁻¹; curva em solução equivalente à solução absorvedora de HNO₃ 1 mol L⁻¹ para as amostras com soluções absorvedoras de HNO₃ 0,5, 1 e 3 mol L⁻¹ e curva em solução equivalente à solução absorvedora de HNO₃ 10 mol L⁻¹ para as amostras com soluções absorvedoras de HNO₃ 5, 10 e 14,4 mol L⁻¹.

4.5 DETERMINAÇÃO de Cl, Br e I POR ICP-MS

Para a determinação de Cl, Br e I por ICP-MS, foram feitos testes para verificar a possibilidade de empregar solução absorvedora ácida diretamente na determinação por ICP-MS. Para isso, foram avaliadas as curvas de calibração em HNO₃ 0,7 mol L⁻¹, que é a mesma condição utilizada para a determinação de metais. Além disso, foi feita a calibração em HNO₃ 0,7 mol L⁻¹ e entre os padrões e as amostras foi feita uma lavagem com NH₄OH 50 mmol L⁻¹ por aproximadamente 2 min. Esta última condição, empregando solução alcalina na etapa de lavagem, foi usada para tentar minimizar o possível efeito de memória que a solução ácida estaria causando na determinação de I.⁷⁷ A calibração foi feita também em solução de NH₄OH 10 mmol L⁻¹, que é a condição normalmente utilizada. As curvas de calibração para I estão mostradas na Figura 5. Cabe salientar que para a determinação de I (curva de calibração preparada em solução de NH₄OH 10 mmol L⁻¹), as amostras com solução absorvedora ácida foram diluídas e tiveram o pH ajustado para o mesmo utilizado na curva, a fim de manter iguais as condições de curva de calibração e solução (meio alcalino).

⁷⁷ Al-Ammar, A. et al., *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 370 (2001) 479-482.

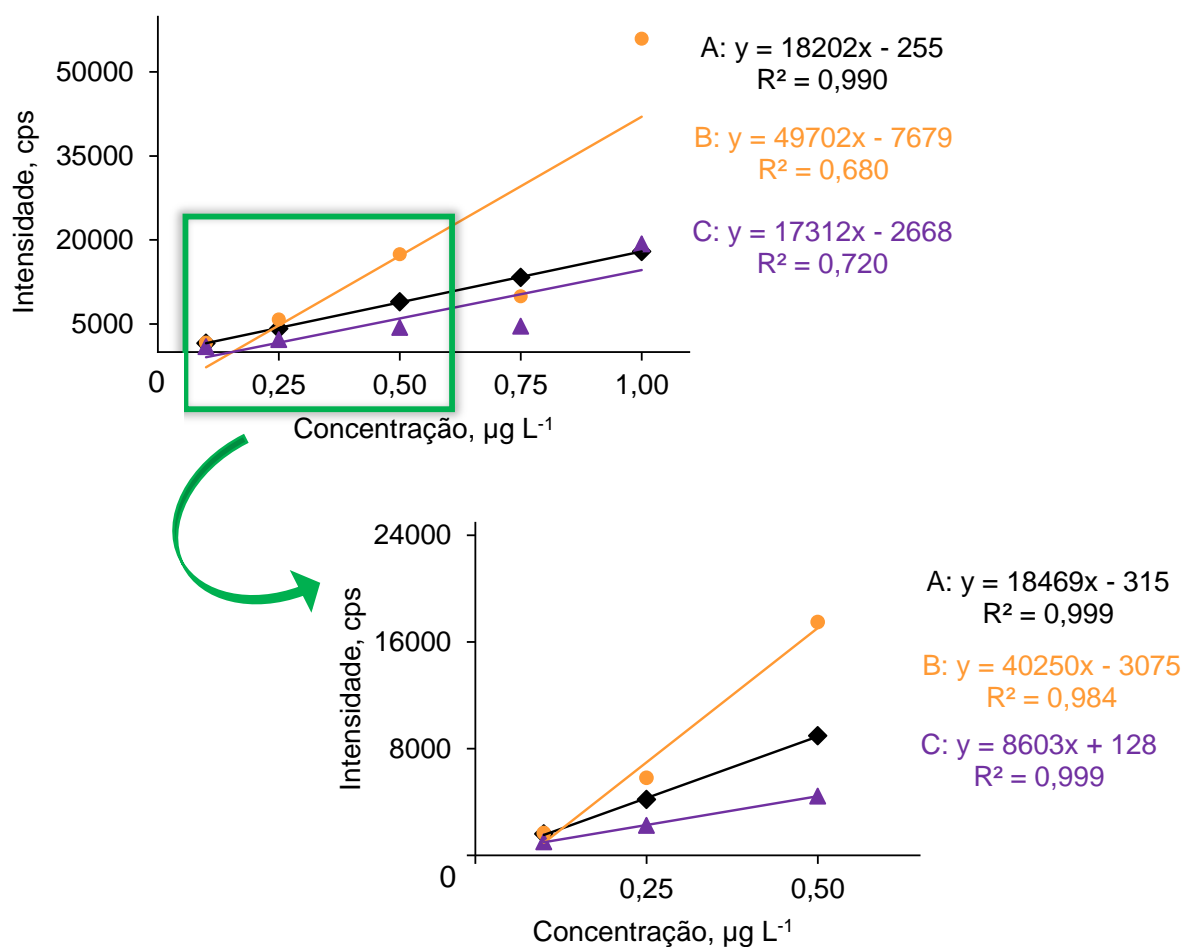


Figura 5. Curvas de calibração para I por ICP-MS em solução de \blacklozenge A: NH_4OH 10 mmol L^{-1} , \bullet B: HNO_3 0,7 mol L^{-1} e \blacktriangle C: HNO_3 0,7 mol L^{-1} após lavagem com NH_4OH 10 mmol L^{-1} .

O coeficiente de correlação linear ($R^2=0,680$) para a curva de calibração preparada em HNO_3 0,7 mol L^{-1} foi inferior ao encontrado na calibração empregando solução alcalina ($R^2=0,990$). Fazendo-se a etapa de lavagem com solução alcalina entre as determinações, a correlação continuou inferior ($R^2=0,720$) àquela encontrada para a curva de calibração em solução alcalina. Como pode ser observado na Figura 5, há uma maior dispersão nos valores obtidos para concentrações de iodo superiores a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, foi feita a calibração utilizando soluções de concentração de I de 0,1 a 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como pode ser visto, os coeficientes de correlação ficaram próximos ao obtido na calibração utilizando solução alcalina, nesta faixa de concentração. Os resultados encontrados para os

digeridos dos materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a, nas curvas de calibração de 0,1 a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados para I por ICP-MS após decomposição por MIC (300 mg, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora) nos materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n=3.

Condições	NIST 8435	NIST 1566a
Valor de Referência	2,30 \pm 0,40	4,46 \pm 0,42
A	2,56 \pm 0,12	4,21 \pm 0,12
B	1,18 \pm 0,21	1,83 \pm 0,06
C	6,00 \pm 0,99	8,62 \pm 0,44

A: Curva de calibração em NH_4OH 10 mmol L^{-1}

B: Curva de calibração em HNO_3 0,7 mol L^{-1}

C: Curva de calibração em HNO_3 0,7 mol L^{-1} lavando-se com NH_4OH 50 mmol L^{-1} entre as determinações

Os resultados para I utilizando curvas ácidas para calibração não foram concordantes com os valores de referência do NIST 8435 e do NIST 1566a. Utilizando curva de calibração em HNO_3 0,7 mol L^{-1} , as concordâncias ficaram próximas a 45% do valor de referência e utilizando curva de calibração em HNO_3 0,7 mol L^{-1} e fazendo a lavagem com NH_4OH 50 mmol L^{-1} entre as determinações, as concordâncias dos valores obtidos para I com os informados nos materiais de referência foram superiores a 200%. Cabe salientar que, iodo na presença de solução ácida é volatilizado, conseqüentemente possui maior efeito de memória, sendo que este pode ficar tanto nos capilares quanto na câmara de nebulização.⁷⁷

As curvas de calibração preparadas em solução ácida para Cl e Br estão mostradas nos gráficos da Figura 6. Assim como para I, foram feitas curvas de calibração para Cl e Br em HNO_3 0,7 mol L^{-1} , em HNO_3 0,7 mol L^{-1} e lavagem com NH_4OH 50 mmol L^{-1} entre as determinações e em solução de NH_4OH 10 mmol L^{-1} . Cabe salientar que, para a determinação de Br e I empregando curva feita em solução de NH_4OH 10 mmol L^{-1} , as amostras com solução absorvedora ácida foram

⁷⁷ Al-Ammar, A. et al., *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 370 (2001) 479-482.

diluídas e tiveram o pH ajustado para o mesmo utilizado na curva, a fim de manter as condições de curva de calibração e solução nas mesmas condições (meio alcalino).

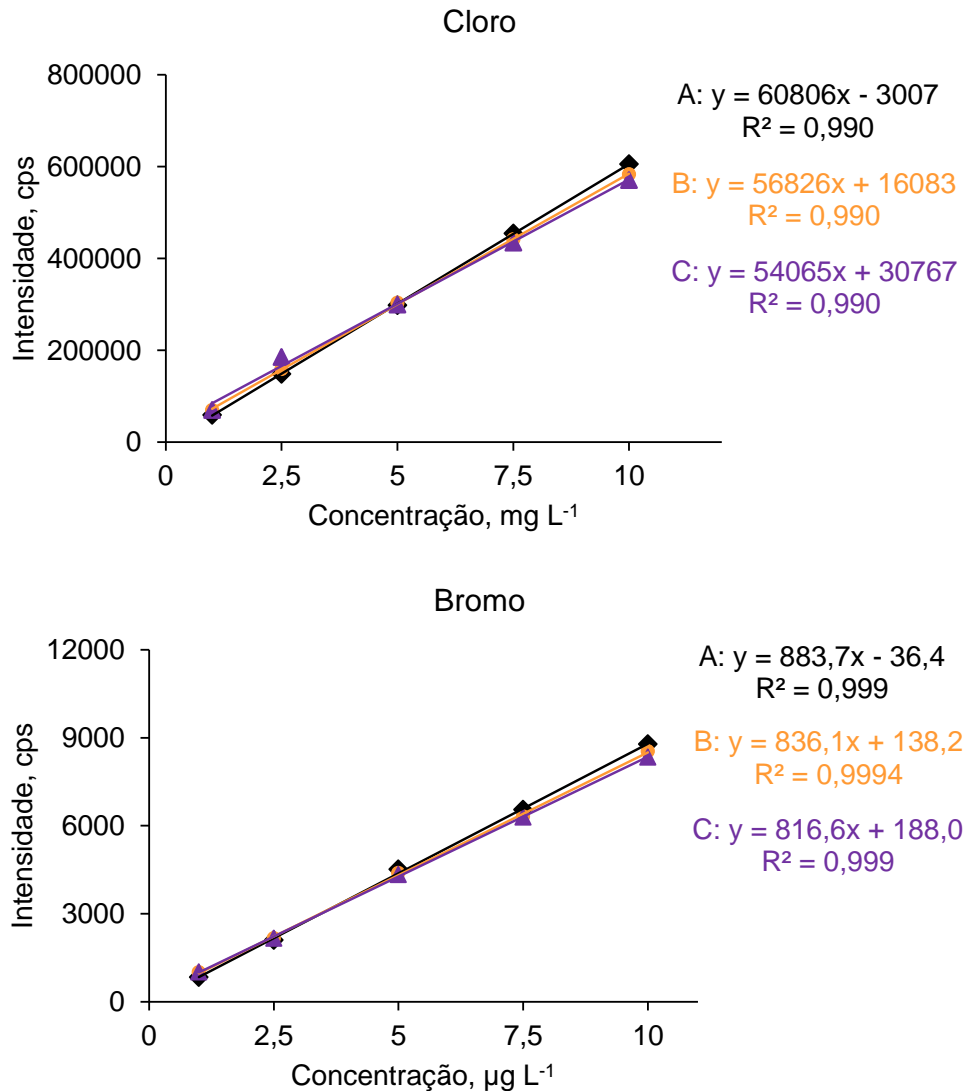


Figura 6. Curvas de calibração para Cl e Br por ICP-MS em solução de \blacklozenge A: NH_4OH 10 mmol L⁻¹, \bullet B: HNO_3 0,7 mol L⁻¹ e \blacktriangle C: HNO_3 0,7 mol L⁻¹ após lavagem com NH_4OH 10 mmol L⁻¹.

Conforme pode ser observado na Figura 6, as curvas de calibração para Cl e Br apresentaram coeficientes de correlação próximos de 1, além de possuírem pouca diferença na inclinação das retas, nas três condições estudadas. Os valores

encontrados para determinação de Cl e Br nos materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a nas três condições estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados para Cl e Br por ICP-MS após decomposição por MIC (300 mg, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora) nos materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$.

Condições	NIST 8435		NIST 1566a	
	Cl ^a	Br	Cl ^a	Br
Valor de Referência	0,842 \pm 0,044	20 \pm 10	0,829 \pm 0,014	-
A	0,810 \pm 0,015	22,1 \pm 2,8	0,795 \pm 0,017	61,4 \pm 0,2
B	0,823 \pm 0,021	24,4 \pm 3,6	0,805 \pm 0,015	60,9 \pm 5,5
C	0,804 \pm 0,028	24,2 \pm 4,3	0,800 \pm 0,020	61,5 \pm 2,1

^a Valores em porcentagem (%)

A: Curva de calibração em NH_4OH 10 mmol L^{-1}

B: Curva de calibração em HNO_3 0,7 mol L^{-1}

C: Curva de calibração em HNO_3 0,7 mol L^{-1} lavando-se com NH_4OH 50 mmol L^{-1} entre as determinações

Os valores obtidos para os materiais de referência nas diferentes condições de curva de calibração (NH_4OH 10 mmol L^{-1} , HNO_3 0,7 mol L^{-1} e HNO_3 0,7 mol L^{-1} lavando com NH_4OH 50 mmol L^{-1}) não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*). Assim, a determinação de Cl e Br nas amostras de soluções ácidas pode ser feita empregando curvas de calibração em meio ácido.

Assim, como a determinação de I não foi possível de ser conduzida empregando solução ácida, optou-se por fazer a determinação de Cl, Br e I por ICP-MS (nas soluções obtidas por MIC) usando a curva de calibração em meio alcalino (NH_4OH 10 mmol L^{-1}). Para isso, os digeridos foram diluídos e tiveram o pH ajustado para o mesmo da curva de calibração (pH 10). Os resultados obtidos para Cl, Br e I nestas condições apresentaram concordâncias de 96, 105 e 113% para Cl, Br e I, respectivamente com os valores informados no NIST 8435. Já para o NIST 1566a, as concordâncias foram de 96 e 94% para Cl e I, respectivamente. Cabe salientar que o NIST 1566a não informa valor de referência para Br.

4.6 COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE METAIS E HALOGÊNIO USANDO SOLUÇÃO ABSORVEDORA ÚNICA

4.6.1 Avaliação da massa de amostra

Foi feito um estudo para avaliar a massa máxima de amostra que poderia ser decomposta por MIC, sem oferecer riscos operacionais e alterar condições seguras de pressão de oxigênio utilizada normalmente (20 bar). As condições iniciais foram baseadas em estudos prévios utilizando a MIC para decomposição de materiais biológicos.^{37,47} Dessa forma, foi avaliada a combustão de leite em pó integral, utilizando-se massas de 500, 600, 700 e 800 mg. Os resultados obtidos para as pressões observadas em função da massa de amostra estão mostrados no gráfico da Figura 7.

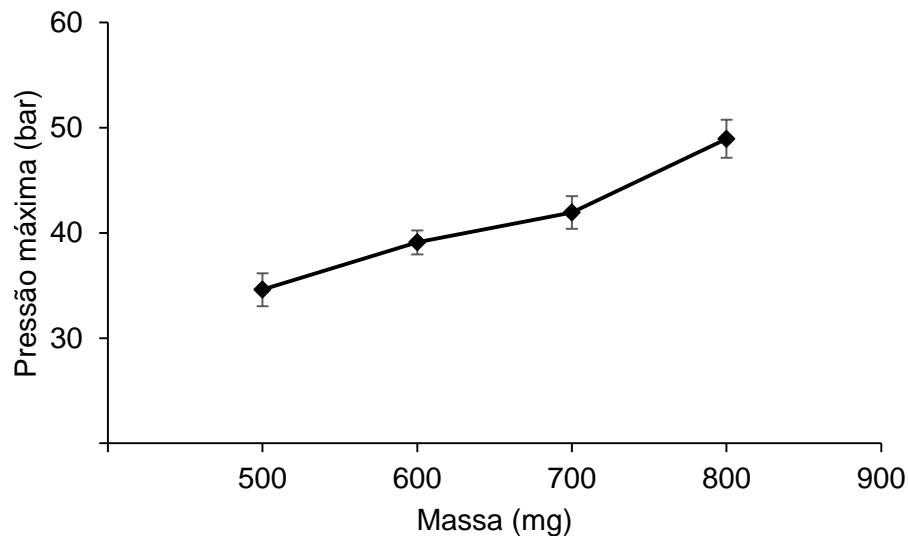


Figura 7. Pressão máxima atingida no sistema em função da massa de leite em pó integral utilizada na decomposição por MIC.

³⁷ Barbosa, J. T. P. *et al.*, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.

⁴⁷ Barin, J. S. *et al.*, *Microwave-induced combustion*, E. M. M. Flores (Ed.) *Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 143-177.

Como pode ser observado na Figura 7, para 800 mg de amostra, a pressão máxima atingida foi superior a 48 bar, o que significa um incremento de mais de 28 bar na pressão inicial de oxigênio. Tendo em vista que a pressão limite operacional do sistema é 80 bar, a pressão atingida representa mais que 50% desse valor. Como segurança, massas de amostra maiores não foram testadas. A combustão de 800 mg de leite em pó integral apresentou resíduos de amostra não decomposta, evidenciando a queima incompleta dessa.

A queima de 500, 600 e 700 mg de amostra não apresentou resíduos e as soluções obtidas foram límpidas. As soluções obtidas após a MIC de 500, 600 e 700 mg de leite em pó integral foram avaliadas quanto ao teor de carbono em solução e os valores encontrados foram menores que 25 mg L⁻¹. Os valores encontrados são relativamente baixos e minimizam as interferências causadas por alto teor de carbono em solução na determinação por ICP-MS.²¹

A partir destes resultados, foi possível considerar que massas até 700 mg de leite em pó podem ser decompostas utilizando pressão inicial de oxigênio de 20 bar. Entretanto, apenas durante a avaliação da solução absorvedora e o do tempo de refluxo deste trabalho, foram empregados 300 mg de amostra, a fim de garantir uma maior reprodutibilidade das queimas e menor desgaste de equipamentos e materiais utilizados.

4.6.2 Avaliação da solução absorvedora

Com o objetivo de encontrar a solução absorvedora adequada para a absorção tanto de metais quanto de halogênios, foram feitos ensaios utilizando soluções de diferentes concentrações ácidas. Os valores encontrados na avaliação da solução absorvedora foram comparados com os valores de referência obtidos por MIC com solução absorvedora de NH₄OH 25 mmol L⁻¹ para halogênios e MAWD utilizando HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ para metais. As condições operacionais estão mostradas em *Materiais e Métodos (item 3.5.2 Combustão iniciada por micro-ondas)*.

²¹ Grindlay, G. et al., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

As soluções absorvedoras avaliadas neste estudo foram: H₂O e HNO₃ 0,5, 1, 3, 5, 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹. Cabe salientar que, todos os experimentos foram feitos nas mesmas condições, utilizando 300 mg de leite em pó integral e 6 mL de solução absorvedora. Os resultados obtidos para F por ISE, e Cl, Br e I por ICP-MS, nas diferentes soluções absorvedoras, estão mostrados nos gráficos da Figura 8. A linha tracejada representa o valor obtido como referência (MIC usando NH₄OH 25 mmol L⁻¹ como solução absorvedora), considerado como 100%, e as barras representam as concordâncias dos valores encontrados nas diferentes soluções absorvedoras com o valor de referência.

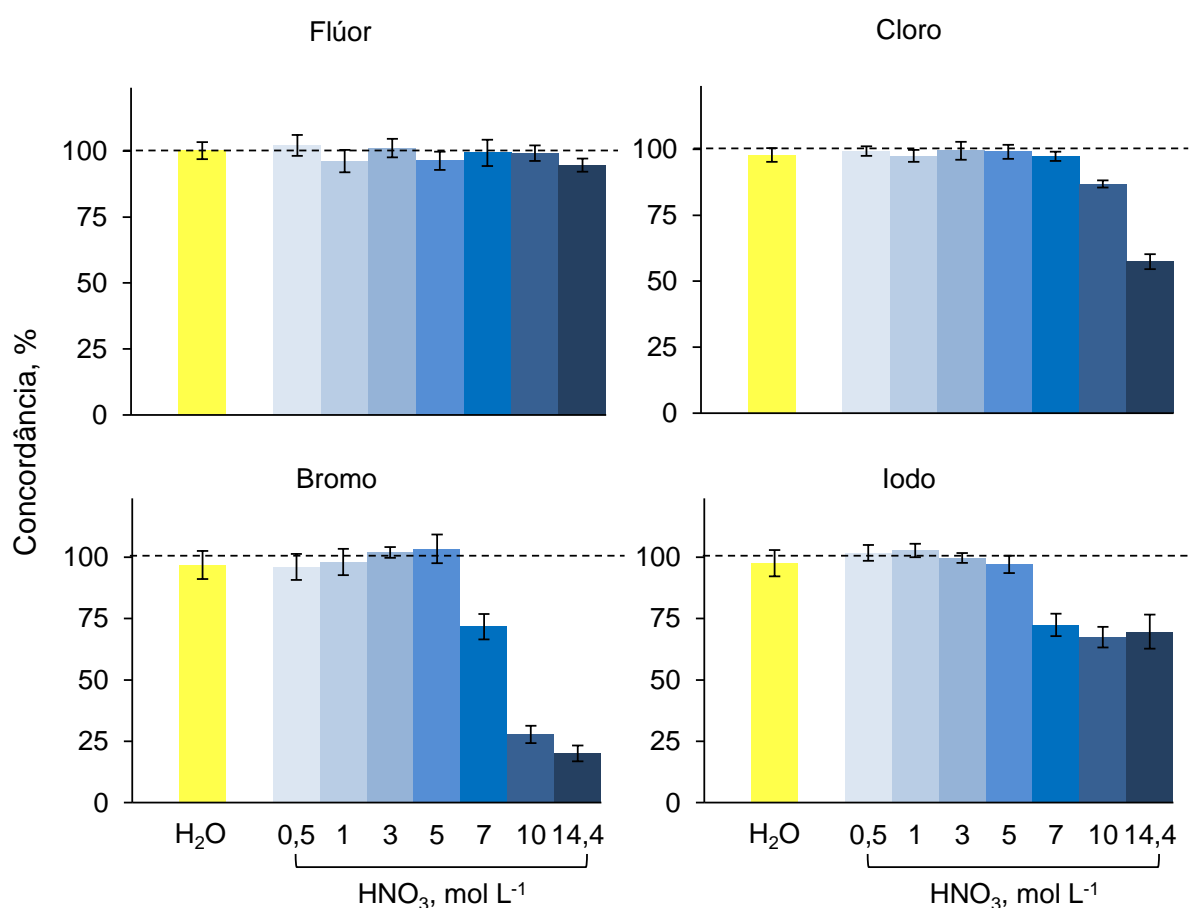


Figura 8. Concordância em relação ao valor de referência para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de solução absorvedora, 5 min de refluxo) usando diferentes soluções absorvedoras (média \pm desvio padrão, n=3).

Para F, os valores obtidos não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*) em relação ao valor de referência obtido pela decomposição da

amostra de leite em pó integral por MIC usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora, mesmo na condição usando HNO_3 concentrado como solução absorvedora. Já para Cl, usando-se soluções absorvedoras de HNO_3 $0,5$ a 7 mol L^{-1} , os valores não apresentam diferença significativa com o valor de referência. Entretanto, em soluções absorvedoras mais ácidas, de HNO_3 10 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$, as concordâncias caem significativamente.

Para Br e I, os valores encontrados para as soluções absorvedoras desde H_2O até HNO_3 5 mol L^{-1} , não apresentam diferença significativa com o valor de referência. Já para as soluções com concentrações ácidas mais elevadas (HNO_3 7 , 10 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$), as concordâncias foram menores, sendo que para Br as perdas foram maiores que para I, chegando próximas a 80% na solução de HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$, enquanto que para I, nas mesmas condições, as perdas foram de aproximadamente 30% .

Maiores perdas de Cl, Br e I, quando soluções ácidas de maior concentração são empregadas (superiores a HNO_3 5 mol L^{-1}), podem ser explicadas pela maior formação dos respectivos ácidos, HCl, HBr e HI, os quais são mais facilmente perdidos por volatilização.^{1,78} Para F, não foram observadas perdas significativas em nenhuma das soluções absorvedoras avaliadas (HNO_3 $0,5$ a $14,4 \text{ mol L}^{-1}$). A maior estabilidade do F em solução ácida, quando comparada com os outros halogênios, pode ser explicada pela maior estabilidade do seu respectivo ácido em solução. Na molécula de HF, há a formação ligações de hidrogênio, o que faz o ponto de ebulição do ácido seja maior, conseqüentemente, aumentando a estabilidade do analito em solução.

Com relação a Cl, Br e I, o respectivo ácido mais volátil é o HCl, seguido do HBr e HI. Assim, seria mais fácil de observar perdas para Cl do que para Br e I, o que não é mostrado na Figura 8. Entretanto, a concentração de Cl na amostra estudada é alta (cerca de mil vezes maior que a de Br e I), podendo não ser observadas perdas tão significativas quanto para Br e I.

¹ Mello, P. A. et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.

⁷⁸ Fecher, P. A. et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 1021-1027.

Em relação à determinação de halogênios após a decomposição por MIC empregando soluções absorvedoras ácidas, podemos observar que, quando soluções absorvedoras até a concentração de HNO_3 5 mol L^{-1} são empregadas, não são observadas perdas significativas (teste *t-Student*) para todos os halogênios estudados, na amostra de leite em pó integral.

As mesmas soluções absorvedoras foram avaliadas também quanto a concentração de metais. Os resultados obtidos para Ag, Cd, Co, Pb e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por F AAS, estão mostrados nas Figura 9 e Figura 10, respectivamente. A linha tracejada representa o valor obtido como referência (MAWD usando HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$) e as barras representam as concordâncias dos valores encontrados nas diferentes soluções absorvedoras com o valor de referência.

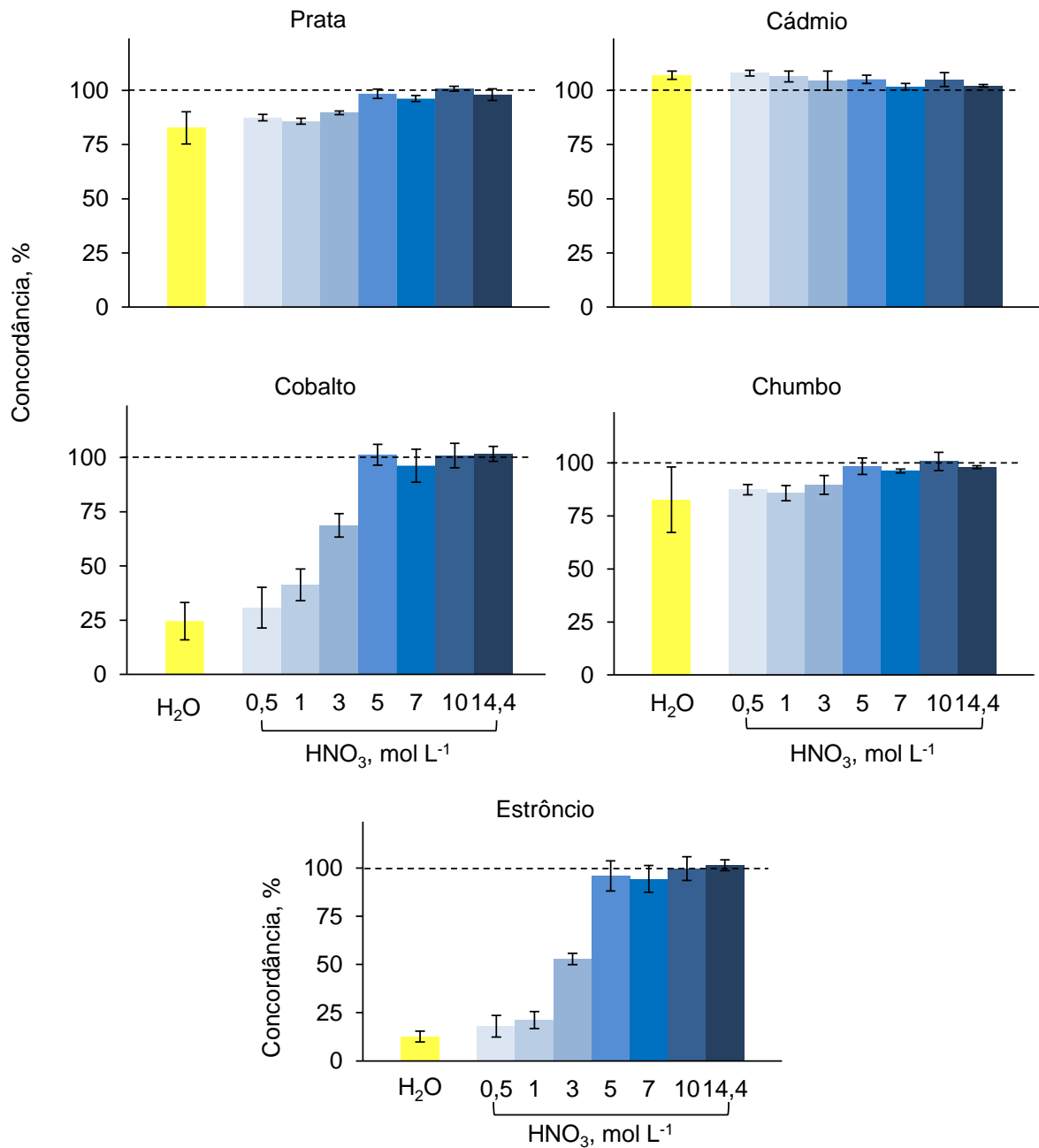


Figura 9. Concordância em relação ao valor de referência para Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS), após decomposição por MIC (300 mg de leite em pó integral, 6 mL de solução absorvedora, 5 min de refluxo) usando diferentes soluções absorvedoras (média \pm desvio padrão, n=3).

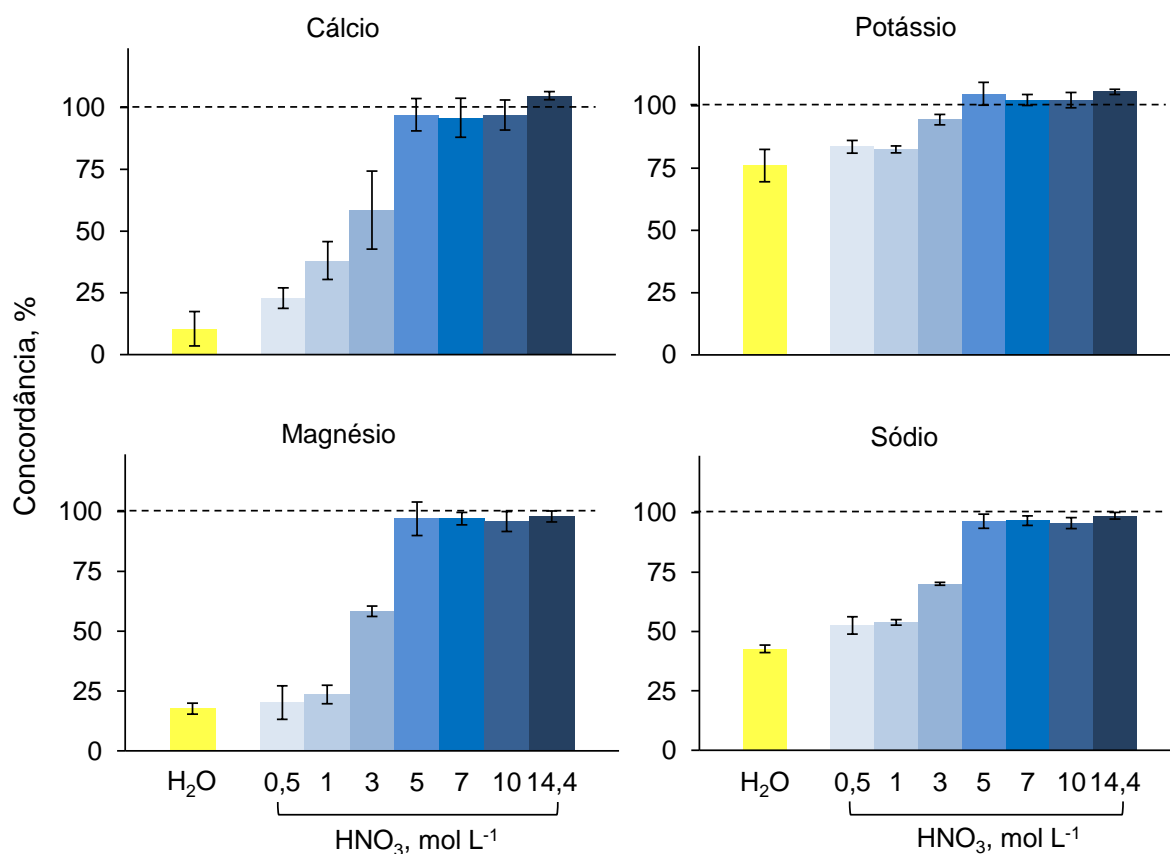


Figura 10. Concordância em relação ao valor de referência para Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (300 mg de leite em pó integral, 6 mL de solução absorvedora, 5 min de refluxo) usando diferentes soluções absorvedoras (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Os resultados para Cd, em todas as soluções absorvedoras avaliadas não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*) em relação ao valor de referência, obtido por MAWD. Resultados semelhantes foram obtidos para Pb, com exceção do ensaio em que H₂O foi usada como solução absorvedora, onde os resultados apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*) em relação ao valor de referência (MAWD). Para os outros metais (Ag, Co e Sr) as soluções ácidas mais diluídas (concentrações de HNO₃ menores que 5 mol L⁻¹) não foram adequadas para a recuperação destes elementos. Os resultados encontrados para Ag, Co e Sr nas soluções absorvedoras de HNO₃ 5, 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹ não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*) com o valor de referência (MAWD), sendo que a concentração destes decresce significativamente com a diminuição da concentração ácida.

Como pode ser observado, para Ca, Mg e Na, assim como a maior parte dos outros metais estudados no presente trabalho, para as soluções com concentrações de HNO₃ superiores a 5 mol L⁻¹, os resultados não apresentam diferença significativa com o valor de referência (MAWD). A concordância dos valores encontrados para as soluções mais diluídas (HNO₃ 0,5, 1 e 3 mol L⁻¹ e H₂O), em relação ao valores de referência foram menores que 50% para os três analitos.

Para K, os resultados não apresentaram diferença significativa para as soluções absorvedoras com concentrações de HNO₃ superiores a 3 mol L⁻¹, decrescendo para as soluções absorvedoras com menor concentração. Pode se observar também que, para K, as perdas em soluções de concentrações menores de HNO₃ (0,5 e 1 mol L⁻¹) e H₂O são menores do que as perdas para Ca, Mg e Na, nas mesmas condições.

Tendo em vista a absorção simultânea de metais e halogênios em uma solução única para a posterior determinação por ICP-MS, foi necessária a escolha da solução absorvedora em que não fossem observadas perdas de halogênios e ao mesmo tempo, fossem recuperados quantitativamente todos os metais estudados. Assim, pelos resultados obtidos, HNO₃ 5 mol L⁻¹ foi a condição escolhida para os demais experimentos.

4.6.3 Avaliação do tempo de refluxo

Após a escolha da solução absorvedora, foi avaliado o tempo de irradiação com micro-ondas. Para isso, foram utilizados 300 mg de leite em pó integral enriquecida com F e metais e, como solução absorvedora, HNO₃ 5 mol L⁻¹. O programa de irradiação usado foi o mesmo descrito em *Materiais e Métodos* (3.5.2 *Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas*), variando-se apenas o tempo de irradiação. Os tempos avaliados foram de 5, 10 e 15 min. Cabe salientar que, tempos menores de irradiação não foram avaliados pois estas condições já foram estabelecidas em trabalhos anteriores.^{11,37,49} Os resultados obtidos para F por ISE, e Cl, Br e I por ICP-MS estão mostrados na Figura 11. A linha tracejada

¹¹ Picoloto, R. S. et al., *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

³⁷ Barbosa, J. T. P. et al., *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.

⁴⁹ Silva, S. V. et al., *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.

representa o valor obtido como referência (MIC usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} e 5 min de refluxo) e as barras representam as concordâncias dos valores encontrados nos diferentes tempos de refluxo com o valor de referência.

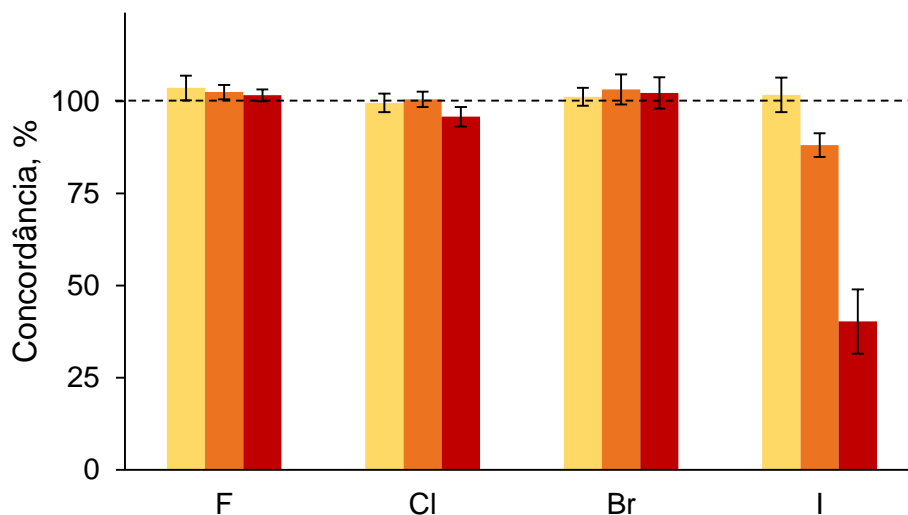


Figura 11. Concordância em relação ao valor de referência para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora), usando 5 min, 10 min e 15 min de irradiação (média \pm desvio padrão, $n=3$).

De acordo com a Figura 11, pode ser observado que, quando tempos maiores de irradiação são aplicados (10 e 15 min), para F, Cl e Br os resultados não apresentaram diferença significativa comparado com o valor obtido como referência (teste *t-Student*). Entretanto, para I, perdas significativas são observadas quando os tempos maiores de irradiação são aplicados, possivelmente devido ao fato de temperaturas maiores serem alcançadas (aproximadamente 200 °C com 7 min de irradiação). Provavelmente, este fator pode ter contribuído para possíveis perdas de I por volatilização, resultando em perdas de até 60% quando 15 min de irradiação foram aplicados.

As soluções avaliadas para halogênios usando diferentes tempos de irradiação foram também estudadas para os demais analitos. Os resultados obtidos para Ag, Cd, Co, Pb e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por F AAS estão mostrados nas Figura 12 Figura 13, respectivamente. A linha tracejada representa o valor obtido como referência (MWAD usando HNO_3 14,4 mol L^{-1}) e as barras representam

as concordâncias dos valores encontrados nos diferentes tempos de refluxo, com os valores de referência.

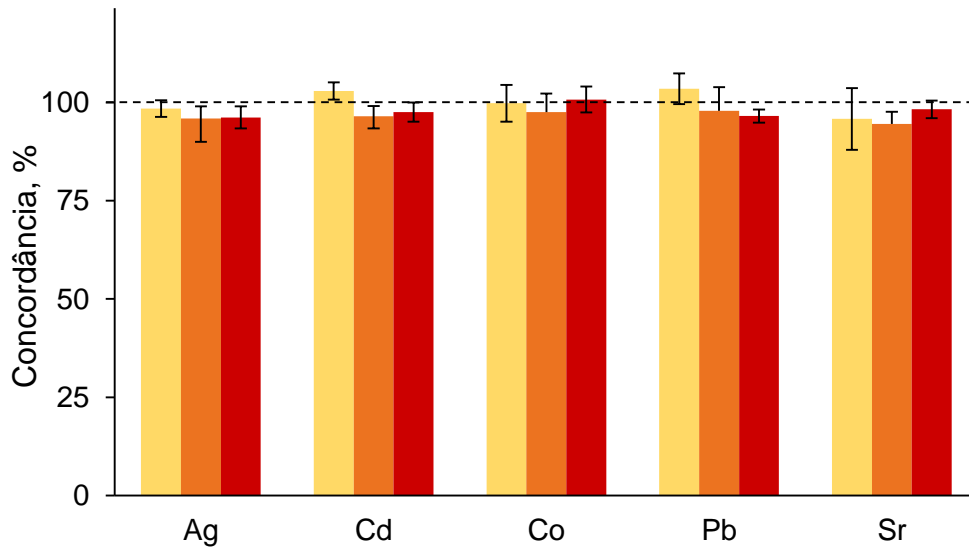


Figura 12. Concordância em relação ao valor de referência para Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) após decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora), usando 5 min, 10 min e 15 min de irradiação (média \pm desvio padrão, $n=3$).

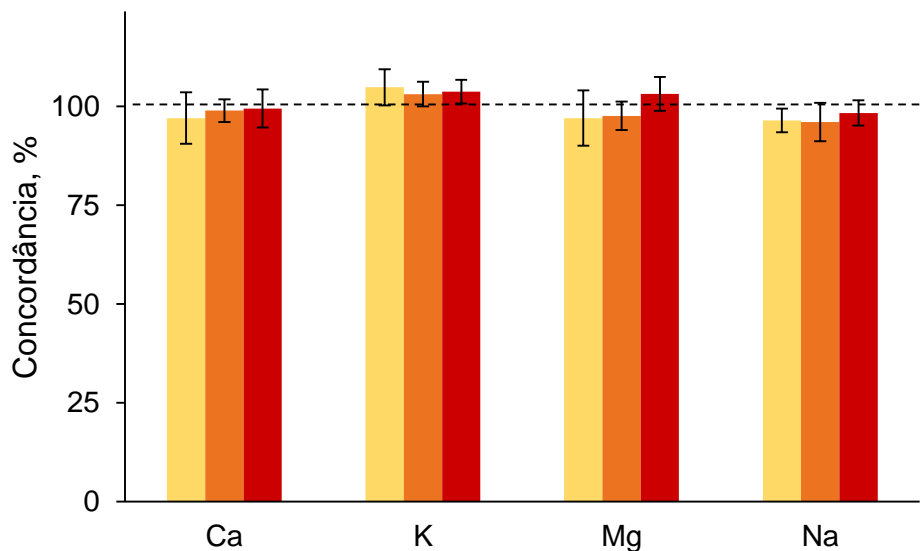


Figura 13. Concordância em relação ao valor de referência para Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (300 mg de leite em pó integral, 6 mL de HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora), usando 5 min, 10 min e 15 min de irradiação (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Como pode ser observado nas Figura 12 e Figura 13, não foram observadas diferenças significativas (teste *t-Student*) entre os resultados obtidos em diferentes tempos de irradiação (5, 10 e 15 min) com os valores de referência. Em alguns casos, um tempo de irradiação maior que 5 min fez com que os RSDs fossem diminuídos. Entretanto, esta diferença não foi significativa entre os resultados. Sendo assim, a MIC usando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora e tempo de irradiação de 5 min foi considerado adequado para a posterior determinação de todos os analitos.

4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE F, Cl, Br e I EM MEIO ÁCIDO

Alguns trabalhos relatam perdas de halogênios durante o preparo de amostra, dependendo da matriz, da concentração do analito e da sua forma, principalmente quando são utilizados ácidos concentrados na etapa de decomposição.^{18,35,79} Neste trabalho, usando MIC com solução absorvedora de HNO_3 5 mol L^{-1} ou mais diluídas estas perdas não foram observadas. Foi feito um estudo complementar a fim de avaliar a estabilidade desses halogênios nesta solução ácida até 15 dias de estocagem. As soluções obtidas da decomposição de leite em pó integral após MIC usando como solução absorvedora HNO_3 5 mol L^{-1} foram armazenados em frascos de polipropileno a 4 °C por um período de 0 a 15 dias. Flúor foi determinado por ISE, Cl, Br e I foram determinados por ICP-MS e os resultados obtidos no mesmo dia da decomposição foram considerados como dia 0. Os resultados obtidos na avaliação da estabilidade para os halogênios estão mostrados na Figura 14. A linha contínua representa a média e as linhas tracejadas a média com o desvio padrão superior e inferior do valor usado como referência obtido por MIC usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora.

¹⁸ Knapp, G. *et al.*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 (1998) 508-513.

³⁵ Gelinas, Y. *et al.*, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 1021-1025.

⁷⁹ Gokmen, I. G. *et al.*, *Analyst* 120 (1995) 2005-2008.

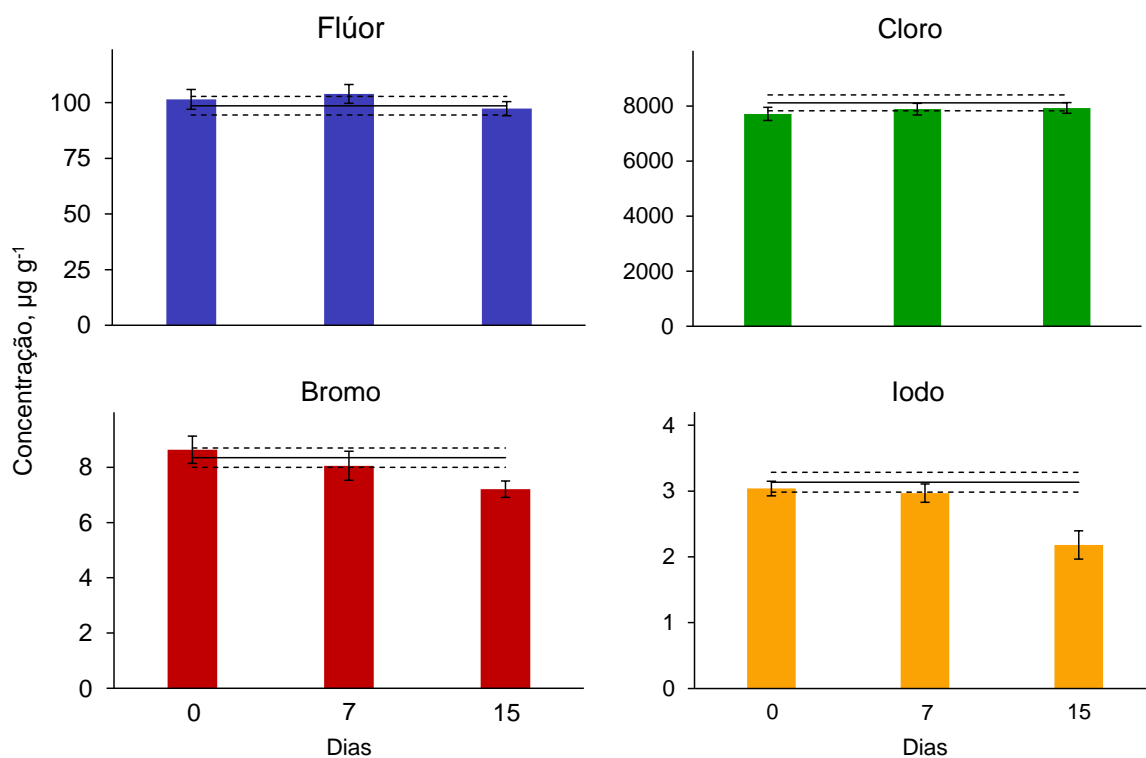


Figura 14. Resultados obtidos para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após a decomposição por MIC (300 mg de amostra de leite em pó integral, 6 mL de HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora, 5 min de refluxo) em 0, 7 e 15 dias de estocagem (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Como pode ser observado na Figura 14, os resultados para F e Cl, até 15 dias de estocagem, não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*) com os valores obtidos no primeiro dia das determinações. Cabe salientar que se ocorresse perdas para Cl, seriam mais difíceis de visualizar devida a elevada concentração de Cl nas amostras.

Para Br, como pode ser observado na Figura 14, os valores obtidos não apresentam diferença significativa (teste *t-Student*) em relação ao valor de referência, até sete dias de estocagem. Para I, assim como para Br, os valores obtidos não apresentam perdas significativas (teste *t-Student*), em até sete dias de estocagem.

Assim, para a determinação simultânea de F, Cl, Br e I, as soluções podem permanecer estocadas por até 7 dias, para evitar que sejam observadas perdas para Br e I, quando HNO_3 5 mol L^{-1} é utilizado como solução absorvedora.

4.8 AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO E APLICAÇÃO PARA MATERIAIS BIOLÓGICOS

Após a otimização das condições para a MIC, foi feita a determinação de halogênios e metais para diferentes materiais biológicos (fígado bovino e crustáceos). Os resultados para F (ISE) e Cl, Br I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados para F (ISE) e Cl, Br I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (500 mg, 5 min de refluxo, HNO₃ 5 mol L⁻¹ como solução absorvedora) de materiais biológicos. Valores em µg g⁻¹, média ± desvio padrão, n=3.

Analito	Fígado bovino	Camarão (<i>Penaeus subtilis</i>)	Corrupto (<i>Callichirus major</i>)
F	< 8,9	26,1 ± 1,0	30,9 ± 0,7
Cl	2572 ± 54	2534 ± 47	15034 ± 378
Br	49,1 ± 3,3	51,6 ± 4,5	237 ± 17
I	0,139 ± 0,003	2,6 ± 0,2	41,5 ± 2,1
Ag	< 0,001	0,030 ± 0,002	0,463 ± 0,005
Cd	0,036 ± 0,001	0,175 ± 0,005	1,214 ± 0,072
Co	0,175 ± 0,008	< 0,004	0,075 ± 0,006
Pb	< 0,036	0,116 ± 0,005	0,361 ± 0,024
Sr	1,26 ± 0,07	126 ± 7	129 ± 4
Ca	165 ± 18	11828 ± 966	16617 ± 125
K	9330 ± 93	1682 ± 61	7485 ± 113
Mg	609 ± 19	1275 ± 121	1896 ± 125
Na	2146 ± 53	12477 ± 61	8391 ± 407

A avaliação da exatidão foi feita pela decomposição e determinação de metais e halogênios em materiais de referência de leite em pó NIST 8435 e tecido de ostra NIST 1566a. A Tabela 11 mostra os resultados para a determinação de halogênios

nos materiais de referência após a decomposição por MIC, usando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora.

Tabela 11. Resultados obtidos para F (ISE), Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) após a decomposição por MIC (300 mg, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora) nos materiais de referência. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n=3.

Analito	NIST 8435		NIST 1566a	
	Valor de referência	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
F	0,17 ^a	< 8,9	240 ^a	231 \pm 9
Cl ^b	0,842 \pm 0,044	0,810 \pm 0,025	0,829 \pm 0,014	0,798 \pm 0,022
Br	20 \pm 10	22,1 \pm 2,8	-	61,4 \pm 0,4
I	2,30 \pm 0,40	2,56 \pm 0,12	4,46 \pm 0,42	4,21 \pm 0,12
Ag	-	< 0,001	1,68 \pm 0,15	1,48 \pm 0,07
Cd	0,0002 ^a	< 0,001	4,15 \pm 0,38	3,67 \pm 0,19
Co	0,003 ^a	<0,004	0,57 \pm 0,11	0,47 \pm 0,04
Pb	0,11 \pm 0,05	0,10 \pm 0,01	0,371 \pm 0,014	0,357 \pm 0,019
Sr	4,35 \pm 0,50	3,97 \pm 0,18	11,1 \pm 1,0	10,2 \pm 0,4
Ca ^b	0,922 \pm 0,049	0,697 \pm 0,038	0,196 \pm 0,019	0,185 \pm 0,016
K ^b	1,363 \pm 0,047	1,33 \pm 0,54	0,790 \pm 0,047	0,761 \pm 0,012
Mg ^b	0,0814 \pm 0,0076	0,077 \pm 0,006	0,118 \pm 0,017	0,112 \pm 0,006
Na ^b	0,356 \pm 0,040	0,321 \pm 0,021	0,417 \pm 0,013	0,412 \pm 0,011

^a Valor informado

^b Valores em porcentagem (%)

Como pode ser observado na Tabela 11, os resultados obtidos para os materiais de referência NIST 8435 e NIST 1566a não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*) em relação aos valores de referência, com exceção de Ca no NIST 8435. Possivelmente, neste caso, é necessária uma solução absorvedora mais concentrada de HNO_3 . Assim, a solução absorvedora utilizada,

bem como os procedimentos adotados para as determinações (ajuste de pH) foram adequados para a determinação de halogênios e dos metais propostos.

Ainda, foi feita a avaliação da recuperação dos metais e halogênios empregando a MIC com HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora e 5 min de refluxo empregando 700 mg de leite em pó integral. Os resultados obtidos para F (ISE) e Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) após a decomposição de 700 mg de leite em pó integral estão mostrados na Tabela 12, bem como os valores obtidos nos métodos de referência (MWAD para metais e MIC usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora para halogênios).

Tabela 12. Resultados para F (ISE) e Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb, e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) após decomposição por MIC (700 mg de leite em pó integral*, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora). Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, $n=3$.

Analito	Valor de referência	Método proposto
F	$98,6 \pm 2,3$	101 ± 4
Cl	8355 ± 222	7964 ± 238
Br	$8,34 \pm 0,19$	$8,28 \pm 0,17$
I	$3,13 \pm 0,15$	$2,93 \pm 0,15$
Ag	$0,427 \pm 0,011$	$0,390 \pm 0,020$
Cd	$0,451 \pm 0,024$	$0,428 \pm 0,026$
Co	$0,441 \pm 0,018$	$0,421 \pm 0,017$
Pb	$0,444 \pm 0,018$	$0,428 \pm 0,025$
Sr	$5,21 \pm 0,20$	$4,85 \pm 0,15$
Ca	14508 ± 662	15407 ± 1265
K	10837 ± 84	10782 ± 37
Mg	826 ± 10	805 ± 41
Na	3881 ± 98	3448 ± 243

* Amostra enriquecida com F e metais

Conforme pode ser observado na Tabela 12, os resultados encontrados para todos os elementos após a decomposição de 700 mg de amostra não apresentaram diferença significativa (teste *t-Student*) em relação aos valores obtidos nos métodos de referência (MWAD para metais e MIC usando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora para halogênios). Assim, a MIC de até 700 mg de leite em pó integral usando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora foi adequada para a posterior determinação de F por ISE, Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb, e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por F AAS.

4.9 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA METAIS E HALOGÊNIOS

Os LOQs obtidos para a determinação de halogênios e metais foram relativamente baixos, o que é um fator importante para a determinação destes elementos em baixas concentrações. Os LOQs obtidos para F por ISE e Cl, Br e I por ICP-MS para o método de referência (MIC utilizando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora, 500 mg de amostra e 5 min de irradiação) e para o método proposto (MIC usando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora, 700 mg de amostra e 5 min de irradiação) podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13. Limites de quantificação (10σ) obtidos para F (ISE), Cl, Br e I (ICP-MS) após decomposição por MIC para o método de referência (500 mg de leite em pó integral, 5 min de refluxo, NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora) e para o método proposto (700 mg de leite em pó integral, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora). Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Analito	MIC	
	NH_4OH 50 mmol L^{-1} (500 mg)	HNO_3 5 mol L^{-1} (700 mg)
F	12,7	8,9
Cl	24,3	19,2
Br	0,03	0,06
I	0,007	0,007

Conforme pode ser observado na Tabela 13, o LOQ obtido para F por ISE utilizando MIC com HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora foi menor do que o encontrado no método de referência (MIC utilizando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora). Isto se deve ao fato de o método proposto empregar maior massa de amostra, e não ser necessária diluição das amostras previamente à determinação. Para Cl, o LOQ para o método proposto foi menor do que o obtido para o método de referência, mesmo sendo necessária a diluição tanto dos brancos, quanto das amostras, para o ajuste do meio. Para I, os LOQs encontrados foram os mesmos, para os dois métodos avaliados. Já para Br, o LOQ do método proposto foi mais alto do que o do método de referência. Entretanto, os valores ainda são relativamente baixos, e possibilitam a determinação das amostras estudadas.

Os LOQs foram avaliados também para Ag, Cd, Co, Pb, e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por F AAS. A Tabela 14 apresenta os LOQs obtidos para os metais segundo o método de referência (MAWD usando HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$, 500 mg de amostra) e no método proposto (MIC usando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora, 700 mg e 5 min de irradiação).

Tabela 14. Limites de quantificação (10σ) obtidos para Ag, Cd, Co, Pb e Sr (ICP-MS) e Ca, K, Mg e Na (F AAS) para o método de referência (MAWD usando HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$, 500 mg de leite em pó integral) e para o método proposto (MIC, 700 mg de leite em pó integral, 5 min de refluxo, HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora). Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Analito	MAWD	MIC
	HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ (500 mg)	HNO_3 5 mol L^{-1} (700 mg)
Ag	0,007	0,001
Cd	0,001	0,001
Co	0,033	0,004
Pb	0,033	0,036
Sr	0,543	0,105
Ca	4,9	1,1
K	4,1	1,5
Mg	2,7	1,1
Na	8,9	1,8

Quando a MIC foi empregada para a decomposição de 700 mg de leite em pó integral e usando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora, os LOQs foram consideravelmente mais baixos que os obtidos para os métodos usados como referência.

5 CONCLUSÕES

O método proposto de decomposição por MIC, usando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora, tempo de refluxo de 5 min e massa de amostra de até 700 mg, foi adequado para a posterior determinação de F por ISE, Cl, Br, I, Ag, Cd, Co, Pb e Sr por ICP-MS e Ca, K, Mg e Na por F AAS em leite em pó integral. Usando-se 20 bar de oxigênio para a pressurização dos frascos, foi possível a queima de até 700 mg de leite em pó integral, com valores de carbono em solução menores que 25 mg L^{-1} . A etapa de refluxo de 5 min foi suficiente para a recuperação de todos os analitos estudados neste trabalho, sendo que, em tempos maiores (10 e 15 min), foram observadas perdas de I.

Para a determinação de F por ISE, foi necessário fazer o ajuste da matriz da curva de calibração para a mesma concentração ácida das soluções absorvedoras utilizadas na MIC, sendo que padrões e amostras tiveram o pH ajustado previamente às determinações (pH 5). Para a determinação de Cl, Br e I por ICP-MS, foi necessária a diluição e ajuste prévio do pH das soluções (pH 10) para determinação utilizando a curva de calibração preparada em meio alcalino, devido a efeitos de memória para I na presença de ácido.

Os valores obtidos para os halogênios e metais após a decomposição por MIC da amostra de leite em pó integral empregando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora, não apresentaram diferença significativa em relação aos valores obtidos nos métodos de referência (MAWD usando HNO_3 14,4 mol L^{-1} para metais e MIC empregando NH_4OH 25 mmol L^{-1} como solução absorvedora para halogênios). A exatidão foi avaliada usando materiais de referência de leite em pó integral NIST 8435 e tecido de ostra NIST 1566a, e os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa com os valores de referência, com exceção de Ca, no NIST 8435.

As soluções obtidas após a decomposição por MIC de leite em pó integral, utilizando soluções absorvedoras com concentração igual ou inferior a

HNO_3 5 mol L^{-1} podem ser estocadas sob refrigeração (4 °C) por até 7 dias, sem observar perdas significativas para F, Cl, Br e I.

Assim, o método proposto é uma alternativa em relação aos métodos convencionalmente empregados para a posterior determinação de metais e halogênios em materiais biológicos. A MIC empregando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora possibilita a posterior determinação de metais e halogênios em uma única solução, o que torna mais rápida esta etapa do procedimento analítico. Além disso, limites de quantificação relativamente baixos foram obtidos, devido à possibilidade de queima de até 700 mg de amostra. Cabe salientar que com o uso de uma solução única para a absorção destes analitos, há uma economia no consumo e conseqüente geração de resíduos, bem como de custo, principalmente se aplicado a análises de rotina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mello, P. A., Barin, J. S., Duarte, F. A., Bizzi, C. A., Diehl, L. O., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7615-7642.
2. Mesko, M. F., Moraes, D. P., Barin, J. S., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M., Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.
3. Pereira, J. S. F., Pereira, L. S. F., Schmidt, L., Moreira, C. M., Barin, J. S., Flores, E. M. M., Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion, *Microchemical Journal* 109 (2013) 29-35.
4. Arruda, M. A. Z., Trends in sample preparation, Nova Science Publishers, New York, 2007, p. 29-82.
5. Krug, F. J., Métodos de preparo de amostras, Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP, Piracicaba, 2010, p. 340.
6. Flores, E. M. M., Microwave-assisted sample preparation for trace element determination, Elsevier, Amsterdam, 2014, p. 400.
7. Prystupa, J., Fluorine - a current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides, *Toxicology Mechanisms and Methods* 21 (2011) 103-170.
8. 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, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 71-72 (2012) 98-101.
9. Zimmermann, M. B., Jooste, P. L., Pandav, C. S., Iodine-deficiency disorders, *Lancet* 372 (2008) 1251-1262.
10. McCall, A. S., Cummings, Christopher F., Bhave, G., Vanacore, R., Page-McCaw, A., Hudson, Billy G., Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture, *Cell* 157 (2014) 1380-1392.
11. Picoloto, R. S., Doneda, M., Flores, E. L. M., Mesko, M. F., Flores, E. M. M., Mello, P. A., Simultaneous determination of bromine and iodine in milk powder for adult and infant nutrition by plasma based techniques after digestion using microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 107 (2015) 86-92.

12. 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, *Chemical Research in Toxicology* 4 (1991) 528-534.
13. Fraga, C. G., Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health, *Molecular Aspects of Medicine* 26 (2005) 235-244.
14. Codex alimentarius commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, 2003.
15. Quesada-Gómez, J. M., Diaz-Curiel, M., Sosa-Henriquez, M., Malouf-Sierra, J., Nogues-Solan, X., Gomez-Alonso, C., Rodriguez-Mañas, L., Neyro-Bilbao, J. L., Cortes, X., Delgadillo, J., Low calcium intake and inadequate vitamin D status in postmenopausal osteoporotic women, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 136 (2013) 175-177.
16. Leppänen, K., Niemelä, M., Perämäki, P., Development of an efficient acid digestion procedure utilizing high-pressure asher technique for the determination of iodine and metallic elements in milk powder, *Food Analytical Methods* 7 (2013) 1103-1108.
17. Todoli, J. L., Mermet, J. M., Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 54 (1999) 895-929.
18. Knapp, G., Maichin, B., Fecher, P., Hasse, S., Schramel, P., Iodine determination in biological materials - options for sample preparation and final determination, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 (1998) 508-513.
19. Rose, M., Miller, P., Baxter, M., Appleton, G., Crews, H., Croasdale, M., Bromine and iodine in 1997 UK total diet study samples, *Journal of Environmental Monitoring* 3 (2001) 361-365.
20. Nobrega, J. A., Gelinas, Y., Krushevska, A., Barnes, R. M., Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12 (1997) 1243-1246.
21. Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., Vanhaecke, F., A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.
22. Taflik, T., Duarte, F. A., Flores, E. L. M., Antes, F. G., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Determination of bromine, fluorine and iodine in mineral supplements using pyrohydrolysis for sample preparation, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2012) 488-495.

23. Antes, F. G., Duarte, F. A., Flores, E. L. M., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Fluoride and chloride determination in fossil fuels after sample preparation by pyrohydrolysis, *Quimica Nova* 33 (2010) 1130-1134.
24. Antes, F. G., Santos, M. F. P., Guimaraes, R. C., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Heavy crude oil sample preparation by pyrohydrolysis for further chlorine determination, *Analytical Methods* 3 (2011) 288-293.
25. Dressler, V. L., Pozebon, D., Flores, E. L. M., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., Potentiometric determination of fluoride in geological and biological samples following pyrohydrolytic decomposition, *Analytica Chimica Acta* 466 (2002) 117-123.
26. Shinoda, T., Miyamoto, N., Kuromoto, T., Ito, K., Morikawa, H., Okamoto, Y., Fujiwara, T., Hirokawa, T., Pyrohydrolysis coupled to ion chromatography for sensitive determination of iodine in food-related materials, *Analytical Letters* 45 (2012) 862-871.
27. 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.
28. Flores, E. M. M., Barin, J. S., Mesko, M. F., Knapp, G., Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels - A brief overview and recent applications, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.
29. Kingston, H. M., Jassie, L. B., Introduction to microwave sample preparation - theory and practice, ACS Professional Reference Book, Washington, 1988, p. 263.
30. Naozuka, J., Veiga, M., Oliveira, P. V., Oliveira, E., Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 917-921.
31. Grinberg, P., Sturgeon, R. E., Ultra-trace determination of iodine in sediments and biological material using UV photochemical generation-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 235-241.
32. Venkateswarlu, P., Lacroix, M. A., Kirsch, G. W., Determination of organic (covalent) fluorine in blood serum by furnace molecular absorption spectrometry, *Microchemical Journal* 48 (1993) 78-85.
33. Fung, Y. S., Dao, K. L., Oxygen bomb combustion ion chromatography for elemental analysis of heteroatoms in fuel and wastes development, *Analytica Chimica Acta* 315 (1995) 347-355.

34. Čápka, V., Bowers, C. P., Narvesen, J. N., Rossi, R. F., Determination of total fluorine in blood at trace concentration levels by the Wickbold decomposition method with direct potentiometric detection, *Talanta* 64 (2004) 869-878.
35. Gelinás, Y., Krushevská, A., Barnes, R. M., Determination of total iodine in nutritional and biological samples by ICP-MS following their combustion within an oxygen stream, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 1021-1025.
36. Official Methods of Analysis of AOAC International AOAC International, Gaithersburg, USA, 2012.
37. Barbosa, J. T. P., Santos, C. M. M., Bispo, L. D., Lyra, F. H., David, J. M., Korn, M. D. A., Flores, E. M. M., Bromine, chlorine, and iodine determination in soybean and its products by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1065-1070.
38. Costa, V. C., Picoloto, R. S., Hartwig, C. A., Mello, P. A., Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 7957-7964.
39. Cruz, S. M., Schmidt, L., Dalla Nora, F. M., Pedrotti, M. F., Bizzi, C. A., Barin, J. S., Flores, E. M. M., Microwave-induced combustion method for the determination of trace and ultratrace element impurities in graphite samples by ICP-OES and ICP-MS, *Microchemical Journal* 123 (2015) 28-32.
40. Cruz, S. M., Tirk, P., Dalla Nora, F. M., Schmidt, L., Wiltsche, H., Bizzi, C. A., Knapp, G., Flores, E. M. M., Feasibility of sulfur determination in diesel oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion using flame retardant, *Fuel* 160 (2015) 108-113.
41. Flores, E. M. M., Muller, E. I., Duarte, F. A., Grinberg, P., Sturgeon, R. E., Determination of trace elements in fluoropolymers after microwave-induced combustion, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 374-380.
42. Muller, A. L. H., Muller, C. C., Lyra, F., Mello, P. A., Mesko, M. F., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Determination of toxic elements in nuts by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion, *Food Analytical Methods* 6 (2012) 258-264.
43. Pereira, J. S. F., Moraes, D. P., Antes, F. G., Diehl, L. O., Santos, M. F. P., Guimarães, R. C. L., Fonseca, T. C. O., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

44. Pereira, R. M., Costa, V. C., Hartwig, C. A., Picoloto, R. S., Flores, E. M. M., Duarte, F. A., Mesko, M. F., Feasibility of halogen determination in noncombustible inorganic matrices by ion chromatography after a novel volatilization method using microwave-induced combustion, *Talanta* 147 (2016) 76-81.
45. Barin, J. S., Determinação de metais e não-metals em produtos farmacêuticos após decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por micro-ondas, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Maria-RS, (2003).
46. 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, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.
47. Barin, J. S., Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Mello, P. A., Pereira, J. S. F., Microwave-induced combustion, E. M. M. Flores (Ed.) Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 143-177.
48. Maciel, J. V., Knorr, C. L., Flores, E. M. M., Müller, E. I., Mesko, M. F., Primel, E. G., Duarte, F. A., Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS, *Food Chemistry* 145 (2014) 927-931.
49. Silva, S. V., Picoloto, R. S., Flores, E. M. M., Wagner, R., Richards, N. S. P. S., Barin, J. S., Evaluation of bromine and iodine content of milk whey proteins combining digestion by microwave-induced combustion and ICP-MS determination, *Food Chemistry* 190 (2016) 364-367.
50. Mesko, M. F., Mello, P. A., Bizzi, C. A., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M., Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.
51. Mello, P. A., Diehl, L. O., Oliveira, J. S. S., Muller, E. I., Mesko, M. F., Flores, E. M. M., Plasma-based determination of inorganic contaminants in waste of electric and electronic equipment after microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 105 (2015) 95-102.
52. Anton Paar GmbH, Multiwave 3000®, Microwave Sample Preparation System, Software Version v1.27-Synt, Graz, Austria, (2003).
53. Vtorushina, E. A., Saprykin, A. I., Knapp, G., Use of oxidation and reduction vapor generation for lowering the detection limits of iodine in biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Chemistry* 64 (2009) 129-135.

54. Hartwig, C. A., Toralles, I. G., Crizel, M. G., Muller, A. L. H., Picoloto, R. S., Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Determination of bromine and iodine in shrimp and its parts by ICP-MS after decomposition using microwave-induced combustion, *Analytical Methods* 6 (2014) 7540-7546.
55. Muller, A. L. H., Muller, C. C., Antes, F. G., Barin, J. S., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Muller, E. I., Determination of bromide, chloride, and fluoride in cigarette tobacco by ion chromatography after microwave-induced combustion, *Analytical Letters* 45 (2012) 1004-1015.
56. Cataldi, T. I., Rubino, A., Ciriello, R., Sensitive quantification of iodide by ion-exchange chromatography with electrochemical detection at a modified platinum electrode, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 134-141.
57. Divjak, B., Novic, M., Goessler, W., Determination of bromide, bromate and other anions with ion chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector, *Journal of Chromatography A* 862 (1999) 39-47.
58. Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Barin, J. S., Knapp, G., Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.
59. Novic, M., Dovzan, A., Pihlar, B., Hudnik, V., Determination of chlorine, sulfur and phosphorus in organic materials by ion chromatography using electro dialysis sample pretreatment, *Journal of Chromatography A* 704 (1995) 530-534.
60. Nunes, T. S., Muller, C. C., Balestrin, P., Muller, A. L. H., Mesko, M. F., Mello, P. A., Muller, E. I., Determination of chlorine and sulfur in high purity flexible graphite using ion chromatography (IC) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) after pyrohydrolysis sample preparation, *Analytical Methods* 7 (2015) 2129-2134.
61. Rakiás, F., Tóth, K., Pungor, E., Determination of pharmaceutical compounds containing covalently-bound halogen by means of ion-selective electrodes, *Analytica Chimica Acta* 121 (1980) 93-99.
62. Krishna, M. V. B., Rao, S. V., Murthy, V. S. N., Karunasagar, D., A simple UV-photolysis digestion method for the determination of fluoride in fluorine-containing drugs by ion-selective electrode and spectrophotometry techniques, *Analytical Methods* 4 (2012) 1565-1572.
63. Antes, F. G., Pereira, J. S. F., Spadoa, L. C., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Fluoride determination in carbon nanotubes by ion selective electrode, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2012) 1193-1198.

64. Gelinas, Y., Iyengar, G. V., Barnes, R. M., Total iodine in nutritional and biological reference materials using neutron activation analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362 (1998) 483-488.
65. Welz, B., Lepri, F. G., Araujo, R. G. O., Ferreira, S. L. C., Huang, M. D., Okruss, M., Becker-Ross, H., Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces-A review, *Analytica Chimica Acta* 647 (2009) 137-148.
66. Dressler, V. L., Antes, F. G., Moreira, C. M., Pozebon, D., Duarte, F. A., As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review, *International Journal of Mass Spectrometry* 307 (2011) 149-162.
67. Becker, J. S., Inorganic mass spectrometry - principles and applications, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, p. 496.
68. Stewart, I. I., Olesik, J. W., The effect of nitric acid concentration and nebulizer gas flow rates on aerosol properties and transport rates in inductively coupled plasma sample introduction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1249-1256.
69. Robert, T., Practical guide to ICP-MS, CRC Press, Boca Raton, 2008, p. 324.
70. Torres, K. Y. C., Marzal, P. C., Kubota, L. T., Bakker, E., Recentes avanços e novas perspectivas dos eletrodos íon-seletivos, *Química Nova* 29 (2006) 1094-1100.
71. Frant, M., Ross, J. W., Use of a total ionic strength adjustment buffer for electrode determination of fluoride in water supplies, *Analytical Chemistry* 40 (1968) 1169-1171.
72. Schäfer, H., Labli, M., Dörig, R, Ion chromatography, theory, columns and eluents, monografia 50143, Herisau, Metrohm AG, (2003) p. 54.
73. Saari-Nordhaus, R., Anderson Jr, J. M., Recent advances in ion chromatography suppressor improve anion separation and detection, *Journal of Chromatography A* 956 (2002) 15-22.
74. Romarís-Hortas, V., García-Sartal, C., Barciela-Alonso, M. d. C., Domínguez-González, R., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed, *Food Chemistry* 124 (2011) 1747-1752.
75. Crizel, M. G., Hartwig, C. A., Novo, D. L. R., Toralles, I. G., Schmidt, L., Muller, E. I., Mesko, M. F., A new method for chlorine determination in commercial pet food after decomposition by microwave-induced combustion, *Analytical Methods* 7 (2015) 4315-4320.

-
76. Bizzi, C. A., Barin, J. S., Garcia, E. E., Nóbrega, J. A., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66 (2011) 394-398.
 77. Al-Ammar, A., Reitznerová, E., Barnes, R. M., Thorium and iodine memory effects in inductively-coupled plasma mass spectrometry, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 370 (2001) 479-482.
 78. Fecher, P. A., Nagengast, A., Trace analysis in high matrix aqueous-solutions using helium microwave-induced plasma-mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 1021-1027.
 79. Gokmen, I. G., Dagli, G., Determination of iodine concentration in human milk, cows' milk and infant formula and estimation of daily iodine intake of infants, *Analyst* 120 (1995) 2005-2008.