

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIOS E
ENXOFRE EM MEL POR CROMATOGRÁFIA DE ÍONS ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA**

Fernanda Pitt Balbinot

Pelotas, RS
2020

Fernanda Pitt Balbinot

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIOS E
ENXOFRE EM MEL POR CROMATOGRÁFIA DE ÍONS ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química (Área: Química Analítica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko

Coorientadora: Dr.^a Priscila Tessmer Scaglioni

Pelotas, RS

2020

Fernanda Pitt Balbinot

Desenvolvimento de método para a determinação de halogênios e enxofre em mel
por cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massa

Dissertação de mestrado aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências
Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 05 de março de 2020.

Banca examinadora:



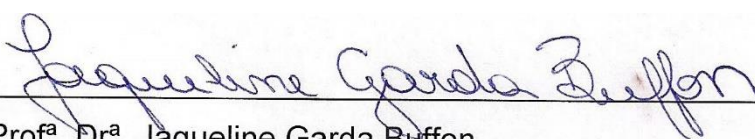
Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko (Orientadora)

Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria



Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria



Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon

Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio
Grande

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na
Publicação

B172d Balbinot, Fernanda Pitt

Desenvolvimento de método para determinação de halogênios e enxofre em mel por cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massa / Fernanda Pitt Balbinot ; Márcia Foster Mesko, orientadora ; Priscila Tessmer Scaglioni, coorientadora. — Pelotas, 2020.

85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Halogênios. 2. Enxofre. 3. Cromatografia de íons. 4. Espectrometria de massa. 5. Mel. I. Mesko, Márcia Foster, orient. II. Scaglioni, Priscila Tessmer, coorient. III. Título.

CDD : 544

Dedico este trabalho, primeiramente, à minha mãe, Rosemaire, e ao meu pai, Silmar.

Dedico este trabalho também a todas as mulheres que, por toda história, dedicaram sua vida (ou parte dela) ao desenvolvimento da ciência e do conhecimento, lutando contra a desigualdade, a falta de reconhecimento, jornada dupla e tantos outros estigmas sociais que carregamos apenas por sermos mulheres.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas (UFPe), ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ/UFPe) e aos órgãos públicos de fomento (CAPES, CNPq e FAPERGS) que tornaram possível a realização desta e de outros milhares de pesquisas, e que alicerçam a construção de uma sociedade melhor através da educação.

À Prof.^a Dr.^a Márcia F. Mesko, pela confiança depositada em mim ao aceitar me orientar na pós-graduação, pela orientação e apoio neste trabalho, por liderar incansavelmente o nosso grupo de pesquisa e por ser nosso exemplo.

À Dr.^a Priscila T. Scaglioni, pela coorientação neste trabalho e para além dele, e principalmente pela amizade genuína que construímos. Agradeço por acreditar em mim, por me mostrar o quanto sou capaz, por ser exemplo e inspiração na ciência e na vida, e por ser quem eu sei que posso contar.

Às (aos) minhas (meus) colegas do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais (LCCBio), Álisson, Bruna, Cláudio, Cleiton, Filipe, Diogo, Priscila e Romina, pelos momentos compartilhados, aprendizados e toda ajuda prestada para que fosse possível a execução deste trabalho. Estendo esse agradecimento àquelas (es) que já não fazem mais parte do grupo, mas estiveram presentes na minha jornada, especialmente à Dr.^a Vanize C. da Costa e à M.^a Julia E. de Mello.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Cezar A. Bizzi e Prof.^a Dr.^a Jaqueline G. Buffon, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e fazerem parte deste momento tão importante para mim.

Às (aos) professoras (es) e estudantes do Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais (LAQIA) pela enorme colaboração e auxílio prestado sempre que precisamos. Especialmente, à Prof.^a Dr.^a Rochele S. Picoloto e à M.^a Mariele S. Nascimento que participaram ativamente da construção deste trabalho.

À minha mãe, Rosemaire, e ao meu pai, Silmar, pelo amor e apoio incondicionais manifestados por toda minha vida. Mesmo frente a dificuldades, nunca deixaram de me impulsionar e acreditar junto comigo nos objetivos que tracei para mim. Aos familiares mais próximos, por serem sempre núcleo e estrutura sólida para mim, mesmo frente às nossas divergências em muitos aspectos.

À Djanira O. Maciel, por todo auxílio e serviços prestados. Às (aos) funcionárias (os) terceirizadas (os), pela manutenção do bom funcionamento dos nossos prédios, e em especial Mara e Arlene, pela amizade.

À todas e todos que lutam diariamente em Universidades e Institutos Federais por uma educação verdadeiramente pública, gratuita e de qualidade.

Obrigada.

“Pela maior parte da História, ‘anônimo’ foi uma mulher.”

Virginia Woolf

“Nós todas não podemos ser bem sucedidas quando metade de nós é retida.”

Malala Yousafzai

RESUMO

BALBINOT, Fernanda Pitt. **Desenvolvimento de método para determinação de halogênios e enxofre em mel por cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massa**. 2020. 85f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Um método para a determinação indireta de halogênios e enxofre em mel em única análise por cromatografia de íons com detecção condutimétrica acoplada à espectrometria de massa (IC-CD-MS) foi desenvolvido. Para tanto, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi utilizada para o preparo das amostras. Com a MIC, foi possível a decomposição de até 1000 mg de mel utilizando celulose microcristalina como auxiliar de combustão. Entretanto, visando a obtenção de combustões mais reprodutíveis, em virtude das variações no teor de umidade dos méis (14 a 21%), a massa de amostra foi fixada em 800 mg. Para otimização do método, foi avaliada a solução absorvedora, através de ensaio de recuperação com adição de padrões analíticos com concentrações conhecidas dos analitos, para a adequada retenção de Br, Cl, F, I e S nas suas formas iônicas. A solução de NH_4OH 50 mmol L^{-1} foi escolhida para os experimentos posteriores em virtude de apresentar recuperações de 93% a 101% para todos os analitos. Utilizando-se essa mesma solução, foram realizados ensaios de recuperação com materiais de referência, e as recuperações variaram de 94% a 103% para todos analitos. Os LOQs obtidos foram de 0,45 mg kg^{-1} (Br), 21 mg kg^{-1} (Cl), 3,7 mg kg^{-1} (F), 0,08 mg kg^{-1} (I) e 8,7 mg kg^{-1} (S). Para comparação dos resultados, as concentrações de Cl e S foram também determinadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), e de Br e I por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em seis amostras, e não foi observada diferença estatística (Teste t , intervalo de confiança de 95%). Por fim, o método proposto foi aplicado para a determinação de halogênios e enxofre em 19 amostras de mel de 11 países. As concentrações dos analitos variaram de < 0,45 a $2,39 \pm 0,23$ mg kg^{-1} (Br), $21,8 \pm 0,8$ a 671 ± 20 mg kg^{-1} (Cl), e $11,3 \pm 1,3$ a 154 ± 4 mg kg^{-1} (S), enquanto para F e I os valores obtidos ficaram abaixo dos respectivos LOQs para todas as amostras analisadas. Desta forma, com os resultados obtidos, foi possível a decomposição eficiente das amostras, sem perdas dos analitos, com digeridos livres de interferentes e compatíveis com a técnica de determinação.

Palavras-chave: halogênios; enxofre; cromatografia de íons; espectrometria de massa; combustão iniciada por micro-ondas; mel

ABSTRACT

BALBINOT, Fernanda Pitt. **Method development for halogen and sulfur determination in honey by ion chromatography with conductimetric detection coupled to mass spectrometry.** 2020. 85f. Dissertation (Master Degree in Chemistry) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A method for the indirect determination of halogens and sulfur in honey in a single analysis by ion chromatography with conductimetric detection coupled to mass spectrometry (IC-CD-MS) was developed. For this, the microwave-induced combustion (MIC) was used for the sample preparation. Employing MIC, it was possible to decompose up to 1000 mg of the sample using microcrystalline cellulose as combustion aid. However, aiming more reproducible combustions, given the variation on the moisture content of the honey samples (14 to 21%), the sample mass was kept in 800 mg. For the method optimization, the absorbing solution was evaluated by recovery test with the addition of analytical standards with known concentrations of analytes, for the choice of the most suitable solution to the retention of Br, Cl, F, I and S on its ionic forms. The 50 mmol L⁻¹ NH₄OH solution was chosen as the condition for further experiments because it showed recoveries varying from 93% to 101% for all analytes. Using the same solution were performed recovery tests with reference materials, and the recoveries varied from 94% to 103% for all analytes. The LOQs obtained were 0.45 mg kg⁻¹ (Br), 21 mg kg⁻¹ (Cl), 3.7 mg kg⁻¹ (F), 0.08 mg kg⁻¹ (I) and 9.8 mg kg⁻¹ (S). For the comparison of the results, the concentrations of Cl and S were also determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), and of Br and I by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in six samples, and no statistical difference (*t*-test, confidence level of 95%) was observed. Finally, the proposed method was applied for the determination of halogens and sulfur in 19 samples from 11 countries. The concentrations of the analytes ranged from < 0.45 to 2.39 ± 0.23 mg kg⁻¹ (Br), 21.8 ± 0.8 to 671 ± 20 mg kg⁻¹ (Cl), and 11,3 ± 1,3 to 154 ± 4 mg kg⁻¹ (S), while for F and I the obtained values were below the respective LOQs in all analyzed samples. In this sense, with the results that were obtained, it was possible to achieve an efficient decomposition of the samples, without volatilization losses, with digests free of interferences and compatible with multiple determination techniques.

Keywords: halogens and sulfur, ion chromatography, mass spectrometry, microwave-induced combustion, honey.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema geral do sistema utilizado para execução da MIC (a) e as dimensões do suporte de quartzo para amostras (b). Adaptado de (MESKO, 2004; 2008).29
- Figura 2.** Esquema do gradiente de temperatura e do processo de refluxo durante a MIC. Adaptado de Microwave Reaction System for Sample Preparation, Anton Paar, <http://www.anton-paar.com>.31
- Figura 3.** Instrumentação de um cromatógrafo de íons com supressão e detecção condutimétrica. Os componentes básicos são: (i) reservatórios contendo o eluente (f.m.); (ii) sistema de bombeamento (geralmente de alta pressão); (iii) válvula e alça de injeção da amostra; (iv) coluna, contendo a f.e.; (v) supressora (opcional); (vi) detector; e (vii) sistema de processamento de sinal e dados. Adaptado de Cromatografia de íons, Metrohm, <http://www.metrohm.com.br>.38
- Figura 4.** Representação esquemática do funcionamento de uma supressora eletrolítica para a determinação de um ânion (Y^-) utilizando como eluente uma solução de KOH. Adaptado de (FRITZ et al., 2000c).43
- Figura 5.** Representação esquemática do funcionamento da ESI nos modos positivo (superior) e negativo (inferior). Adaptado de (GHOSH et al., 2012).47
- Figura 6.** Instrumentação do cromatógrafo de íons com detecção condutimétrica acoplado ao espectrômetro de massa.48
- Figura 7.** Aspectos físicos observados nas amostras de mel, sendo estes: cristalizado escuro (a), cristalizado claro (b), fluido escuro (c) e fluido claro (d).55
- Figura 8.** Aspecto dos digeridos obtidos após a decomposição por MIC de a) 800 mg de mel e 250 mg de celulose, e b) 800 mg de mel e 400 mg de celulose.58
- Figura 9.** Recuperações (%) obtidas para  Br,  Cl,  F,  I e  S após decomposição por MIC (800 mg de amostra + 400 mg de celulose microcristalina + 10 µL de solução padrão), utilizando H₂O ou NH₄OH (25, 50 e 100 mmol L⁻¹) como soluções absorvedoras. Determinação por IC-CD-MS (Cl⁻, F⁻ e SO₄²⁻ utilizando detecção condutimétrica; Br⁻ e I⁻ utilizando detecção por massa), média ± desvio padrão, n=3.59

Figura 10. (—) Cromatograma obtido de uma solução padrão de Cl^- , F^- e SO_4^{2-} (a); e espectros de massa de uma solução padrão de Br^- e I^- (b). (—) Cromatograma e espectros de massa (a, b) obtidos após análise da amostra de mel utilizada na otimização do método, após preparo de amostra por MIC utilizando NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora.68

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Principais eluentes utilizados em IC com supressão e suas propriedades	43
Tabela 1. Condições operacionais empregadas para determinação de Cl, F, S, Br e I por IC-CD-MS, para determinação de Cl e S por ICP-OES, e para Br e I por ICP-MS.....	49
Tabela 2. Teor de umidade nas amostras de mel (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	56
Tabela 3. Recuperações de Br, Cl, F, I e S após decomposição de mel com RMs, utilizando NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora. Determinações por IC-CD-MS (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	62
Tabela 4. Concentrações (mg kg^{-1}) dos analitos obtidas por IC-CD-MS comparadas com aquelas obtidas por ICP-OES (Cl e S) e por ICP-MS (Br e I) em mel, empregando o método da MIC proposto, utilizando NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	64
Tabela 5. Comparação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos para Cl e S por ICP-OES e IC-CD-MS, e para Br e I por ICP-MS e IC-CD-MS.	65
Tabela 6. Concentrações (mg kg^{-1}) de Br, Cl, F, I e S em amostras de mel de diversos países. Determinações feitas por IC-CD-MS após decomposição por MIC (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*: Associação Oficial de Químicos Analíticos.

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*: Ionização Química à Pressão Atmosférica.

DOC – *Dissolved Organic Carbon*: Carbono Orgânico Dissolvido.

EDXRF – *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*: Espectrometria de Fluorescência de Dispersão de raios-X.

ESI – *Electrospray Ionization*: Ionização por Eletrospray.

f.e. – Fase estacionária.

f.m. – Fase móvel.

FMIC – *Focused Microwave-Induced Combustion*: Combustão Iniciada por Micro-ondas Focalizada.

GC-MS – *Gas Chromatography Mass Spectrometry*: Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IC – *Ion Chromatography*: Cromatografia de Íons.

IC-CD-MS – *Ion Chromatography with Conductimetric Detection Coupled to Mass Spectrometry*: Cromatografia de Íons com Detecção Condutimétrica Acoplada à Espectrometria de Massa.

IC-MS – *Ion Chromatography Mass Spectrometry*: Cromatografia de Íons Acoplada à Espectrometria de Massa.

ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*: Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado.

ICP-OES – *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*: Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado.

INAA – *Instrumental Neutron Activation Analysis*: Análise Instrumental por Ativação Neutrônica.

ISE – *Ion-Selective Electrode*: Eletrodo Íon-Seletivo.

LC-MS – *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa.

LOD – *Limit of Detection*: Limite de Detecção do Método.

LOQ – *Limit of Quantification*: Limite de Quantificação do Método.

m/z – Razão massa/carga.

MA-AD – *Microwave-Assisted Alkaline Dissolution*: Dissolução Alcalina Assistida por Micro-ondas.

MIC – *Microwave-Induced Combustion*: Combustão Iniciada por Micro-ondas.

MS – *Mass Spectrometer*: Espectrômetro de Massa.

NIST – *National Institute of Standards and Technology*: Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia.

PTFE – *Polytetrafluoroethylene*: Politetrafluoretileno.

RCC – *Residual Carbon Content*: Teor de Carbono Residual.

RM – *Reference Material*: Material de Referência.

RSD – *Relative Standard Deviation*: Desvio Padrão Relativo.

TMAH - *Tetramethylammonium hydroxide*: Hidróxido de tetrametilamônio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Aspectos gerais e principais características do mel	20
3.2. Halogênios (Br, Cl, F e I) e enxofre	22
3.3. Preparo de amostras para posterior determinação de não-metais	24
3.3.1. <i>Técnicas de combustão para o preparo de amostras</i>	26
3.3.1.1. Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)	28
3.4. Técnicas instrumentais para determinação de não-metais	32
3.4.1. <i>Técnicas espectrométricas baseadas em plasma (ICP-OES e ICP-MS)</i>	34
3.4.2. <i>Cromatografia de íons (IC)</i>	37
3.4.2.1. Cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massa	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1. Instrumentação	48
4.2. Reagentes	50
4.3. Materiais diversos	51
4.4. Amostras	51
4.5. Determinação do teor de umidade	52
4.6. Preparo de amostras de mel por MIC	53
4.6.1. <i>Avaliação da proporção de massa de amostra e de celulose microcristalina</i>	53
4.7. Parâmetros analíticos	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55

5.1. Avaliação de características físicas e determinação do teor de umidade das amostras de mel	55
5.2. Desenvolvimento e avaliação de um método de preparo de amostras por MIC para posterior determinação indireta de halogênios e S em mel utilizando IC-CD-MS.....	56
5.2.1. <i>Escolha da massa de amostra e de celulose microcristalina</i>	<i>57</i>
5.2.2. <i>Escolha da solução absorvedora</i>	<i>59</i>
5.3. Avaliação da exatidão do método proposto para determinação de Br, Cl, F, I e S em mel.....	61
5.3.1. <i>Ensaio de recuperação com adição de materiais de referência.....</i>	<i>61</i>
5.3.2. <i>Comparação da determinação dos analitos por IC-CD-MS com técnicas baseadas em plasma (ICP-OES e ICP-MS).....</i>	<i>62</i>
5.4. Determinação de Br, Cl, F, I e S em única análise	67
5.5. Determinação de halogênios e enxofre em amostras de mel provenientes de diversos países por IC-CD-MS após decomposição por MIC.....	68
6. CONCLUSÃO	72
7. PROJEÇÕES FUTURAS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a determinação de não-metals, principalmente os halogênios, em diversas amostras tem se destacado, especialmente, em função desses elementos desempenharem papéis fundamentais no organismo humano e/ou possuírem relevância do ponto de vista ambiental (FUGE, 1988; KIRK, 1991). Elementos naturalmente abundantes na crosta terrestre, como o cloro e o enxofre participam ativamente do controle homeostático do metabolismo (CORNELIS *et al.*, 2005; NIMNI *et al.*, 2007). O flúor, por sua vez, atua no desenvolvimento de tecidos como ossos e dentes (PRYSTUPA, 2011). Por fim, o bromo e o iodo estão relacionados com as funções da glândula tireoide, principalmente (VOBECKY *et al.*, 1996; ZIMMERMANN *et al.*, 2008). Sendo assim, em deficiência ou excesso no organismo humano esses elementos podem causar diversas desordens, destacando a importância do conhecimento acerca de suas concentrações em alimentos, por exemplo. Dentre os alimentos suscetíveis à presença dos elementos mencionados, destaca-se o mel. O mel é um alimento de origem animal, produzido majoritariamente por abelhas a partir de secreções ou néctar de plantas (FAO, 1981a). Assim, a presença de halogênios e enxofre em méis pode ser proveniente de fontes naturais ou de atividades antropogênicas (FUGE, 1988; TETTE *et al.*, 2016)

Nesse sentido, a determinação sequencial de analitos como Br, Cl, F, I e S é considerada um desafio em relação as técnicas instrumentais. Técnicas espectrométricas com plasma indutivamente acoplado, como a de emissão óptica (ICP-OES) e a de espectrometria de massa (ICP-MS) são comumente empregadas para a determinação desses elementos, exceto F (COSTA *et al.*, 2015; DRUZIAN *et al.*, 2019; MULLER *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2018; RONDAN *et al.*, 2018; TORALLES *et al.*, 2017). O F comumente é determinado por potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE), tendo em vista as limitações de realizar a sua determinação por técnicas baseadas em plasma de argônio (Ar) (HOEHNE *et al.*, 2019; PICOLOTO *et al.*, 2019).

Entretanto, devido às suas características inerentes, as técnicas baseadas em plasma não permitem a determinação concomitante dos analitos mencionados (Br, Cl, F, I e S). Por outro lado, deve-se mencionar que a cromatografia de íons (IC) também pode ser utilizada para a determinação indireta de não metais através da separação das suas espécies aniônicas (COSTA *et al.*, 2019; MESKO; COSTA; *et al.*, 2019;

RONDAN *et al.*, 2019). Todavia, esta técnica apresenta um inconveniente com relação à baixa sensibilidade para elementos traço, como é o caso de Br e I na maioria das amostras, o que justifica a escassez de trabalhos na literatura empregando a IC para a determinação destes elementos.

Frente a esses desafios, uma alternativa que vem sendo proposta recentemente é a utilização da IC com detecção condutimétrica acoplada a espectrometria de massa (IC-CD-MS). A utilização desta técnica permite a determinação sequencial de Br, Cl, F, I e S com seletividade e sensibilidade adequadas e em uma única análise (MESKO; PEREIRA; *et al.*, 2019). Nesse sentido, a IC-CD-MS representa um grande avanço na química analítica com relação a determinação de não-metals, principalmente halogênios e enxofre, proporcionando ainda um aumento na frequência analítica, bem como uma baixa geração de resíduos. Entretanto, como a maioria das técnicas instrumentais de análise, a IC-CD-MS requer que a amostra esteja na forma de uma solução adequada para ser analisada, sendo necessária a decomposição da matriz da amostra. Nesse sentido, um método viável para decomposição de amostras de mel é a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), uma vez que esse método combina as vantagens da digestão por via úmida em sistema fechado assistida por micro-ondas, com os dos métodos clássicos de combustão (BARIN *et al.*, 2014).

A MIC proporciona a decomposição completa de amostras de composição majoritariamente orgânica, como é o caso do mel, ao mesmo tempo que possibilita a escolha de uma solução absorvedora adequada para a retenção dos analitos (FLORES *et al.*, 2004). Este fator é de grande relevância para a determinação de halogênios e enxofre, tendo em vista que alguns desses elementos podem ser convertidos a suas formas voláteis em meio ácido (ANTES *et al.*, 2010; VANHOE *et al.*, 1993). Entretanto, empregando-se a MIC é possível a utilização de uma solução alcalina diluída que estabilize esses analitos (FLORES *et al.*, 2007).

Diante do exposto, cabe destacar a importância do desenvolvimento de um método analítico confiável e aplicável em análises de rotina para a determinação de halogênios e enxofre em mel. Nesse sentido, neste trabalho é explorada a possibilidade da utilização da MIC combinada com a IC-CD-MS para este fim. Um método foi desenvolvido e otimizado, onde os parâmetros analíticos de desempenho foram escolhidos em função da exatidão e precisão considerados adequados para a determinação de halogênios e enxofre em baixas concentrações. Por fim, o método proposto foi aplicado para diversas amostras de mel de origem variada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método visando a determinação de Br, Cl, F, I e S por IC-CD-MS em mel, após a decomposição das amostras por MIC.

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar parâmetros experimentais com relação ao preparo de amostras de mel, como a composição e concentração da solução absorvedora dos analitos, para posterior determinação de halogênios e S;
- Avaliar a exatidão do método proposto por meio de ensaios de recuperação, com adição de solução padrão e por meio da avaliação de materiais de referência (RMs).
- Comparar os resultados obtidos pela IC-CD-MS com aqueles obtidos com técnicas de referência para a determinação dos analitos, tais como ICP-OES, ICP-MS e ISE.
- Aplicar o método desenvolvido em 19 amostras de mel provenientes de 11 países.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais e principais características do mel

Segundo o *Codex Alimentarius*, o mel é um produto de origem animal, produzido por abelhas a partir de néctar de flores, secreções de plantas e excreções de insetos depositadas sobre as plantas. As abelhas coletam essas substâncias, metabolizando e depositando-as nos favos para sofrer processos de desidratação e maturação, dando origem ao mel (FAO, 1981a). Estima-se que o mel seja consumido como alimento pela espécie humana desde os primórdios da humanidade. Entretanto, o primeiro povo a criar abelhas em cativeiro para produção de mel foi o egípcio, cerca de 2400 anos a.C. (CAMARGO *et al.*, 2002). Além disso, o mel é utilizado em diversas culturas para fins terapêuticos. Algumas evidências apontam que o mel possui atividades antibacterianas (EFEM *et al.*, 1992), anti-inflamatórias e antioxidantes (AHMAD *et al.*, 2009; BILSEL *et al.*, 2002), antineoplásticas (SWELLAM *et al.*, 2003) e de estimulação da resposta imunológica (AL-WAILI *et al.*, 2004).

Atualmente, o mel possui grande importância econômica para diversos países. No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2018, estima-se que esse produto representou um faturamento de cerca de R\$500.000.000,00 com uma produção maior que 42 milhões de quilogramas. Segundo a série de dados dos anos anteriores, esse foi o maior valor registrado desde que o censo começou a ser feito, em 1974. É válido destacar que a região do país com maior produção de mel no referido ano foi a região sul, responsável pela produção de mais de 16 milhões de quilogramas (IBGE, 2018).

O mel é uma substância viscosa, aromática e açucarada. Sua composição é majoritariamente de açúcares e água, bem como de alguns nutrientes minoritários, tais como proteínas, ácidos orgânicos e minerais, totalizando cerca de 200 substâncias (CAMARGO *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2016). Entretanto, sua composição exata varia de acordo com sua origem botânica, origem geográfica e espécie de abelha que o produziu. As abelhas mais empregadas na apicultura praticada no Brasil são da espécie *Apis mellifera*, podendo ser de diversas raças que surgiram devido às diferentes condições ambientais onde cada uma se desenvolveu (CAMARGO *et al.*, 2002).

Nesse sentido, diversos trabalhos são encontrados na literatura sobre a caracterização química e física do mel. No entanto, a vasta maioria desses trabalhos se dedica à determinação de compostos majoritários como açúcares, proteínas e ácidos orgânicos (DA SILVA *et al.*, 2016). Em menor proporção estão publicados estudos sobre a determinação do conteúdo mineral do mel, com relação a elementos como alguns metais alcalinos e alcalino-terrosos, alguns metais de transição e metais denominados como “metais pesados”; ou seja, alguns elementos químicos com potencial toxicidade (ALQARNI *et al.*, 2014). Além da caracterização do produto, outros estudos utilizam a determinação de alguns elementos visando estabelecer biomarcadores de autenticidade do produto, origem botânica (florada, clima ou bioma) ou origem geográfica, tendo em vista que evidências apontam que o perfil elementar de méis pode ser utilizado como indicador de poluição ambiental, mais especificamente do uso de pesticidas, que podem contaminar solos e águas (ARVANITOYANNIS *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2016; FERMO *et al.*, 2013).

Por outro lado, embora esteja cada vez mais evidente a importância do conhecimento acerca da concentração de não-metais em diversos tipos de amostras, incluindo alimentos, são escassos relatos da determinação de não-metais em mel. Algumas publicações dos últimos dez anos relatam a determinação de alguns destes elementos em mel, mas a maioria com enfoque na análise quimiométrica para a comparação de diversos méis, sem abordar o desenvolvimento do método analítico (CZIPA *et al.*, 2015; KROPF *et al.*, 2010; VINCEVIČA-GAILE, 2010). Com relação à determinação de halogênios em mel, alguns métodos vêm sendo desenvolvimentos para esta finalidade (COSTA *et al.*, 2015; MULLER *et al.*, 2017). Contudo, ainda existem limitações com relação a determinação concomitante de outros elementos além de Cl, Br e I, como realizado nos estudos citados, tendo em vista a técnica de determinação utilizada, o que será detalhadamente abordado posteriormente.

Essa escassez está refletida na legislação que regulamenta os diversos aspectos acerca desse alimento. No âmbito internacional, o *Codex Alimentarius* regulamenta os critérios de qualidade do mel, no que diz respeito à composição majoritária (limites máximos de parâmetros como teor de açúcares, umidade e acidez residual) e aos aspectos físicos e visuais (DA SILVA *et al.*, 2016). Da mesma forma e baseado nesse mesmo documento, a organização do MERCOSUL, através do Regulamento Técnico MERCOSUL/GMC/RES. Nº 56/99, estabelece os mesmos critérios de qualidade do mel (MERCOSUL, 1999).

No Brasil, a legislação vigente que estabelece os critérios de qualidade desse alimento também se baseia nos documentos citados, através das Instruções Normativas nº 11, de 20 de Outubro de 2000 do (à época) Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000); e nº 11, de 22 de Maio de 2012 do (atual) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2012). Entretanto, cabe mencionar o fato da legislação brasileira ser extremamente complexa, no sentido de que o mesmo produto – no caso, o mel – pode ser regulado por diversos órgãos. Dentre esses pode-se citar o MAPA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Ambiental (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), dentre outros. Mesmo assim, é notável a falta de regulamentação com relação à presença dos componentes minoritários no mel, como os não-metais, no Brasil. Até o presente momento, não foram encontrados textos legais sobre essa matéria. No cenário internacional, embora a regulamentação seja feita de forma mais simplificada, também não foi encontrado nenhum ato regulatório a respeito desses elementos.

3.2. Halogênios (Br, Cl, F e I) e enxofre

Elementos como Br, Cl, F e I, do grupo dos halogênios, e S podem ser encontrados naturalmente no meio ambiente. Entretanto, esses elementos também podem ser contaminantes em solos e águas, provenientes de atividades antropogênicas, tais como o uso de pesticidas e fertilizantes (FUGE, 1988; TETTE *et al.*, 2016). Tendo isso em vista, é possível que esses elementos estejam presentes em produtos de origem natural, como é o caso do mel que, por sua vez, é produzido pelas abelhas a partir de substâncias presentes em plantas (CAMARGO *et al.*, 2002). Por outro lado, é evidente a importância do conhecimento acerca do teor dos halogênios e enxofre em alimentos, uma vez que eles desempenham importantes papéis no metabolismo humano, e sua ingestão em excesso ou a deficiência deles no organismo pode acarretar em diversos distúrbios para a saúde (KIRK, 1991; NIMNI *et al.*, 2007).

O Br tem seu potencial sedativo e anticonvulsivante bem estabelecido, mas suas funções fisiológicas não são totalmente estabelecidas (KIRK, 1991). O primeiro papel fisiológico desse elemento em humanos identificado foi o seu potencial para modular uma enzima eosinófilo peroxidase na defesa antiparasitária do organismo (WEISS *et al.*, 1986). Além disso, algumas evidências apontam que o Br⁻ atua competindo com

outros elementos, como Cl^- e I^- , em seus receptores, agindo em mecanismos de transporte e ativação/inibição de enzimas (KIRK, 1991; VOBECKY *et al.*, 1996). Se ingerido em excesso, o Br pode ter efeitos tóxicos, causando o aparecimento de sintomas como tremores, alucinações e perda de memória (KIRK, 1991). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a ingestão diária recomendada de Br é de 4 mg por quilograma de massa corporal (WHO, 2009).

O Cl, por outro lado, tem suas funções fisiológicas bem estabelecidas como, por exemplo, a sua participação na regulação da pressão osmótica e do balanço ácido-base e na manutenção do pH sanguíneo (CORNELIS *et al.*, 2005). Esse elemento também atua em diversas rotas metabólicas no organismo humano, como por exemplo no transporte de CO_2 , manutenção da função renal, modulação enzimática e geração fotossintética de oxigênio (KIRK, 1991). Além disso, pode-se mencionar que a deficiência no transporte de Cl^- no organismo pode estar associada com doenças como a fibrose cística, e alterações em funções neurais (KIRK, 1991). Quando ingerido em excesso, esse elemento pode provocar distúrbios como acidose metabólica, dores de cabeça e hipertensão (WHITNEY *et al.*, 2002). Nesse sentido, é recomendada a ingestão de 2300 mg dia^{-1} , em média, para adultos entre 19 e 50 anos (MEYERS *et al.*, 2006).

Outro elemento do grupo dos halogênios, mas que apresenta um comportamento bioquímico bastante diferente dos demais é o F, sendo o único capaz de se incorporar à rede cristalina de tecidos mineralizados, como ossos e dentes (KIRK, 1991). Tendo isso em vista, esse elemento é considerado um micronutriente importante no desenvolvimento humano, e está presente em diversos tipos de alimentos, principalmente aqueles provenientes de ambientes marinhos. Entretanto, em excesso ($> 6 \text{ mg}$ por quilograma de massa corporal ao dia) o F pode provocar doenças ósseas como osteoporose, ou até mesmo ser letal. Por outro lado, a ingestão mínima recomendada de NaF é de 4 mg dia^{-1} para homens e de 3 mg dia^{-1} para mulheres (KIRK, 1991; PRYSTUPA, 2011).

Também com um papel fisiológico bem estabelecido, o I é um elemento considerado essencial no metabolismo humano. Sua principal função é a participação na síntese dos hormônios tireoidianos. Tanto em deficiência quanto em excesso, esse elemento pode causar hipo- e hipertireoidismo, respectivamente, distúrbios amplamente estudados pela endocrinologia (KIRK, 1991; ZIMMERMANN *et al.*, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, adultos devem ingerir cerca de 0,15 mg por quilograma de massa corporal ao dia de I (WHO, 1996).

Por fim, o S é um elemento pertencente à classe dos não-metais que desempenha um importante papel biológico. Esse elemento está presente em aminoácidos essenciais e não essenciais, unidades básicas das proteínas (MEYERS *et al.*, 2006). Além disso, o S participa da síntese de diversos metabólitos intermediários a diversas rotas metabólicas, como por exemplo a glutatona. Assim, evidências indicam que o S tem papel fundamental no controle homeostático da síntese de algumas biomoléculas (NIMNI *et al.*, 2007). Por fim, alguns estudos apontam a participação desse elemento em mecanismos de defesas antineoplásicos (CONNELLY *et al.*, 2013). Apesar da importância do S no organismo, não foram encontrados dados acerca da recomendação de ingestão diária para esse nutriente. Todavia, há uma estimativa da ingestão adequada de S para manutenção do bom funcionamento do organismo de 850 mg dia⁻¹, baseada na recomendação de ingestão de proteínas (MEYERS *et al.*, 2006).

Dentro desse contexto, e com base no consumo em larga escala de mel no mundo, salienta-se a importância da determinação e controle das concentrações de elementos como os halogênios e S nesse alimento. Assim, devido a necessidade de resultados confiáveis no que tange essas análises, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos adequados, desde o preparo da amostra à análise e interpretação dos resultados.

3.3. Preparo de amostras para posterior determinação de não-metais

Na sequência analítica, após a etapa de amostragem, é necessário realizar a separação entre a matriz da amostra e os analitos. Para isso, é executada a etapa de preparo de amostras. Esta etapa é considerada a mais crítica dentro da sequência analítica, com a maior quantidade de incertezas associadas, bem como maiores custos e tempo requerido para sua execução (KRUG, 2019). Além disso, para tornar a amostra compatível com a maioria das técnicas de determinação disponíveis atualmente e dirimir o efeito de interferências de matriz, faz-se necessário que os analitos estejam disponíveis em uma solução adequada. Portanto, é importante ressaltar que o método de preparo de amostras mais adequado a ser adotado

depende, dentre outros fatores, das características das amostras e dos analitos, não existindo um método universal (KRUG, 2019; SNEDDON *et al.*, 2006).

Nesse sentido, diversos métodos são descritos na literatura, desde os clássicos aos atuais, desde os mais brandos aos mais drásticos. A classificação dos métodos de preparo pode ser feita de acordo com os fenômenos físicos e/ou químicos que regem seu processo (KRUG, 2019). É válido enfatizar que esta classificação leva em consideração a força de ataque à matriz da amostra. Isto é, uma determinada amostra pode ser submetida a procedimentos de dissolução, extração ou digestão, em ordem crescente de força de ataque. Nos dois primeiros, há apenas a presença de fenômenos físicos, não ocorrendo modificações químicas da matriz. Por outro lado, na digestão, há a completa destruição da matriz por meio de uma reação química (KRUG, 2019).

Quando se trata de determinação elementar em amostras de composição predominantemente orgânica, geralmente é necessária a destruição completa da matriz. Isto porque, embora métodos de extração utilizando soluções diluídas e o auxílio das mais diversas fontes de energia (agitação, aquecimento convencional, ultrassons, etc.) sejam úteis para algumas finalidades (NÓBREGA *et al.*, 2006), as soluções obtidas por esse método mais brando podem apresentar componentes da matriz dissolvidos, que podem impossibilitar sua análise via técnicas instrumentais (KRUG, 2019). Tendo isso em vista, métodos de digestão são amplamente discutidos na literatura visando possibilitar a determinação elementar empregando-se essas técnicas.

Inicialmente, foram difundidos na literatura métodos de digestão via úmida empregando ácidos minerais para decomposição de matrizes orgânicas, utilizando sistemas convencionais, como o bloco digestor; e posteriormente foram propostos sistemas mais modernos, utilizando o auxílio de fontes alternativas de energia, como ultrassom e radiação micro-ondas (FLORES *et al.*, 2007; KRUG, 2019). Vale ressaltar que tanto os sistemas convencionais quanto aqueles que empregam energias alternativas podem ser utilizados em sistemas com frascos abertos ou fechados.

Entretanto, a aplicação das técnicas mencionadas acima possui algumas limitações. Pode-se citar, por exemplo, a limitação para a decomposição completa de materiais orgânicos com elevada estabilidade e matrizes extremamente complexas, como petróleo, polímeros e grafite; ou materiais com elevado teor de gorduras, proteínas e açúcares (FLORES *et al.*, 2007). Por outro lado, outra limitação que pode

ser mencionada é a utilização de ácidos minerais para a determinação de não-metais, principalmente os halogênios. Isto porque estes elementos podem formar compostos voláteis em meio ácido e serem perdidos durante a etapa de preparo da amostra (ANTES *et al.*, 2010; VANHOE *et al.*, 1993).

Nesse sentido, são estudadas duas principais estratégias para contornar esses inconvenientes com relação a determinação de halogênios e outros não metais. A primeira delas é o desenvolvimento de métodos envolvendo a extração ou dissolução alcalina utilizando-se como reagentes soluções como o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), aminas terciárias solúveis em água ou outras bases fortes. Contudo, embora o TMAH, por exemplo, possua elevada capacidade de solubilizar matrizes orgânicas – incluindo materiais biológicos com elevado teor de gordura – e evite a volatilização dos analitos, as soluções resultantes apresentam elevado teor de carbono residual (RCC) ou elevadas concentrações de carbono dissolvido (DOC). Isto porque, esse reagente não apresenta capacidade de decomposição da matéria orgânica e possui átomos de carbono em sua composição (NÓBREGA *et al.*, 2006). Cabe salientar que esse fator pode ser impeditivo ou prejudicar a obtenção de limites de detecção adequados na determinação de alguns elementos levando-se em consideração algumas técnicas instrumentais.

A segunda alternativa é a utilização de técnicas baseadas em reações de combustão e estabilização dos analitos em soluções alcalinas diluídas (KRUG, 2019). Frente à extração ou dissolução alcalina, essas técnicas apresentam vantagens como a possibilidade de decomposição completa da matéria orgânica das amostras, evitando interferências de matriz; bem como a utilização de soluções alcalinas diluídas para retenção dos analitos, evitando a sua perda por volatilização e também a obtenção de menores valores de brancos analíticos (BARIN *et al.*, 2014). Nesse sentido, nesta revisão são apresentados aspectos gerais e princípios fundamentais empregados nos métodos de combustão, bem como aplicações recentes utilizando-os para posterior determinação de não metais, com destaque para a MIC.

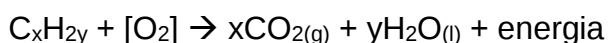
3.3.1. Técnicas de combustão para o preparo de amostras

Como foi mencionado anteriormente, a determinação de não-metais é um desafio do ponto de vista tanto do preparo de amostras quanto das técnicas de determinação. Com relação ao preparo de amostras, esse desafio vem sendo enfrentado com o desenvolvimento de sistemas de combustão. Esses sistemas são

baseados na reação de oxidação da matéria orgânica através do O₂, e são uma interessante alternativa aos métodos de decomposição via úmida (KRUG, 2019).

Essa estratégia é empregada tendo em vista que os métodos baseados em combustão suprem as principais limitações dos por via úmida, mencionados no item anterior (FLORES *et al.*, 2004). Além disso, utilizar a combustão no preparo de amostras oferece diversas vantagens, tais como a decomposição praticamente completa da fração orgânica da amostra, mesmo para matrizes extremamente estáveis, maior rapidez no processo de decomposição de forma geral, e apresentam menor risco de contaminação pela eliminação do uso de reagentes concentrados (FLORES *et al.*, 2007). É importante destacar também que métodos de combustão em sistemas fechados são uma excelente alternativa para a posterior determinação de elementos voláteis e as soluções obtidas no final do procedimento apresentam pouca acidez residual e baixos teores de carbono dissolvido, sendo compatíveis com múltiplas técnicas instrumentais (FLORES *et al.*, 2007).

De maneira geral, os métodos de preparo de amostras por combustão envolvem um combustível (matéria orgânica a ser decomposta) e um oxidante (O₂), produzindo calor em uma liberação de energia intensa (formação de chama e emissão de luz) e os produtos da oxidação do combustível. Assim, a equação geral das reações de combustão é dada a seguir (BARIN *et al.*, 2014):



Reação 1.

Em sistemas abertos, o fornecimento de O₂ para a reação é constante, uma vez que o oxigênio está presente no ar atmosférico, e o reagente limitante é a matéria orgânica. Entretanto, em sistemas fechados, o fornecimento de O₂ é limitado à quantidade do gás presente no interior dos recipientes, o que pode ser uma limitação para a decomposição completa de elevadas massas de amostra. Assim, destaca-se a utilização de sistemas fechados que possibilitem o fornecimento de O₂ em excesso, como os sistemas que apresentam a possibilidade de pressurização.

Além disso, vale ressaltar que o processo de decomposição também é dependente da temperatura atingida durante o processo. Nas reações de combustão, a temperatura atingida depende da massa e do tipo de amostra utilizada, mas também da razão O₂/combustível (KRUG, 2019). Nesse sentido, destaca-se a utilização de

sistemas fechados e pressurizados que possibilitam a obtenção de maiores temperaturas, otimizando a eficiência de decomposição, mesmo para elevadas massas de amostra.

São diversos os sistemas que empregam o princípio da combustão para preparo de amostras. Os mais comuns são: combustão via seca, sistemas com plasma de O₂, sistema de *Wickbold*, frasco de *Schöniger*, bomba de combustão e, fornos micro-ondas (MIC e combustão iniciada por radiação micro-ondas focalizada em sistema aberto (FMIC)) (FLORES *et al.*, 2007; KRUG, 2019). Nesta revisão um maior enfoque será dado a MIC em virtude das suas características para posterior determinação de halogênios, como será apresentado no item a seguir.

3.3.1.1. Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)

O princípio básico de funcionamento da MIC é a reação em sistema fechado entre a fração orgânica da amostra com o O₂, assim como os métodos mais clássicos, como frasco de *Schöniger* e bomba de combustão, mencionados anteriormente. Entretanto, a MIC alia as múltiplas vantagens dos métodos de combustão com as vantagens dos sistemas de decomposição por via úmida com aquecimento por micro-ondas em frascos fechados. A MIC proporciona uma eficiente oxidação da matéria orgânica devido à atmosfera pressurizada com O₂, característica atrelada aos processos de combustão. Concomitantemente, há a possibilidade da realização de uma etapa adicional de refluxo após a decomposição, característica dos métodos via úmida em sistemas fechados (FLORES *et al.*, 2004). Além disso, a MIC proporciona a decomposição de elevadas massas de amostras (geralmente até 500 mg). É válido mencionar que esses fatores contribuem para a diminuição dos valores dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos com a MIC e para a melhora na recuperação dos analitos, em comparação com outros métodos de preparo de amostras (BARIN *et al.*, 2014). Por fim esse método é apropriado para a determinação de metais e não-metais, devido à possibilidade de se escolher a solução absorvedora mais adequada, e seus digeridos são compatíveis com múltiplas técnicas de determinação (FLORES *et al.*, 2007; FLORES *et al.*, 2004).

A MIC é executada no mesmo sistema utilizado para a decomposição via úmida assistida por radiação micro-ondas, isto é, frascos de quartzo com tampas de PTFE, apenas com o acréscimo de um dispositivo de quartzo para suporte das amostras (FLORES *et al.*, 2004). De forma geral, a amostra é pesada, prensada na forma de

comprimidos ou, caso se trate de uma amostra líquida ou semissólida, envolvida em filmes poliméricos como o polietileno (PEREIRA *et al.*, 2008), e colocada sobre o sistema de ignição no suporte de quartzo (um pequeno disco de papel filtro umedecido com a solução ignitora). Esse suporte contendo a amostra, por sua vez, é inserido no frasco de quartzo, onde previamente é adicionado um volume adequado de uma solução absorvedora. O frasco é fechado, pressurizado e as amostras são submetidas à radiação micro-ondas (FLORES *et al.*, 2004). Os detalhes desse sistema estão demonstrados na Figura 1.

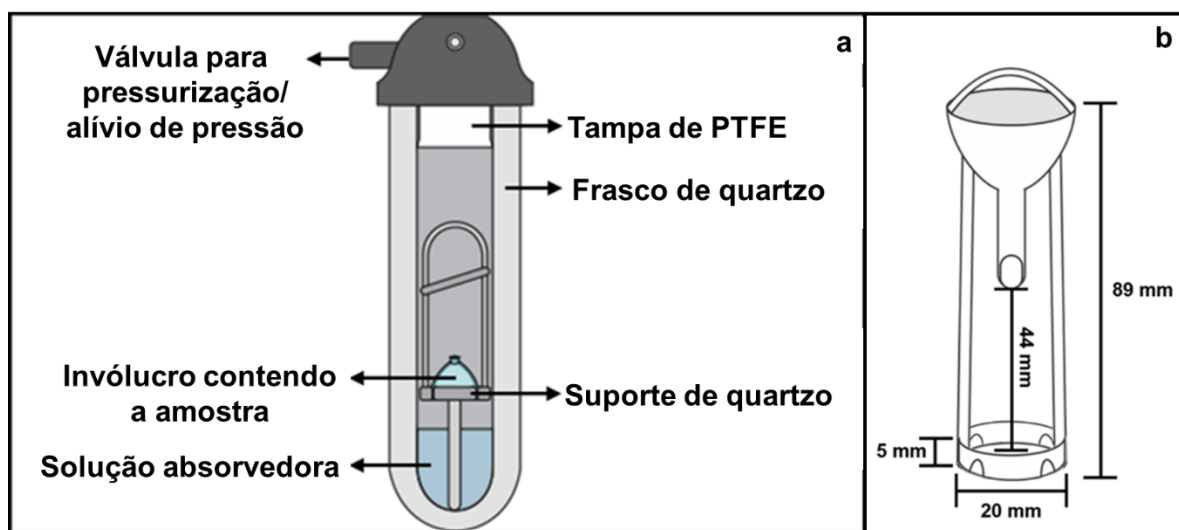


Figura 1. Esquema geral do sistema utilizado para execução da MIC (a) e as dimensões do suporte de quartzo para amostras (b). Adaptado de (MESKO, 2004; 2008).

É válido ressaltar que o suporte de quartzo para amostras demonstrado na Figura 1 (b) proporciona o contato entre o O_2 e a amostra (devido à presença de ranhuras na parte inferior do suporte) e apresenta um funil na sua parte superior que permite uma lavagem eficiente da base do suporte na etapa de refluxo. Esse funil também previne danos à tampa do frasco, protegendo-a da chama durante a combustão (MESKO, 2004). Vale ressaltar ainda que, utilizando-se este modelo de suporte, a amostra fica em uma posição mais distante da solução absorvedora, o que previne que a amostra entre em contato com a umidade que, por sua vez, pode dificultar a combustão completa.

O funcionamento da MIC inicia com a ignição, promovendo a reação de combustão da amostra. Após a queima, os analitos são absorvidos na solução presente no fundo do frasco. Entretanto, os principais diferenciais deste método dizem respeito à forma como é realizada a ignição e à possibilidade da realização da etapa

de refluxo. Esses processos estão associados com a utilização da radiação micro-ondas.

Nos métodos clássicos de combustão, a forma de ignição apresenta diversos inconvenientes, como por exemplo a dependência com a habilidade do analista (no caso da ignição manual), morosidade, riscos de operação significativos, possibilidade de contaminação por metais (no caso de utilização de filamentos metálicos), dentre outros (PEREIRA *et al.*, 2015). Assim, a MIC é apresentada como alternativa para contornar esses problemas, pela ignição nesse sistema acontecer devido à interação da radiação micro-ondas com a solução ignitora presente no disco de papel filtro posicionado sob a amostra, com o frasco já fechado e pressurizado. As soluções empregadas como ignitoras são geralmente soluções de nitratos, sendo a mais comumente utilizada a solução de nitrato de amônio (NH_4NO_3). Nesse sentido, esse processo não é dependente da habilidade do analista, é facilmente aplicado a procedimentos de rotina, é mais rápido em comparação com a ignição manual e mais reprodutível. Além disso, o risco de contaminação é reduzido drasticamente, tendo em vista que a solução de NH_4NO_3 é encontrada comercialmente com pureza relativamente elevada e por um baixo custo (PEREIRA *et al.*, 2015).

Outro diferencial da MIC com relação a outros métodos clássicos de combustão é a possibilidade de se executar uma etapa de refluxo além da combustão da amostra, proporcionando melhores recuperações dos analitos (FLORES *et al.*, 2004). Durante a irradiação das micro-ondas, ocorre a formação de vapor do solvente devido ao seu aquecimento. Esse vapor ao se deslocar para a parte superior do frasco encontra uma superfície mais fria, uma vez que o quartzo não interage com a radiação micro-ondas, sendo condensado novamente. Assim, esse processo permite que o vapor, ao ser condensado, arraste de volta para a solução os analitos que ficaram volatilizados na parte superior do frasco. Esse processo está demonstrado na Figura 2.

Com relação à solução responsável por reter os analitos, é relatado na literatura a inadequabilidade das soluções ácidas para a estabilização de não-metais em seu meio, uma vez que nesse tipo de solução esses elementos podem formar suas respectivas espécies voláteis e serem perdidos durante o preparo da amostra, principalmente os halogênios (ANTES *et al.*, 2010; VANHOE *et al.*, 1993). Nesse sentido, outra grande vantagem da MIC é a possibilidade da utilização de soluções alcalinas diluídas, responsáveis apenas por absorver os analitos, visto que a decomposição da matriz da amostra se dá pela combustão. Assim, de acordo com a

literatura, soluções de carbonato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]$ e de hidróxido de amônio (NH_4OH) são comumente empregadas para absorção de não-metais (MELLO *et al.*, 2013). Além de serem adequadas para a retenção desses analitos, essas soluções podem ser obtidas com um relativo grau de pureza e, por serem utilizadas diluídas, os valores dos brancos são significativamente diminuídos. Vale ressaltar também que, devido à baixa concentração e ao baixo volume utilizados, a MIC é um método que vai ao encontro dos princípios da química analítica verde.

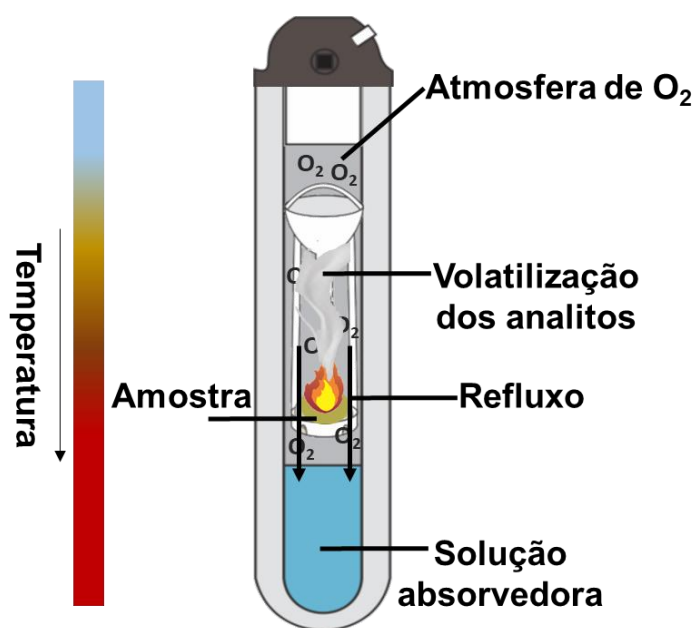


Figura 2. Esquema do gradiente de temperatura e do processo de refluxo durante a MIC. Adaptado de *Microwave Reaction System for Sample Preparation*, Anton Paar, <http://www.anton-paar.com>.

Devido a essas diversas vantagens relacionadas à MIC, esse método tem sido amplamente aplicado para determinação de halogênios e enxofre em diversos tipos de amostras, incluindo alimentos. Deve-se mencionar que a MIC foi utilizada para decompor amostras de mel para subsequente determinação de Br e I por ICP-MS, sendo a primeira aplicação deste método de preparo para decomposição de uma matriz com elevado teor de açúcares (COSTA *et al.*, 2015). Entretanto, ressalta-se que, devido às limitações da técnica utilizada, no referido trabalho foi realizada apenas a determinação de dois dos halogênios, Br e I. Além disso, a utilização de um reduzido número de amostras possibilitou combustões mais reprodutíveis no que diz respeito à massa de amostra. Entretanto, quando o número de amostras avaliadas aumenta,

esse comportamento pode não ser reproduzido, tendo em vista a ampla variação que diferentes méis podem ter em sua composição, principalmente do teor de umidade. Desta forma, são necessárias novas avaliações no que diz respeito a massa de amostra e de auxiliar de combustão a serem utilizados.

Dentre as outras amostras de alimentos avaliadas recentemente utilizando a MIC como método de preparo, pode-se ressaltar a determinação de Br e I em leite em pó (PICOLATO *et al.*, 2015), camarão (MESKO; TORALLES; *et al.*, 2016), farinha (SILVA *et al.*, 2017), ovos (TORALLES *et al.*, 2017) e arroz (RONDAN *et al.*, 2018); e de Cl e S em algas comestíveis (COELHO JUNIOR *et al.*, 2017), cereais e leguminosas (RONDAN *et al.*, 2019). Além disso, deve-se mencionar o uso da MIC no preparo de diversos outros tipos de amostras para posterior determinação de não-metals, como amostras de matriz inorgânica e biológica, por exemplo (COSTA *et al.*, 2019; MESKO; COSTA; *et al.*, 2019; MESKO; PEREIRA; *et al.*, 2019; NOVO; PEREIRA; *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2016). Um dos trabalhos desenvolvidos utilizando este método de preparo, deve-se ressaltar, emprega como técnica de determinação a IC-CD-MS para a determinação de halogênios e S em ração animal (MELLO *et al.*, 2020).

Com base no que foi apresentado, é possível verificar que a etapa de preparo de amostras é imprescindível para a obtenção de resultados confiáveis e representativos. Não obstante, outro aspecto de suma importância para qualquer análise que se deseja executar é a escolha de uma técnica de determinação adequada para o objetivo que se almeja. Nesse sentido, a seguir são apresentadas algumas técnicas instrumentais para a determinação de não-metals, bem como sua fundamentação teórica e aplicações.

3.4. Técnicas instrumentais para determinação de não-metals

Dentre as técnicas instrumentais utilizadas para a determinação de não-metals, principalmente halogênios, pode-se citar técnicas espectrométricas, eletroanalíticas, radioquímicas e de separação. Dentre as técnicas espectrométricas, destacam-se: espectrometria de fluorescência de dispersão de raios-X (EDXRF), ICP-OES e ICP-MS. Como técnica eletroanalítica tem-se a ISE, e como técnica radioquímica, a análise instrumental por ativação neutrônica (INAA). Por fim, a IC se destaca como técnica de separação (MELLO *et al.*, 2013). Estas técnicas apresentam diversas vantagens para

a determinação desses analitos, principalmente a INAA e as técnicas baseadas em plasma (ICP).

A INAA e as técnicas baseadas em plasma (ICP), são técnicas multielementares, apresentam ótima sensibilidade e detectam a maioria dos elementos da tabela periódica (EHMANN *et al.*, 1991; GINÉ-ROSIAS, 1998; 1999). No entanto, existem também algumas desvantagens que prejudicam sua aplicação em análises de rotina. A INAA, por exemplo, apresenta as desvantagens inerentes à análise direta de sólidos além da necessidade de uma instrumentação extremamente complexa (reator nuclear), de manipulação de materiais radioativos e de tratamento dos resíduos gerados (EHMANN *et al.*, 1991).

Com relação às técnicas de ICP, estas são bem estabelecidas na literatura, sendo amplamente difundidas e aplicadas para determinação de halogênios e enxofre em diversas amostras, sendo adequadas para a maioria das análises. Uma das suas poucas desvantagens é o elevado consumo de gás Ar, o que eleva significativamente o custo de operação destas técnicas (GINÉ-ROSIAS, 1998; 1999). Além disso, a ICP-MS é bastante utilizada para determinação de Br e I (COSTA *et al.*, 2015), enquanto a ICP-OES é empregada na determinação de Cl e S (NUNES *et al.*, 2015). Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura da determinação sequencial destes elementos utilizando apenas uma das técnicas de ICP.

Por outro lado, outra técnica que pode ser utilizada para determinação de alguns não-metais é a IC. Esta técnica cromatográfica de separação permite a quantificação de analitos catiônicos ou aniônicos quando acoplada a um detector adequado. Dentre esses detectores, os principais são espectrofotométricos, fluorométricos, eletroquímicos ou condutimétricos (FRITZ, 1987) – sendo o último o mais comumente empregado (IC-CD). Quando utilizada a fase estacionária própria para a separação de ânions nessa técnica, é possível realizar a determinação de halogênios e alguns outros não-metais em suas formas iônicas, como é o caso de Br⁻, Cl⁻, F⁻, I⁻ e SO₄²⁻.

Entretanto, deve-se observar que a IC-CD apresenta algumas limitações no que diz respeito à determinação de alguns desses elementos em concentrações muito diminutas. Por exemplo, a determinação de Br⁻ e I⁻ por IC-CD sempre constitui um desafio, uma vez que a sensibilidade desta técnica para esses elementos é baixa (em comparação com as técnicas com ICP) mesmo utilizando sistemas de supressão da condutividade do eluente, além disso, geralmente estes elementos estão em baixas concentrações na maioria das amostras (FLORES *et al.*, 2008).

O F, por outro lado, é coeluído com diversos ácidos orgânicos de baixa massa molecular. Assim, é requerida a utilização de colunas com maior capacidade de troca (aumentando o custo da análise) e/ou de gradientes de concentração do eluente (aumentando o tempo de análise) para a quantificação deste elemento. Além disso, a resolução do sinal também pode ser afetada pela presença de muitos outros íons em solução. Esses fatores contribuem para a dificuldade da determinação deste elemento por IC-CD (BOSE *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004).

Visando superar os inconvenientes mencionados e possibilitar a determinação de Br, Cl, F, I e S sequencialmente e em única análise, foi proposto recentemente na literatura a utilização do acoplamento entre a IC-CD à espectrometria de massa (MS). Nesse sentido, a IC-CD-MS possibilita a determinação das formas iônicas desses analitos por condutividade (Cl^- , F^- e SO_4^{2-}) e pela razão m/z (Br^- e I^-) sequencialmente com seletividade e sensibilidade adequadas (MESKO; PEREIRA; *et al.*, 2019). Diante do que foi pontuado até esse momento, nos próximos tópicos dessa revisão são abordados os fundamentos teóricos das técnicas de ICP-OES e ICP-MS de forma breve, visto que estas foram utilizadas nesse trabalho como técnicas de referência para comparação dos resultados; e sobre a cromatografia, com mais detalhes acerca da IC, técnica utilizada no método proposto.

3.4.1. Técnicas espectrométricas baseadas em plasma (ICP-OES e ICP-MS)

Inicialmente, os métodos espectrométricos eram dados como aqueles baseados na medida da intensidade da radiação eletromagnética ao interagir com o analito. Posteriormente, os métodos baseados em medidas de razões massa/carga (m/z) foram incluídos no *hall* de métodos espectrométricos. Assim, tem-se os métodos espectrométricos ópticos, como é o caso da ICP-OES, e os métodos espectrométricos de massa, como a ICP-MS (HOLLER *et al.*, 2009). Para restringir esse tópico ao escopo do presente trabalho, serão considerados nessa revisão apenas aspectos relacionados a métodos espectrométricos atômicos.

Estas duas técnicas mencionadas, baseadas em plasma para a excitação/ionização dos analitos, são consideradas técnicas bem estabelecidas na literatura para a determinação elementar em baixas concentrações. Isto devido às suas elevadas seletividade, sensibilidade e frequência analítica, além das suas capacidades de detecção multielementar, sendo adequadas para a determinação de muitos não-metais, incluindo alguns halogênios. Entretanto, apesar de apresentar

múltiplas vantagens, as técnicas baseadas em plasma são pouco utilizadas em análises de rotina devido seu elevado custo de manutenção e operação, e por requerer perícia do analista (GINÉ-ROSIAS, 1998; 1999).

Além disso, como foi mencionado anteriormente, a determinação concomitante de elementos como Br, Cl, F, I e S configura um desafio para as técnicas baseadas em plasma. Isso se deve a dois fatores principais, as características próprias dos princípios que regem seu funcionamento, bem como a ocorrência de interferências espectrais na determinação destes elementos. Esse tipo de interferência ocorre quando outra espécie, que não o analito, é detectada na mesma razão m/z (para a ICP-MS) ou na mesma linha de emissão (para a ICP-OES) que estão sendo monitoradas (MESKO; COSTA; *et al.*, 2016), prejudicando a exatidão e a precisão das medidas (O'BRIEN *et al.*, 2003). No caso da ICP-MS, verifica-se a ocorrência de interferências isobáricas (elementos diferentes com isótopos de massa próxima a do analito) e poliatômicas (combinação de dois ou mais isótopos, provenientes do plasma ou do solvente, cuja massa resultante é próxima à massa do analito) (FLORES *et al.*, 2020).

Para superar esses inconvenientes são necessárias estratégias como modificações na instrumentação (em partes como plasma, tocha e interface, bem como a inserção de celas de reação e analisadores de massa em sequência) ou a melhoria nos métodos de preparo de amostras (FLORES *et al.*, 2020; MESKO; COSTA; *et al.*, 2016). Da mesma forma, pode-se mencionar o monitoramento de um isótopo menos abundante (na ICP-MS) ou de uma linha de emissão secundária (na ICP-OES) dos analitos. Esta última estratégia, vale ressaltar, compromete a sensibilidade e a obtenção de limites de detecção adequados (O'BRIEN *et al.*, 2003).

Com relação ao F, sua determinação por técnicas baseadas em plasma é incomum tendo em vista a sua elevada eletronegatividade e energia de ionização, esta última ainda mais elevada do que do Ar, utilizado como fonte de plasma. Devido a isso, a eficiência de ionização do F em plasma de Ar é de apenas 0,0009%, prejudicando significativamente a sensibilidade da técnica para a sua determinação. Soma-se a isso, sua baixa razão m/z (19 u) e baixas linhas de emissão (região ultravioleta distante). Com relação a possíveis interferências espectrais, tendo em vista a utilização da ICP-MS, essas ocorrem devido à presença de espécies como $^{38}\text{Ar}^{2+}$, $^1\text{H}^{18}\text{O}$ e $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^1\text{H}$ (FLORES *et al.*, 2020). Assim, torna-se difícil sua determinação, tanto por ICP-OES quanto por ICP-MS, e são requeridas condições

drásticas para torná-la possível. Dentre essas condições, quando considerada a ICP-MS, pode-se mencionar a formação de um aduto (como por exemplo BaF^+ , $m/z = 157$), utilização de cela de reação contendo um gás que reaja seletivamente com o analito e analisadores de massa do tipo duplo/triplo quadrupolo ou *sector field*, que possuem resolução média a alta (BU *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2017; JAMARI *et al.*, 2017).

Com relação a Br, Cl, I e S, a determinação desses elementos através de técnicas de ICP apresenta alguns inconvenientes com relação à ocorrência de interferências espectrais. Na técnica de ICP-MS, as principais interferências para Br são ocasionadas pela espécie $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}$ para o isótopo 79 do elemento; e pela espécie $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^1\text{H}$ para o isótopo 81 (BU *et al.*, 2003). Para o Cl, as maiores interferências são ocasionadas pela combinação de átomos de O, H e Ar: $^{18}\text{O}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{17}\text{O}^{18}\text{O}$ e ArH^+ para o isótopo ^{35}Cl ; e $^1\text{H}^{36}\text{Ar}$ e O_2^+ para o isótopo ^{37}Cl (BU *et al.*, 2003; MENEGÁRIO *et al.*, 1998). O I, por outro lado, é um elemento monoisotópico e raramente suscetível a interferências espectrais na ICP-MS, que ocorrem apenas no caso de espécies como $^{89}\text{Y}^{38}\text{Ar}$, $^{87}\text{Sr}^{40}\text{Ar}$, $^{87}\text{Rb}^{40}\text{Ar}$, dentre outras, serem formadas em níveis significativos (BU *et al.*, 2003). Por fim, cabe mencionar que a determinação de S também é pouco comum por ICP-MS, podendo sofrer interferências poliatômicas de espécies como O_2^+ e O_2H^+ em espectrômetros de baixa resolução (MENEGÁRIO *et al.*, 1998).

Por outro lado, a ICP-OES é comumente empregada para a determinação de Cl e S apesar das baixas linhas de emissão desses elementos (134,724 e 180,731 nm, respectivamente, na região ultravioleta distante). Não obstante, a utilização dessa técnica para a determinação de Br e I, que também possuem baixas linhas de emissão (154,065 e 161,760 nm, respectivamente), não é comum. Para esses dois últimos elementos a sensibilidade da técnica é bastante reduzida. Isto se deve à complexidade da estrutura dos níveis energéticos de elementos mais pesados como Br e I, não havendo uma linha de emissão forte para esses elementos (HOUK *et al.*, 1988). Para a determinação dos quatro elementos citados é geralmente são utilizados de equipamentos de ICP-OES com a óptica selada e evacuada (MESKO; COSTA; *et al.*, 2016), ou purgada. O uso dessa estratégia se faz necessário uma vez que, em equipamentos sem óptica selada, podem estar presentes substâncias no caminho óptico que também absorvem a radiação em comprimentos de onda dessa região (< 200 nm), como o oxigênio atmosférico e vapor de água (NAOZUKA *et al.*, 2003).

Tendo em vista esses diversos impasses apresentados, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas que possibilitem a determinação concomitante desses elementos. Uma técnica que vêm se destacando pela sua capacidade multielementar e que apresenta potencial para a determinação de halogênios e enxofre sequencialmente é a IC. Nesse sentido, nos próximos itens, serão abordados aspectos relevantes e desenvolvimentos recentes desta técnica visando atender a demanda da determinação de Br, Cl, F, I e S em única análise.

3.4.2. Cromatografia de íons (IC)

A IC, enquanto técnica instrumental, é uma forma de cromatografia líquida, mais comumente pautada no fenômeno de troca iônica, utilizada para separação, identificação e quantificação de espécies iônicas. É válido ressaltar que, embora suas maiores aplicações sejam para determinação de íons inorgânicos pequenos, a IC também pode ser utilizada para determinação de ânions e cátions orgânicos (FRITZ *et al.*, 2000a). Nesta revisão, tendo em vista o objetivo do presente trabalho, será abordada a separação de íons inorgânicos.

A utilização de resinas de troca iônica para fins analíticos foi proposta inicialmente por Walton (1965). Uma solução contendo os íons a serem separados era eluída por uma coluna de vidro contendo uma resina trocadora de íons preenchendo seu interior. Frações da solução, após percolarem a resina, eram recolhidas em diferentes tempos de eluição para serem analisadas (WALTON, 1965). Entretanto, o primeiro sistema cromatográfico com capacidade de detecção foi desenvolvido por Small *et al.* (1975) dez anos depois (FRITZ *et al.*, 2000a; SMALL *et al.*, 1975).

Com relação à instrumentação dos cromatógrafos de íons, é possível visualizar na Figura 3 uma representação esquemática genérica de um cromatógrafo de íons e a disposição de seus componentes (HOLLER *et al.*, 2009). Vale ressaltar que, com o avanço da tecnologia e da automação dos equipamentos de laboratório, mais componentes podem ser vistos em cromatógrafos de íons mais modernos. A respeito do princípio básico de funcionamento, analogamente a outros tipos de cromatografia líquida, na IC a separação tanto aniônica quanto catiônica acontece devido às diferenças na interação desses íons tanto com a fase estacionária (f.e.), quanto com a fase móvel (f.m.).

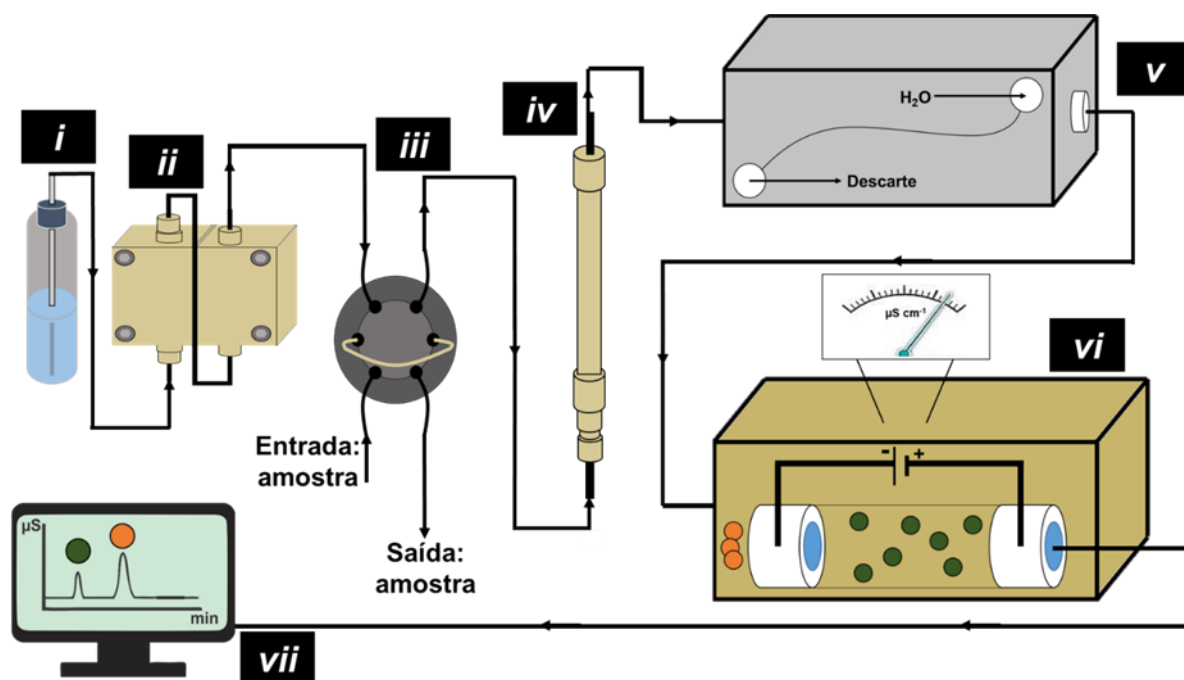


Figura 3. Instrumentação de um cromatógrafo de íons com supressão e detecção condutimétrica. Os componentes básicos são: (i) reservatórios contendo o eluente (f.m.); (ii) sistema de bombeamento (geralmente de alta pressão); (iii) válvula e alça de injeção da amostra; (iv) coluna, contendo a f.e.; (v) supressora (opcional); (vi) detector; e (vii) sistema de processamento de sinal e dados. Adaptado de *Cromatografia de íons*, Metrohm, <http://www.metrohm.com.br>.

Considerando-se a IC, a f.e. consiste em uma resina trocadora funcionalizada com alguns grupamentos capazes de se ligar temporariamente com outros íons de mesma carga. Nesse tipo de cromatografia a fase móvel, por sua vez, também deve conter espécies iônicas, que irão competir com os analitos pelos grupos trocadores da fase móvel. Assim se estabelece o equilíbrio de troca iônica (FRITZ *et al.*, 2000a). Vale ressaltar que essa não é a única forma de separação em IC, uma vez que podem ser empregados também processos de par iônico e exclusão iônica. Entretanto, a troca iônica é a mais amplamente empregada e, por isso, será a forma abordada nesta revisão.

O equilíbrio envolvido nesse tipo de separação, é dado pelas reações (1) e (2) demonstradas abaixo:



Reação 2.



Reação 3.

Onde:

L = grupo ligante fixado no material da resina

A⁻ = ânion do grupo funcional da fase estacionária

C⁺ = cátion do grupo funcional da fase estacionária

Y^{x-} = analito aniônico, com carga “x-”

M^{x+} = analito catiônico, com carga “x+”

Tomando para as subseqüentes demonstrações a Reação (2), e o grupo trocador da fase estacionária como um grupo amina terciário (–N(CH₃)₃⁺OH⁻), a retenção do analito monocarregado Y⁻ em uma solução neutra é dada pela reação:



Reação 4.

Assim, quando a eluição acontece com uma fase móvel contendo íons OH⁻, como KOH que é comumente utilizado como eluente na IC, o equilíbrio é deslocado para a esquerda. Isto é, o analito fica menos retido na fase estacionária em comparação ao OH⁻, e parte dele é transferida para a fase móvel. Esse processo é contínuo e ocorre em toda a extensão da coluna cromatográfica. Nesse sentido, a constante de equilíbrio de troca iônica (K_{TI}) é dada por:

$$K_{TI} = \frac{[\text{RN(CH}_3)_3^+\text{Y}^-]_s [\text{OH}^-]_{aq}}{[\text{RN(CH}_3)_3^+\text{OH}^-]_s [\text{Y}^-]_{aq}}$$

Equação 1.

Rearranjando a equação (1) em termos da razão entre a concentração do analito ligado à fase estacionária e livre em solução, tem-se que:

$$\frac{[\text{RN(CH}_3)_3^+\text{Y}^-]_s}{[\text{Y}^-]_{aq}} = K_{TI} \frac{[\text{RN(CH}_3)_3^+\text{OH}^-]_s}{[\text{OH}^-]_{aq}}$$

Equação 2.

Considera-se que a concentração de OH^- é significativamente maior que a concentração do analito na solução que é eluída ($[\text{OH}^-]_{\text{aq}} \gg [\text{Y}^-]_{\text{aq}}$), e que o número de sítios ativos para troca na fase estacionária é também significativamente maior que a quantidade de analito que pode ser retida ($[\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-]_{\text{s}} \gg [\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+\text{Y}^-]_{\text{s}}$). Logo, as concentrações totais de $[\text{OH}^-]_{\text{aq}}$ e $[\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-]_{\text{s}}$ não são afetadas pelo equilíbrio e, então, o lado direito da equação (2) é constante. Assim, K_{Tl} é uma constante de distribuição do analito Y^- definida pela sua atividade (a) na f.m. e na f.e. Quando $K_{\text{Tl}} \gg 1$, a tendência do analito ficar retido na fase estacionária é maior. Quando $K_{\text{Tl}} \ll 1$, pelo contrário, é maior a tendência do analito permanecer na fase móvel (HOLLER *et al.*, 2009). Entretanto, é válido ressaltar que, embora o equilíbrio de troca iônica seja o princípio básico, a separação também é afetada na prática por fatores como a estrutura e capacidade de troca da resina e do grupo funcional, o diâmetro da coluna, presença de solventes orgânicos e o modo de eluição (isocrático ou gradiente) (FRITZ *et al.*, 2000c).

Como foi mencionado anteriormente, a composição da f.e. (tanto da resina quanto do grupo trocador) afeta a separação dos analitos. No que diz respeito às resinas das colunas tanto catiônicas quanto aniônicas, suas matrizes podem ser compostas de polímeros orgânicos, como os copolímeros de poliestireno/divinilbenzeno (PS/DVB), de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno (EVB/DVB), polimetacrilato, polivinil, dentre outros; ou de sílica (SiO_2) (WEISS *et al.*, 2003). As características da matriz, como estrutura (fibrosa ou esférica) e tamanho de partícula e de poro, modificam a resolução da separação cromatográfica na coluna e a afinidade com diferentes tipos de analitos (ACIKARA, 2013).

Nesse sentido, as matrizes de polímeros orgânicos oferecem mais flexibilidade no que diz respeito à construção de materiais com diferentes características para proporcionar uma gama de aplicações diferentes (como variações na faixa de pH, melhorar a separação de analitos com tempos de retenção similares em outras matrizes, favorecer a separação de átomos ou de moléculas (e vice-versa), aumentar a velocidade de separação, dentre outros). Por outro lado, as matrizes compostas de SiO_2 têm as vantagens de serem mais estáveis mecanicamente, isto é, suportam elevadas temperaturas (da ordem de $80\text{ }^\circ\text{C}$) e variações no pH de 1 a 12; e possuem uma elevada eficiência cromatográfica. Entretanto, esse último fator limita o tipo de eluente que pode ser utilizado e de amostra que pode ser analisada (WEISS *et al.*, 2003).

Da mesma forma que a composição da matriz polimérica, os grupos funcionais – ou grupos trocadores – fixados nestas também afetam as características de separação da coluna, como a carga dos analitos que serão separados, por exemplo. Assim, há grupos trocadores de cátions e grupos trocadores de ânions, e ambos podem ser classificados como trocadores fortes ou fracos. Os trocadores fortes são aqueles que se ionizam completamente em uma ampla faixa de pH, enquanto os fracos se dissociam em diferentes graus, dependendo do pH. Trocadores fortes possuem elevada capacidade de troca, podendo adsorver uma maior gama de analitos, enquanto trocadores fracos são mais flexíveis quanto à seletividade, por exemplo. Os trocadores para cátions mais comumente empregados são os grupos sulfônico (resina-SO₃H⁺, forte) e carboxílico (resina-CHCOO⁻Na⁺, fraco), enquanto que os trocadores para ânions mais utilizados são os grupos de amônio quaternário (resina-CHN⁺(CH₃)₃Cl⁻, forte) e grupo carboximetil (resina-CH₂-COO⁻, fraco) (ACIKARA, 2013).

Além da f.e. a composição da f.m. também influencia na retenção dos analitos, como demonstrado anteriormente pelo princípio do equilíbrio de troca iônica. Entretanto, o tipo de eluente a ser utilizado não depende apenas da característica dos analitos que se deseja separar e determinar, mas também do tipo de IC empregada. Isso porque, como é possível observar na Figura 3, a solução que chega ao detector após sair da coluna contém tanto íons provenientes da amostra (analitos) quanto do eluente. Se considerado o principal detector utilizado na IC, isto é, o detector condutimétrico, a presença dos íons provenientes da f.m. aumenta a condutividade de fundo e, assim, prejudica a sensibilidade da técnica e sua capacidade de detecção (FRITZ *et al.*, 2000c). Tendo isso em vista, a IC pode ser dividida em dois modos principais: com e sem supressão do eluente.

A IC sem supressão, anteriormente chamada de IC em coluna única, é baseada na utilização de resinas com pouca capacidade de troca, bem como de eluentes com baixas concentração iônica e condutância¹. Embora essa estratégia permita a determinação de alguns íons empregando-se uma instrumentação mais simples, há uma significativa perda de sensibilidade, como mencionado anteriormente, e

¹ Deve-se atentar para o fato de que os termos “condutividade” e “condutância” não são equivalentes. O primeiro diz respeito ao caráter elétrico específico de um material, enquanto o segundo refere-se ao oposto da resistência que, por sua vez, é influenciada por outros fatores alheios à composição.

determinações em concentrações inferiores a 1 ppm são bastante limitadas ou improváveis (FRITZ *et al.*, 2000c).

Tendo isso em vista, atualmente a forma mais empregada de IC é a baseada em supressores de condutividade de eluente. Além de reduzir a condutância de fundo, o sistema de supressão pode aumentar a condutância dos íons a serem determinados. A primeira forma de supressão desenvolvida consistia em uma segunda coluna posicionada após a primeira e antes do detector condutimétrico. Entretanto, atualmente existem dispositivos menores e mais eficientes do que uma coluna e que fazem uso de diversos tipos de fenômenos físicos e químicos para realizar a supressão da condutância do eluente, como as supressoras de micromembranas ou as eletrolíticas (FRITZ *et al.*, 2000c).

Na Figura 4 é possível observar como ocorre o processo de supressão do eluente (KOH) em uma supressora eletrolítica para determinação de ânions. Esse tipo de supressora possui um ânodo e um cátodo, onde são gerados os íons H^+ e OH^- , respectivamente, a partir da eletrólise da água. Os íons OH^- são responsáveis, nesse caso, pela remoção do contra-íon positivo do eluente (K^+). Os íons H^+ reagem com o OH^- do eluente e com o analito (Y^-). Assim, é gerada a forma ácida do analito (H^+Y^-), o que aumenta a sua condutância, em H_2O (que possui baixa condutividade). Vale a pena ressaltar que, de maneira análoga, se o eluente utilizado fosse uma solução de $Na_2CO_3/NaHCO_3$, por exemplo, o produto gerado com a reação com os íons H^+ da supressora seria o ácido carbônico (H_2CO_3) – que também possui baixa condutividade.

Nesse sentido, vários tipos de eluentes podem ser utilizados na IC baseada em supressão, de acordo com a necessidade do analista com relação ao tipo de analito, à força de eluição, resolução e tempo de análise. Os principais deles, utilizados para a determinação de ânions, estão sumariados no Quadro 1 (FRITZ *et al.*, 2000c).

Frente a essa versatilidade, o detector condutimétrico é o mais comumente empregado na IC com supressão, possibilitando a determinação de uma variada gama de analitos. Entretanto, vale ressaltar que esse não é o único detector possível de ser utilizado. Alguns outros exemplos de detectores para IC são aqueles baseados em detecção eletroquímica (amperométrica e potenciométrica, por exemplo), os baseados em detecção óptica (como os espectrofotométricos na região do ultravioleta e visível, por fluorescência ou índice de refração), e os espectrométricos (como o espectrômetro de massa) (FRITZ *et al.*, 2000b). Tendo em vista os recentes avanços

no desenvolvimento da IC combinada com a espectrometria de massa, a seguir tem-se uma breve revisão sobre técnicas cromatográficas a líquido com detecção por massa, com enfoque na IC.

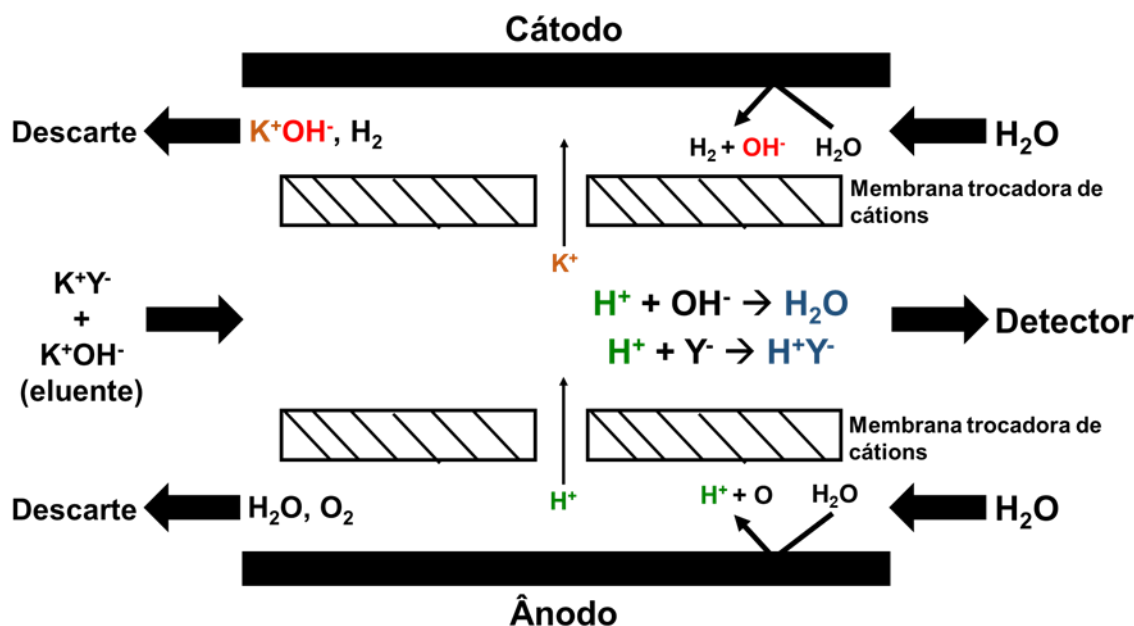


Figura 4. Representação esquemática do funcionamento de uma supressora eletrolítica para a determinação de um ânion (Y^-) utilizando como eluyente uma solução de KOH. Adaptado de (FRITZ *et al.*, 2000c).

Quadro 1. Principais eluentes utilizados em IC com supressão e suas propriedades.

Eluyente	Ânion do eluyente	Produto após supressão	Força de eluição
$\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	H_3BO_3	Muito fraca
NaOH ou KOH	OH^-	H_2O	Fraca
NaHCO_3	HCO_3^-	H_2CO_3	Fraca
$\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$	$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$	H_2CO_3	Média
Aminoácido + NaOH	$\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2^-$	$\text{RCH}(\text{NH}_3)\text{CO}_2^-$	Média
Na_2CO_3	CO_3^{2-}	H_2CO_3	Forte

3.4.2.1. Cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massa

Embora a IC com detecção condutimétrica suprimida seja uma ferramenta bastante versátil e amplamente aplicada para diversos fins, elementos que são

naturalmente encontrados em baixas concentrações, até mesmo a nível traço, representam um desafio para essa técnica. Muitas vezes o desenvolvimento de métodos mais eficientes de preparo de amostra supre essa lacuna proporcionando a obtenção de menores limites de detecção. Entretanto, essa estratégia esbarra na limitação da própria técnica com relação à sua capacidade de detecção. Nesse sentido, é constante o desenvolvimento de novas instrumentações dedicadas a melhorar a sensibilidade e a capacidade de detecção das técnicas analíticas.

O uso de técnicas cromatográficas a líquido acopladas à espectrometria de massa (LC-MS) é considerada uma continuidade natural aos estudos de desenvolvimento da cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS). Isso porque o acoplamento a um detector de massa via de regra proporciona um aumento na sensibilidade e na seletividade das medidas (PITT, 2009). Atualmente, a LC-MS é bastante consolidada, mas para a determinação de compostos orgânicos (GHOSH *et al.*, 2012; GIOUMOUXOUZIS *et al.*, 2015; HO *et al.*, 2003; KRUIVE *et al.*, 2014; PITT, 2009).

Seguindo essa tendência, alguns estudos avaliaram a determinação de alguns compostos inorgânicos iônicos por uma técnica cromatográfica líquida com detecção por massa, a cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massa (IC-MS). Os primeiros relatos encontrados do uso da IC-MS para compostos inorgânicos são estudos de Charles, Pépin & Casetta (1996, 1998). Os autores utilizaram a IC-MS/MS para quantificação de bromato em água (CHARLES *et al.*, 1996) e de outros oxihalatos na mesma matriz (CHARLES *et al.*, 1998). Posteriormente a esses estudos, é possível encontrar na literatura alguns outros relatos da utilização desta técnica, principalmente para determinação de oxihalatos de Cl, Br, e I em corpos de água (GILCHRIST *et al.*, 2016).

Contudo, houve um crescimento natural na demanda pela determinação de outros analitos, incluindo os halogênios sem estarem na forma de seus óxidos, bem como outros não-metais, em matrizes mais complexas do que água. Nesse sentido, permaneceu por muito tempo um paradigma a ser quebrado, mesmo com tantos avanços no desenvolvimento das técnicas de LC-MS. Visando superar este desafio, foi recentemente proposto na literatura o emprego da IC combinando a detecção condutimétrica e por massa em única análise (IC-CD-MS). O método proposto foi desenvolvido para a determinação de Br, Cl, F, I, e S em amostras de cabelo humano (MESKO; PEREIRA; *et al.*, 2019).

De forma genérica, um espectrômetro de massa (MS) consiste em i) sistema de injeção da amostra; ii) fonte de íons; iii) sistema de alto vácuo; iv) analisador de massa; v) detector; e vi) processador de dados. No caso da IC-MS, o sistema de injeção da amostra do espectrômetro geralmente é uma válvula que liga o capilar que sai do cromatógrafo de íons ao restante do MS. O analisador de massa, por sua vez, é o responsável pela separação dos íons monitorados e, também, pela resolução das medidas. Existem diversos tipos de analisadores de massa, sendo os mais comuns o do tipo quadrupolo, por tempo de voo e do tipo *ion trap* (GHOSH *et al.*, 2012).

É válido mencionar que os analisadores do tipo quadrupolo são os mais comumente empregados, e podem ser usados individualmente (equipamentos *single quadrupole*) ou alguns deles em sequência. Um quadrupolo consiste em quatro barras metálicas paralelas posicionadas a 90° umas das outras. Uma corrente contínua e uma corrente alternada por radiofrequência são aplicadas às quatro barras, de forma que duas barras opostas fiquem com potencial positivo e as outras duas barras opostas com potencial negativo. Isso provoca o surgimento de um campo eletromagnético oscilante no espaço delimitado pelas quatro barras metálicas. Assim, os íons que são direcionados para dentro desse campo eletromagnético são acelerados e separados de acordo com sua razão m/z . Variando-se a radiofrequência e a corrente contínua aplicada, diferentes razões m/z são direcionadas ao detector (GHOSH *et al.*, 2012). A maioria dos quadrupolos consegue separar razões até 4000 m/z , com uma resolução de 0,1 m/z , podendo ser usado para executar varreduras ou monitorar um valor específico (PITT, 2009).

Apesar das inúmeras vantagens do acoplamento de um MS a um cromatógrafo a líquido, o avanço nos estudos com a LC-MS foi limitado por muito tempo devido à incompatibilidade entre as fontes de íons dos espectrômetros e interface de injeção da amostra para o analisador de massa, com o fluxo líquido constante proveniente dos cromatógrafos. Como alternativa a esse inconveniente, nos anos de 1980, Fenn e colaboradores desenvolveram um modo de ionização com uma interface compatível com a cromatografia líquida, a ionização por *eletrospray* (ESI) (PITT, 2009).

Esse modo de ionização consiste no uso da energia elétrica para converter os analitos para suas formas iônicas (HO *et al.*, 2003; PITT, 2009). Quando os analitos em solução já estiverem na forma ionizada, a ESI é usada com o propósito de transferir esses analitos da fase líquida para a fase gasosa, aumentando a

sensibilidade da medida (HO *et al.*, 2003), como é o caso quando considerada a IC como técnica cromatográfica.

A ESI inicia na passagem da solução proveniente da separação cromatográfica por um capilar metálico ou de quartzo submetido a uma elevada voltagem (de 2,5 a 6,0 kV), levando a formação de gotículas com carga eletrostática. Essas gotículas são ejetadas da agulha da ponta do capilar (formando o “cone de Taylor”) e pulverizadas na forma de um *spray*. Devido à ação do campo elétrico formado pela diferença de potencial entre a saída do capilar e a interface de entrada do analisador de massa, as gotículas carregadas começam a migrar em direção a este, pela ação da força de atração eletrostática. Essas gotículas passam então pelo processo de redução do seu tamanho, e de evaporação do solvente pela ação de elevadas temperaturas e/ou pela presença de um feixe de um gás inerte (geralmente o N₂). Esse processo de redução e evaporação das gotas causa a aproximação das cargas opostas, até atingir o chamado limite de Rayleigh. Assim, se dá a terceira e última etapa desse processo, que consiste na implosão das gotículas do solvente (chamada “explosão Coulômbica”) devido à tensão eletrostática presente em seu interior. Os íons são então ejetados para a fase gasosa em direção ao orifício de entrada do analisador de massa (GHOSH *et al.*, 2012; HO *et al.*, 2003).

Dentre os fatores que podem afetar esse processo, pode-se citar a composição da f.m. e algumas características físico-química dos analitos, tais como o seu tamanho (GIOUMOUXOUZIS *et al.*, 2015). Dentre as principais vantagens desse modo de ionização, além da compatibilidade com a cromatografia a líquido, deve-se destacar a possibilidade da ionização tanto positiva (formando cátions) quanto negativa (formando ânions). Além disso, a ESI é capaz de ionizar e vaporizar analitos com mais de uma carga. Esses fatores a tornam muito mais versátil no que diz respeito a quantidade de analitos que podem ser determinados (PITT, 2009). Na Figura 5 é possível observar a representação esquemática de como acontece o processo de ionização na ESI nos modos positivo e negativo.

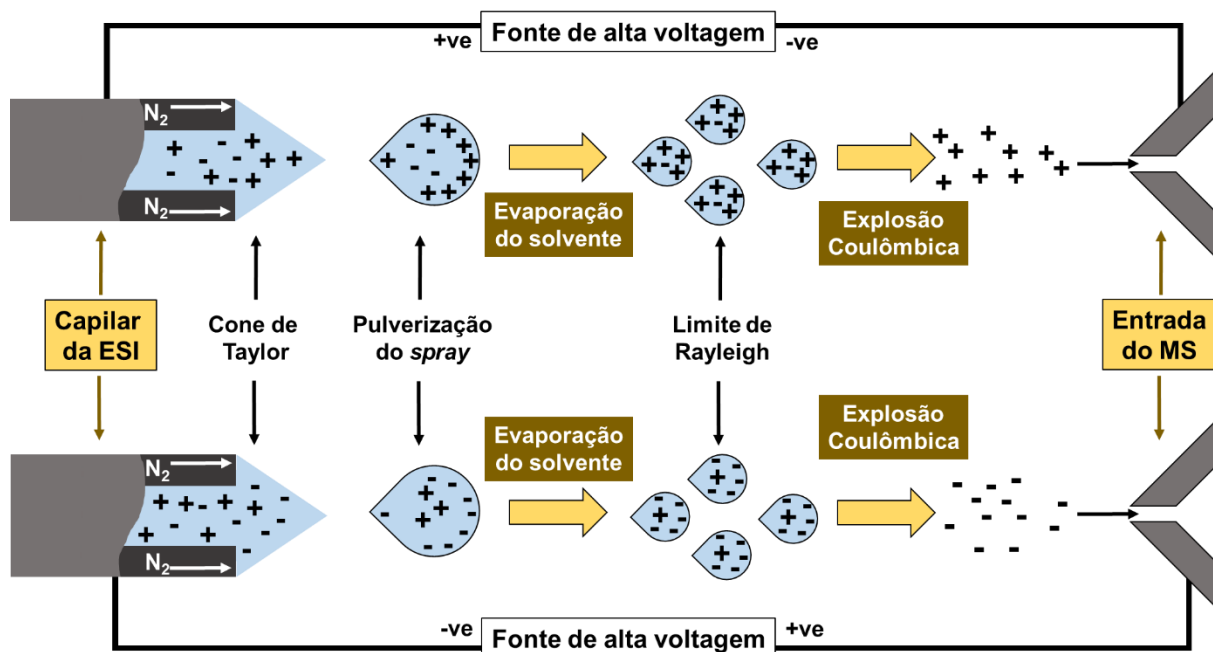


Figura 5. Representação esquemática do funcionamento da ESI nos modos positivo (superior) e negativo (inferior). Adaptado de (GHOSH *et al.*, 2012).

Além da ESI, outra forma de ionização dos analitos na LC-MS foi desenvolvida posteriormente, a ionização química à pressão atmosférica (APCI). Nesse modo de ionização, assim como na ESI, a solução é pulverizada após sair de uma agulha em direção à entrada do MS. Entretanto, após a formação do *spray*, é aplicada uma descarga elétrica capaz de ionizar o gás e o solvente presente no ambiente da fonte de íons. Esses íons reagem com os analitos, os ionizando via transferência de carga. Ao contrário da ESI, a APCI é aplicável apenas para analitos monocarregados (PITT, 2009). Essas formas de ionização, dentre outras, que proporcionaram a compatibilização da cromatografia a líquido com a espectrometria de massa ocasionaram uma impulsão nos estudos acerca dessa técnica.

Diante dos avanços mencionados, ressalta-se o potencial das técnicas que empregam a separação cromatográfica aliada à espectrometria de massa, devido à sua versatilidade para se adaptar de forma eficiente a diferentes objetivos. Assim, é possível destacar o uso da IC-CD-MS, que pode ser vista como a forma de se superar os desafios atuais na determinação multielementar a nível traço de halogênios e enxofre.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

Para a separação dos analitos e a detecção condutimétrica de Cl^- , F^- e SO_4^{2-} , foi utilizado um cromatógrafo de íons (modelo ICS-5000+, Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA). As colunas utilizadas foram a coluna analítica IonPac[®] AS11-HC (4 μm , 2 x 250 mm) e a pré-coluna IonPac[®] AG11-HC (4 μm , 2 x 50 mm). Como fonte do eluente, foi utilizado um cartucho gerador de KOH com coluna aprisionadora de ânions continuamente regenerada. A supressão do eluente foi feita com uma supressora eletrolítica autorregenerada (membrana de 2 mm). As condições cromatográficas utilizadas para separação dos analitos foram aplicadas de acordo com um trabalho prévio (MESKO; PEREIRA; *et al.*, 2019) e estão descritas na Tabela 1. Um espectrômetro de massa equipado com um quadrupolo (modelo MSQ Plus, Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado ao cromatógrafo de íons, foi utilizado para a determinação de Br^- e I^- . Os isótopos monitorados foram ^{81}Br e ^{127}I , e as condições experimentais também foram previamente otimizadas (MESKO; PEREIRA; *et al.*, 2019). Para injeção das amostras no cromatógrafo, os digeridos obtidos após a etapa de preparo de amostras foram filtrados utilizando-se microfiltros com fibras de PTFE e com diâmetro de poro de 0,2 μm . A injeção das amostras no sistema foi executada utilizando-se um módulo de autoamostrador. Na Figura 6 é possível observar a instrumentação descrita.



Figura 6. Instrumentação do cromatógrafo de íons com detecção condutimétrica acoplado ao espectrômetro de massa.

Para comparação dos resultados obtidos por IC, Cl e S foram quantificados utilizando-se um ICP-OES (modelo Ciroso CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha). Bromo e I, por sua vez, foram determinados utilizando-se um ICP-MS (modelo Elan DRC II, Perkin-Elmer-SCIEX, Canadá). Os parâmetros operacionais empregados para a determinação dos analitos por ICP-OES e ICP-MS estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Condições operacionais empregadas para determinação de Cl, F, S, Br e I por IC-CD-MS, para determinação de Cl e S por ICP-OES, e para Br e I por ICP-MS.

Parâmetro	IC-CD-MS	
Eluente (mmol L ⁻¹)	KOH (de 5 até 90)	
Vazão (mL min ⁻¹)	0,28	
Temperatura da coluna (°C)	30	
Volume de injeção (µL)	50	
Detecção	Detecção condutimétrica	Detecção por massa
	Cl ⁻ , F ⁻ e SO ₄ ²⁻	⁸¹ Br e ¹²⁷ I
	Supressão: eletroquímica	Ionização por <i>eletrospray</i> (ESI)
		Temperatura da sonda: 600 °C
		Voltagem da agulha: 4,2 kV
		Voltagem do cone: 132 V
	ICP-MS	ICP-OES
Potência de RF (W)	1300	1550
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15	14
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,2	1,0
Vazão do gás nebulizador (L min ⁻¹)	1,05	1,00
Câmara de nebulização	Ciclônica	Tipo Scott de duplo passo
Nebulizador	Concêntrico	Fluxo cruzado
Vista	-	Axial
Cones de amostragem	Pt	-
Isótopos (<i>m/z</i>)	⁷⁹ Br; ¹²⁷ I	-
Linha de emissão (nm)		Cl (134,724)
		S (180,731)

As amostras foram pesadas em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Filipinas), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Uma chapa de aquecimento com agitador magnético (modelo RH Basic 2, IKA, Alemanha) foi usada no pré-tratamento das amostras. Um banho ultrassônico (modelo USC-1800 A, Unique, 40 kHz, 155 W, Brasil) foi utilizado para agitação mecânica em alguns procedimentos de descontaminação. Uma capela de fluxo laminar classe 100 (modelo CSLH-12, Veco, Brasil) foi utilizada para secagem de materiais termicamente sensíveis, como discos de papel filtro e filmes de polietileno (PE).

Um refratômetro de Abbé de bancada (Analytik Jena, Alemanha) foi utilizado na determinação do teor de umidade das amostras.

4.2. Reagentes

A água ultrapura (18,2 MΩ cm) utilizada em todos os experimentos foi obtida através de um sistema de purificação (modelo Simplicity® UV, Millipore, Merck KGaA, Alemanha). Todos os reagentes utilizados nesse estudo foram de grau analítico ou pureza superior.

A solução absorvedora (hidróxido de amônio, NH₄OH) nas concentrações de 25, 50 e 100 mmol L⁻¹, foi preparada com a diluição do reagente concentrado, isto é, NH₃ 27% (Synth, Brasil). A solução de nitrato de amônio (NH₄NO₃) 6 mol L⁻¹ foi utilizada como solução ignitora na MIC, e foi preparada a partir da dissolução do respectivo sal sólido (Merck, Alemanha) em água ultrapura.

A solução de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹ foi utilizada para auxiliar a decomposição, sendo adicionada no interior dos invólucros contendo a amostra. Como auxiliar de combustão na MIC, também foi utilizada celulose microcristalina de grau farmacêutico, obtida em uma farmácia de manipulação local.

Para a pressurização dos frascos de quartzo para a combustão, foi utilizado O₂ gasoso (White Martins, Brasil) com pureza de 99,96%. Para as análises utilizando as técnicas com ICP, o plasma foi gerado com gás argônio (Ar) de elevada pureza (99,998%, White Martins, Brasil), também usado para nebulização nesses equipamentos.

As soluções padrão de Cl⁻ e SO₄²⁻ (1000 mg L⁻¹) e Br⁻, F⁻ e I⁻ (100 mg L⁻¹) foram preparadas a partir da dissolução dos sais cloreto de sódio P.A. (Dinâmica, Brasil), sulfato de sódio P.A. (Synth, Brasil), brometo de potássio P.A. (Synth, Brasil), fluoreto

de sódio P.A. (Merck, Alemanha), e iodeto de potássio P.A. (Synth, Brasil), respectivamente, em água ultrapura. As soluções padrão de calibração (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; e 15 mg L⁻¹ de Cl⁻ e SO₄²⁻), (10; 25; 50; 100; 250; e 350 µg L⁻¹ de F⁻) e (2,5; 5,0; 10; 50; 100; e 150 µg L⁻¹ de Br⁻ e I⁻) foram preparadas a partir da diluição das soluções padrão em água ultrapura.

4.3. Materiais diversos

Vidrarias e materiais de uso de rotina do laboratório foram descontaminados por imersão em ácido nítrico (HNO₃) 10% (v/v) por 24 h, e lavados com água ultrapura, álcool etílico bidestilado e novamente com água ultrapura.

Os frascos de quartzo, suas tampas de PTFE e os suportes de quartzo para as amostras foram descontaminados com 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ (Synth, Brasil). O programa de irradiação micro-ondas foi configurado a 1000 W por 10 min (aquecimento) e 0 W por 20 min (arrefecimento). Posteriormente, foi executada a descontaminação do sistema com água ultrapura, seguindo o mesmo procedimento mencionado acima, com o mesmo programa de irradiação micro-ondas.

Pequenos discos de papel filtro (15 mm de diâmetro, 0,5% de cinzas, Qualy, J Prolab, Brasil) foram utilizados como auxiliar da combustão. Para o preparo dos invólucros contendo as amostras, foram utilizados filmes de PE, nas dimensões de 8 x 8 cm. Ambos, discos de papel filtro e filmes de PE, foram descontaminados previamente via imersão em solução de HNO₃ 10% (v/v) e agitados mecanicamente em um banho ultrassônico (modelo USC-1800 A, Unique, 40 kHz, 155 W, Brasil). Após esse procedimento, esses materiais foram lavados com água ultrapura e secos em uma capela de fluxo laminar classe 100 (modelo CSLH-12, Veco, Brasil).

A celulose utilizada foi descontaminada previamente via imersão em solução de HNO₃ 10% (v/v) e agitada mecanicamente em um banho ultrassônico (modelo USC-1800 A, Unique, 40 kHz, 155 W, Brasil), filtrada, lavada com água ultrapura, filtrada novamente e subsequentemente seca em uma estufa convencional.

4.4. Amostras

As amostras de mel provenientes de 11 países foram compradas em mercados locais, totalizando 19 amostras: 4 do Brasil (BRA1, BRA2, BRA3 e BRA4), 4 dos

Estados Unidos da América (EUA1, EUA2, EUA3 e EUA4), 2 da Índia (IND1 e IND2), 2 do Egito (EGI1 e EGI2), 1 do México (MEX), 1 da Turquia (TUR), 1 da Itália (ITA), 1 do Canadá (CAN), 1 da Inglaterra (ING), 1 da Grécia (GRE), e 1 que é uma mistura de méis provenientes da Austrália e do Brasil (AUS+BRA). Os estudos iniciais e de otimização foram feitos utilizando uma amostra selecionada arbitrariamente (BRA1).

Previamente à execução da MIC, as amostras foram levadas a um pré-tratamento em banho-maria por 30 min a 60 °C para homogeneização, conforme recomendado pelo método oficial nº 920.180 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para preparação da amostra teste (AOAC, 2011). Após esse procedimento, as amostras foram recondicionadas em recipientes de polietileno de alta densidade, previamente descontaminados com HNO₃ 10% (v/v). Esses recipientes foram vedados com filmes de parafina plástica e armazenados sob as condições adequadas, isto é, locais secos e sem exposição à luz solar.

O Material de Referência (RM) e o Material de Referência Certificado (CRM), RM NIST 8435 (leite em pó integral) e CRM NIST 1566A (tecido de ostra), provenientes do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), foram utilizados na avaliação do desempenho analítico do método, uma vez que não há CRM de mel disponível para os elementos avaliados.

4.5. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado por refratometria, como recomendado pelo método oficial nº 969.38 da AOAC (WHITE, 1969). As amostras foram mantidas em um ambiente termicamente estável e a temperatura de cada amostra foi medida até não haver mais variações. Previamente à leitura as amostras foram homogeneizadas para a dissolução dos cristais, conforme descrito no item 4.4.

Para a leitura, 2 a 3 gotas das amostras foram transferidas para o prisma do refratômetro e, então, feita a leitura do índice de refração correspondente. Esse procedimento foi feito em triplicata para cada amostra. Os valores de refração observados, juntamente com o fator de correção da temperatura, foram utilizados para obtenção do percentual de umidade, com base nos valores tabelados que correlacionam o conteúdo de sólidos solúveis com o índice de refração (AOAC, 2011).

4.6. Preparo de amostras de mel por MIC

Para execução da MIC, massas de até 1000 mg de mel foram pesadas sobre os filmes de PE, seguido da adição de 400 mg de celulose microcristalina e 100 μL da solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} , como descrito em um trabalho prévio (COSTA *et al.*, 2015). Posteriormente, os filmes de PE foram selados por aquecimento usando uma solda de ferro. Esses invólucros de PE contendo as amostras foram então posicionados na base dos suportes de quartzo, sobre um disco de papel filtro umedecido com 50 μL da solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} (PEREIRA *et al.*, 2015). Os suportes de quartzo foram então introduzidos nos frascos de quartzo, contendo 6 mL de água ultrapura ou uma solução de NH_4OH (25, 50 e 100 mmol L^{-1}), as quais foram avaliadas como soluções absorvedoras. Os frascos foram fechados, fixados ao rotor e pressurizados com 20 bar de O_2 . O rotor foi levado ao interior da cavidade do forno de micro-ondas e foi aplicado o seguinte programa de irradiação: 1400 W por 50 s (etapa de ignição), 0 W por 3 min (etapa de combustão), 1400 W por 5 min (etapa de refluxo) e 0 W por 20 min (etapa de arrefecimento). Após a combustão, a pressão remanescente no interior dos frascos foi liberada antes da abertura destes.

4.6.1. Avaliação da proporção de massa de amostra e de celulose microcristalina

A massa de amostra a ser utilizada, bem como a proporção entre a massa de amostra e a massa de celulose microcristalina foram avaliadas com base em um estudo prévio (COSTA *et al.*, 2015), no qual a condição do método foi estabelecida como 1000 mg de mel e 400 mg de celulose. No presente estudo, foram avaliadas as proporções i) 1000 mg e 400 mg de celulose; ii) 900 mg de mel e 350 mg de celulose; iii) 800 mg de mel e 250 mg de celulose; e iv) 800 mg de mel e 400 mg de celulose.

Para realização destes testes de combustão, os invólucros contendo as diferentes massas de amostra e de celulose foram preparados conforme descrito no item 4.6 e inseridos no sistema da MIC. A avaliação da combustão foi realizada com base no aspecto visual do digerido obtido após a queima das diferentes massas.

4.7. Parâmetros analíticos

A confiabilidade do método proposto para a determinação de halogênios e S em mel por IC-CD-MS foi avaliada, primeiramente, através de ensaios de recuperação

com adição de padrão ou adição de materiais de referência. O ensaio de recuperação com adição de padrão foi executado com adição de 10 µL de uma solução contendo Br⁻ (50 mg L⁻¹), Cl⁻ (7200 mg L⁻¹), F⁻ (460 mg L⁻¹), I⁻ (40 mg L⁻¹) e SO₄²⁻ (1600 mg L⁻¹) diretamente sobre a amostra antes da sua decomposição. Para o teste de recuperação com adição de RM, os materiais RM NIST 8435 (40 mg) ou CRM NIST 1566A (30 mg) foram misturados com 760 mg ou 770 mg de mel (amostra BRA1), respectivamente, e com 400 mg de celulose microcristalina, utilizando as condições otimizadas.

Outra forma de avaliar o desempenho do método foi a comparação dos resultados obtidos por IC-CD-MS com outras técnicas. A determinação de Cl e S também foi realizada por ICP-OES, enquanto a determinação de Br e I também foi feita por ICP-MS. É válido destacar que os analitos foram determinados indiretamente em suas formas iônicas no caso da IC-CD-MS. Assim, as concentrações obtidas para os íons Br⁻, Cl⁻, F⁻ e I⁻ foram consideradas as concentrações totais para esses elementos, enquanto os resultados obtidos para SO₄²⁻ foram convertidos matematicamente para S pela proporção estequiométrica.

Os LODs do método proposto utilizando a MIC e a IC-CD-MS foram calculados a partir da média mais 3 vezes o desvio padrão dos valores dos brancos obtidos em 10 replicatas. Para o cálculo dos LOQs, foi considerada a média mais 10 vezes o desvio padrão dos valores obtidos para os brancos em 10 replicatas. Além disso, em ambos os casos, também foram levados em consideração fatores como a massa de amostra, o volume final dos digeridos e, quando necessário, o fator de diluição (MCNAUGHT, 1997).

O tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando um nível de confiança de 95%, através do *software* GraphPad Prism[®] (GraphPad Software Inc, Version 6.01, 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Avaliação de características físicas e determinação do teor de umidade das amostras de mel

Após serem identificadas e rotuladas, as amostras foram submetidas a uma avaliação visual do seu aspecto físico. Fatores como cristalização do açúcar e cor foram avaliados. Foram observados quatro diferentes aspectos entre as amostras utilizadas nesse trabalho: cristalizado e escuro, em seis amostras; cristalizado e claro, em uma amostra; fluido e escuro, em seis amostras; e fluido e claro, em seis amostras. Na Figura 7 é possível observar esses quatro aspectos descritos para as amostras de mel.

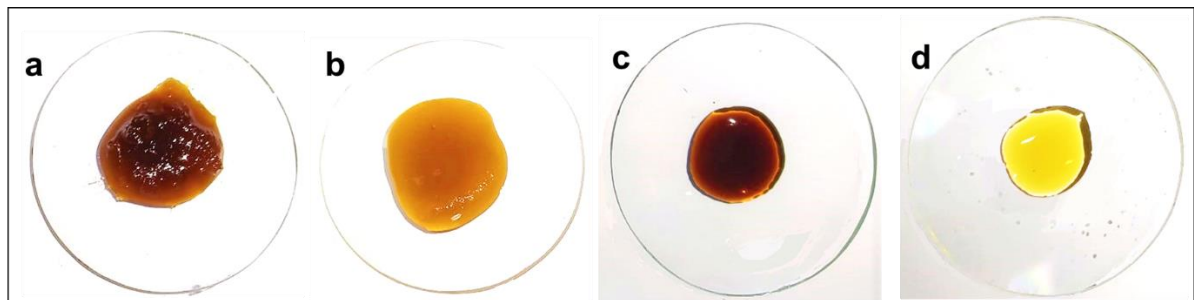


Figura 7. Aspectos físicos observados nas amostras de mel, sendo estes: cristalizado escuro (a), cristalizado claro (b), fluido escuro (c) e fluido claro (d).

Os diferentes aspectos entre as amostras estão associados às suas diferentes origens botânicas e geográficas, acarretando mudanças na sua composição. Outro fator que também pode influenciar a composição do mel, é a raça da abelha utilizada na sua produção. Com relação à cristalização e à viscosidade do mel, esta vai depender do teor e dos tipos de açúcares presentes. Por outro lado, a diferença na coloração nesses produtos está associada com variações no teor de minerais (CAMARGO *et al.*, 2002).

Outro fator que pode influenciar no aspecto físico do mel, é o seu conteúdo de água. Assim, estudos iniciais foram feitos para determinar o teor de umidade das amostras de mel por refratometria, e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Teor de umidade nas amostras de mel (média $\pm$ desvio padrão, n=3).

Amostra	Teor de umidade (%)	Amostra	Teor de umidade (%)
BRA1	19 $\pm$ 0,06	EGI1	17 $\pm$ 0,89
BRA2	19 $\pm$ 0,61	EGI2	17 $\pm$ 0,31
BRA3	18 $\pm$ 0,40	MEX	14 $\pm$ 0,53
BRA4	19 $\pm$ 0,92	TUR	20 $\pm$ 0,89
EUA1	17 $\pm$ 0,53	ITA	19 $\pm$ 0,42
EUA2	18 $\pm$ 0,62	CAN	20 $\pm$ 0,70
EUA3	18 $\pm$ 0,83	ING	18 $\pm$ 1,44
EUA4	21 $\pm$ 1,62	GRE	14 $\pm$ 0,83
IND1	18 $\pm$ 0,76	AUS+BRA	18 $\pm$ 0,61
IND2	19 $\pm$ 1,22		

Pode-se observar que os valores variaram de 14 a 21% nas amostras analisadas. Com relação à amostra (BRA1) escolhida para os estudos de otimização do método analítico, o seu teor de umidade é de 19 $\pm$ 0,06%.

É válido ressaltar que, de acordo com o *Codex Alimentarius*, o teor de água máximo em mel é de 20% (FAO, 1981b). Esse teor pode variar de acordo com a região ou estação do ano em que o alimento foi produzido (CAMARGO *et al.*, 2002), origem botânica, estado de fermentação, técnicas de processamento utilizadas e condições de armazenamento (DA SILVA *et al.*, 2016). Além disso, destaca-se que essa variação pode influenciar, até mesmo impedir, a decomposição completa da amostra por métodos de combustão (NOVO; MELLO; *et al.*, 2019).

5.2. Desenvolvimento e avaliação de um método de preparo de amostras por MIC para posterior determinação indireta de halogênios e S em mel utilizando IC-CD-MS

Visando o desenvolvimento de um método adequado para a determinação de halogênios e S em mel, optou-se por empregar a MIC como método de preparo de amostras. Outros métodos de preparo, como a dissolução alcalina assistida por micro-ondas (MA-AD), não foram avaliados. Embora haja relatos na literatura do uso de bases fortes para solubilizar matrizes orgânicas e evitar a volatilização de não-metals, em um estudo prévio (COSTA *et al.*, 2015), foi observado que a MA-AD não foi

adequada para a determinação de halogênios (Br e I) em mel, em comparação à MIC. Isso porque, mesmo o processo sendo executado em sistema fechado e com auxílio da radiação micro-ondas, as soluções alcalinas não são capazes de decompor a matéria orgânica, apenas dissolvê-la. Como consequência, as soluções obtidas ao final do processo apresentam um elevado teor de carbono dissolvido, o que é acentuado se considerada a matriz das amostras de mel. Assim, esse fator pode impedir ou dificultar a determinação dos analitos, uma vez que se torna necessário o emprego de um elevado fator de diluição para evitar interferências e danos nos equipamentos. Isso prejudica a obtenção de adequados LODs e LOQs, dificultando a determinação de elementos em baixas concentrações.

5.2.1. Escolha da massa de amostra e de celulose microcristalina

Para o desenvolvimento do método de preparo das amostras por MIC, o estudo mencionado anteriormente demonstrou que é possível decompor até 1000 mg de mel nesse sistema (COSTA *et al.*, 2015). Entretanto, no presente trabalho foi observado que em amostras com maiores teores de umidade, a combustão não foi completa em algumas replicatas utilizando-se essa massa de amostra.

A falta de reprodutibilidade das queimas também foi observada utilizando 900 mg de mel e 350 mg de celulose, e 800 mg de mel e 250 mg de celulose. Vale ressaltar que a massa de celulose foi reduzida juntamente com a massa de amostra visando evitar um aumento nos valores dos LODs e LOQs.

Para evitar uma diminuição drástica da massa de amostra, foi realizado um incremento na massa de celulose a ser utilizada. Assim, foi necessária a utilização de 400 mg de celulose para 800 mg de mel, obtendo-se por fim queimas completas e reprodutíveis para todas as replicatas em todos os experimentos, não sendo observados resíduos nos digeridos. Essa foi a condição selecionada para continuidade do estudo. Para demonstrar esse comportamento, o aspecto dos digeridos obtidos após a decomposição de uma amostra utilizando 800 mg de mel e 250 mg de celulose, bem como 800 mg de mel e 400 mg de celulose, está demonstrado na Figura 8.

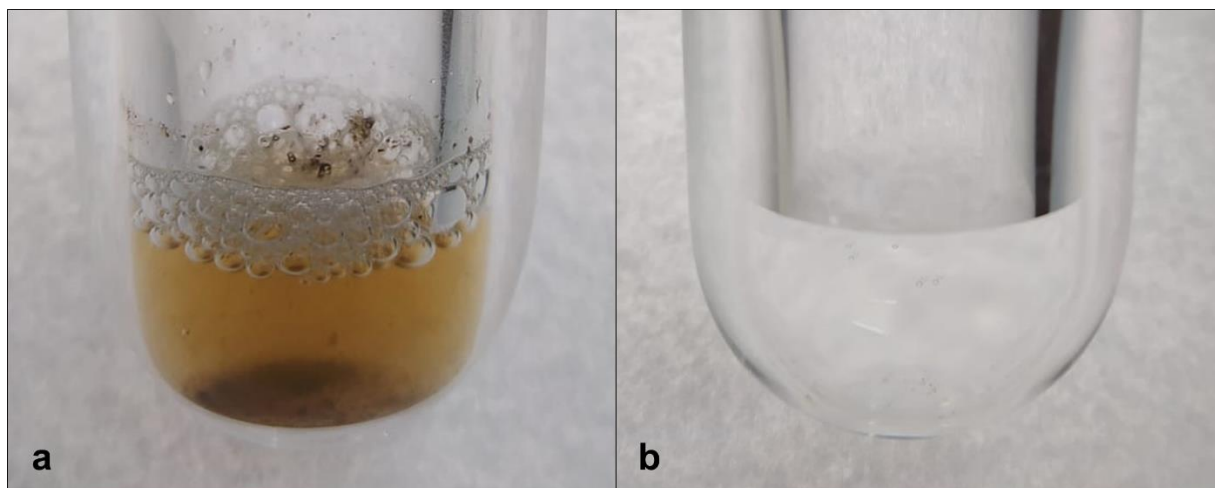


Figura 8. Aspecto dos digeridos obtidos após a decomposição por MIC de a) 800 mg de mel e 250 mg de celulose, e b) 800 mg de mel e 400 mg de celulose.

Também deve-se mencionar que mesmo utilizando a massa máxima de amostra possível de ser decomposta (1000 mg de mel e 400 mg de celulose), a MIC proporcionou a decomposição eficiente da amostra, uma vez que o RCC obtido foi menor que 1%, como reportado anteriormente (COSTA *et al.*, 2015). Assim, é possível que a falta de reprodutibilidade entre as combustões com essa massa de amostra e de celulose seja decorrente das diferenças na composição das amostras, como teor e tipos de açúcares, e teor de umidade – como foi mencionado no item 5.1. Isso indica, mais uma vez, a complexidade dessa matriz no que tange o desenvolvimento de um método adequado para seu preparo.

Com relação às diferenças de composição entre as amostras que podem dificultar a obtenção de queimas reprodutíveis que foram citadas anteriormente, deve-se mencionar que o processo de combustão está relacionado a proporção de matéria orgânica e oxigênio, bem como à temperatura da chama (BARIN *et al.*, 2014). Nesse sentido, diferenças na concentração e composição de açúcares presentes na amostra alteram a proporção estequiométrica entre o combustível (matéria orgânica) e a quantidade de oxidante (oxigênio) necessária para a combustão completa. Por outro lado, maiores temperaturas atingidas no sistema auxiliam na decomposição eficiente da matéria orgânica. Entretanto, se o teor de umidade da amostra for elevado, a água pode absorver calor, diminuindo a temperatura da chama e dificultando o processo de combustão.

5.2.2. Escolha da solução absorvedora

Com relação à escolha da solução absorvedora mais adequada, esta depende do tipo e concentração dos analitos, bem como da matriz da amostra a ser decomposta (BARIN *et al.*, 2014). Tendo isso em vista, a otimização desse parâmetro é importante para um adequado desempenho do método (MELLO *et al.*, 2013). De forma geral, água ultrapura e soluções alcalinas são recomendadas para uma adequada retenção de halogênios e enxofre quando utilizada a MIC (COSTA *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2013; MULLER *et al.*, 2013; MÜLLER *et al.*, 2012). Assim, neste trabalho água ultrapura e soluções de NH_4OH (25, 50 e 100 mmol L^{-1}) foram avaliadas como soluções absorvedoras. Para isso, foram feitos ensaios de recuperação com a adição de 10 μL de uma solução padrão contendo os analitos na amostra (800 mg) antes da combustão. É importante ressaltar que essa solução padrão adicionada à amostra continha diferentes concentrações de cada analito, correspondendo a 0,625; 90; 2,5; 0,5 e 6,6 mg kg^{-1} de Br, Cl, F, I e S, respectivamente. Os resultados de recuperação obtidos estão demonstrados na Figura 9.

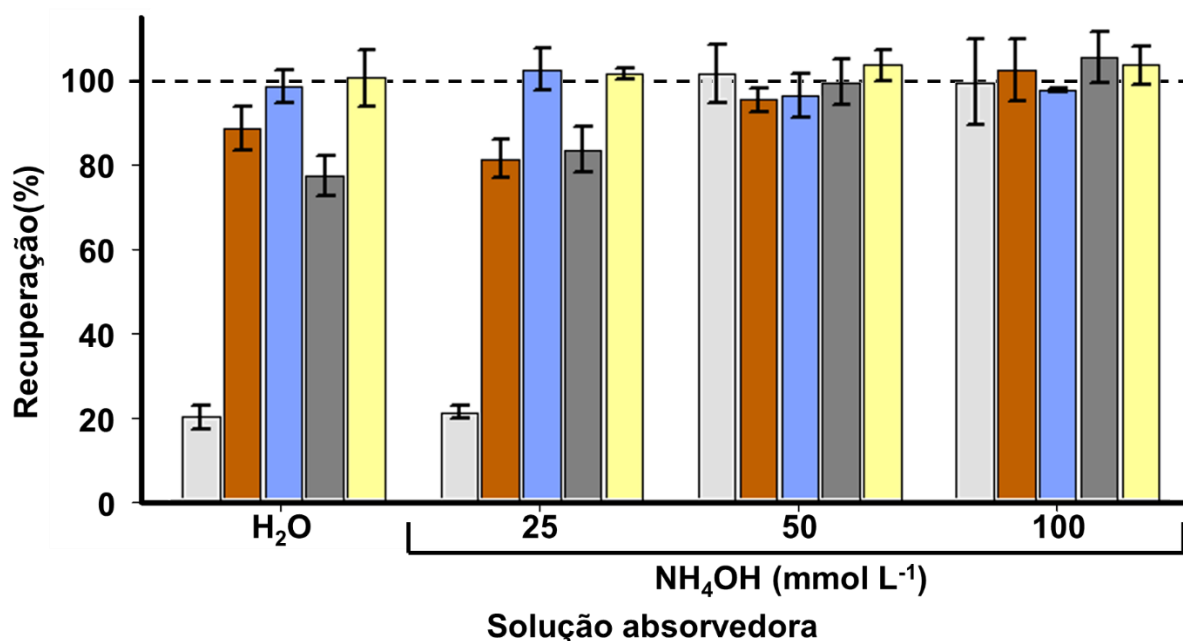


Figura 9. Recuperações (%) obtidas para Br, Cl, F, I e S após decomposição por MIC (800 mg de amostra + 400 mg de celulose microcristalina + 10 μL de solução padrão), utilizando H_2O ou NH_4OH (25, 50 e 100 mmol L^{-1}) como soluções absorvedoras. Determinação por IC-CD-MS (Cl^- , F^- e SO_4^{2-} utilizando detecção condutimétrica; Br^- e I^- utilizando detecção por massa), média $\pm$ desvio padrão, $n=3$.

Como está demonstrado na Figura 9, todos analitos foram recuperados quantitativamente (95 a 105% de recuperação) quando empregadas as soluções de 50 e 100 mmol L⁻¹ de NH₄OH para sua absorção. Além disso, com a solução de NH₄OH 50 mmol L⁻¹ foram obtidos os menores RSDs (< 7%) para todos os analitos (exceto F). O RSD para F quando utilizada essa solução foi de 5%, enquanto o menor valor obtido para esse elemento foi de 0,4% quando utilizada a solução NH₄OH 100 mmol L⁻¹. Ainda assim, é plausível dizer que o RSD obtido para F utilizando NH₄OH 50 mmol L⁻¹ foi adequado. Tendo isso em vista, esta foi a solução escolhida como condição do método para as outras avaliações. É importante mencionar que um estudo prévio (COSTA *et al.*, 2015) também demonstrou que essa é a solução mais adequada para a retenção de Br e I após a decomposição de mel (1000 mg) por MIC.

Tendo em vista a utilização da solução absorvedora de NH₄OH 50 mmol L⁻¹ como condição do método, os LODs e LOQs foram calculados a partir dos valores de concentração dos analitos obtidos nos brancos da amostra feitos com essa solução, e analisados por IC-CD-MS. Com relação ao LOD (mg kg⁻¹), estes valores foram de 15 (Cl), 1,3 (F) e 6,9 (S) utilizando detecção condutimétrica; e de 0,21 (Br) e 0,04 (I) utilizando a detecção por massa. Os LOQs (mg kg⁻¹) obtidos, utilizando os mesmos modos de detecção para os analitos, foram de 21 (Cl), 3,7 (F), 8,7 (S), 0,45 (Br) e 0,08 (I). Esses LOQs são comparáveis a valores obtidos em outro trabalho empregando essa técnica de determinação (MESKO; PEREIRA; *et al.*, 2019).

A respeito destes limites, deve-se mencionar que a necessidade da utilização da celulose microcristalina como auxiliar de combustão, acarretou em um pequeno aumento nos valores dos brancos para alguns elementos. Este foi o caso para F, principalmente; e Br. Vale ressaltar que os elevados valores de F nos brancos analíticos, eram esperados, uma vez que alguns compostos fluorados são utilizados como aditivos na fabricação da celulose de grau farmacêutico, principalmente visando a obtenção de um excipiente mais hidrofóbico e, assim, menos suscetível a ação microbiana (KHANJANI *et al.*, 2018). Com relação ao aumento nos valores dos brancos para Br e I, esse inconveniente relacionado com a utilização da celulose microcristalina também foi observado em outro estudo (NOVO; MELLO; *et al.*, 2019).

Não obstante, como descrito posteriormente no tópico 5.5, esse problema não impediu a determinação desses elementos na maioria das amostras, com exceção do I. Assim, é possível afirmar que os valores de LODs e LOQs, fornecidos pelo método proposto, são adequados à determinação desses elementos em mel. Em um método

analítico, valores adequados para esses dois parâmetros estão diretamente relacionados com a massa de amostra e pureza de reagentes e materiais utilizados na etapa de preparo de amostras; bem como da sensibilidade da técnica de determinação. Nesse sentido, a MIC combinada à IC-CD-MS proporcionou a obtenção de limites adequados para todos os analitos.

5.3. Avaliação da exatidão do método proposto para determinação de Br, Cl, F, I e S em mel

A avaliação da exatidão do método foi realizada levando em consideração ensaios de recuperação com adição de RMs, bem como comparando os resultados obtidos com os valores obtidos com técnicas baseadas em plasma (ICP-OES e ICP-MS).

5.3.1. Ensaios de recuperação com adição de materiais de referência.

Com relação aos ensaios de recuperação, estes foram realizados com a adição dos RMs (leite em pó integral e tecido de ostra) utilizados diretamente sobre a amostra anteriormente à decomposição, uma vez que não há RM de mel para os analitos avaliados. Essa estratégia permite simular as condições da matriz na liberação dos analitos para a solução absorvedora, aliada com a utilização de concentrações certificadas para melhor avaliação da exatidão. Nesse sentido, os materiais utilizados foram escolhidos tendo em vista a presença dos analitos em concentrações que, em uma massa adequada, se aproximam das suas concentrações na amostra.

Assim, o RM NIST 8435 foi utilizado para avaliar as recuperações de Br, Cl e S, enquanto que o CRM NIST 1566A para avaliar as recuperações de F e I. Os RMs foram decompostos em invólucros juntamente com a amostra por MIC, e as determinações realizadas por IC-CD-MS. Os resultados dos ensaios de recuperação estão demonstrados na Tabela 3.

Como é possível observar, as recuperações obtidas para todos os analitos podem ser consideradas adequadas, variando de 94 a 103%. Esses valores de recuperação, juntamente com aqueles obtidos com o ensaio de recuperação por adição de padrão, fornecem uma base sólida para afirmar que o método de preparo de amostras proposto possui uma exatidão adequada. Por outro lado, para avaliar a exatidão do método analítico considerando também parâmetros da técnica de

determinação, foi conduzida uma comparação da determinação dos analitos pela IC-CD-MS (a técnica proposta neste trabalho) com técnicas baseadas em plasma (técnicas que são bem estabelecidas na literatura para determinação elementar).

Tabela 3. Recuperações de Br, Cl, F, I e S após decomposição de mel com RMs, utilizando NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora. Determinações por IC-CD-MS (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$).

Analito	Concentração adicionada (mg kg^{-1})	Concentração recuperada (mg kg^{-1})	Recuperação (%)
Br	$1,08 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,05$	$100 \pm 0,06$
Cl	193 ± 18	193 ± 8	$101 \pm 8,50$
F	$9,7 \pm 0,1$	$9,2 \pm 0,5$	$94 \pm 5,43$
I	$0,181 \pm 0,002$	$0,174 \pm 0,010$	$96 \pm 6,81$
S	61 ± 6	63 ± 3	$103 \pm 5,36$

5.3.2. Comparação da determinação dos analitos por IC-CD-MS com técnicas baseadas em plasma (ICP-OES e ICP-MS).

Como foi mencionado anteriormente, há diversas limitações na determinação de F por técnicas de ICP. Assim, a comparação da IC-CD-MS com essas técnicas foi realizada levando em consideração as concentrações dos demais analitos. Nesse sentido, Cl e S foram também determinados por ICP-OES, e Br e I por ICP-MS. Nessa avaliação foram utilizadas seis das amostras utilizadas neste trabalho, selecionadas aleatoriamente. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4.

Primeiramente, comparando-se os resultados obtidos para Cl e S por IC-CD-MS e ICP-OES, observou-se que esses são concordantes e não apresentaram diferença estatística (Teste- t , nível de confiança de 95%), nas seis amostras avaliadas. Com relação à comparação entre os resultados obtidos com a IC-CD-MS e com a ICP-MS, utilizando-se ambas as técnicas, as concentrações de I ficaram abaixo do LOQ em todas as amostras. A respeito do Br, os seus resultados foram comparados com relação às amostras que apresentaram concentrações acima do LOQ utilizando as duas técnicas comparadas. Dessa forma, não foi observada diferença estatística (Teste- t , nível de confiança de 95%) entre os resultados obtidos para Br por IC-CD-MS e ICP-MS.

Na Tabela 5, são apresentados os LODs e LOQs obtidos para os analitos através das técnicas de ICP, bem como os valores desses limites obtidos utilizando a IC-CD-MS, para comparação. Tendo por base esses resultados, é possível observar que o LOQ para Cl foi menor utilizando a IC-CD-MS, enquanto que para S o limite foi ligeiramente superior utilizando essa técnica do que aquele obtido com a ICP-OES, mas ainda assim comparável. Com relação aos LOQs de Br, o valor obtido com a ICP-MS foi o dobro do que o obtido com a IC-CD-MS, devido à necessidade de utilizar-se um fator de diluição para a determinação deste elemento por esta última técnica, o que é considerado no cálculo dos limites. O I, por sua vez, teve seus valores de LOQ um pouco elevados, mas comparáveis entre as técnicas utilizadas. Isso indica que os valores obtidos não se devem a uma possível baixa sensibilidade da IC-CD-MS para a determinação de I, mas sim à presença do elemento nos brancos analíticos.

Tabela 4. Concentrações (mg kg⁻¹) dos analitos obtidas por IC-CD-MS comparadas com aquelas obtidas por ICP-OES (Cl e S) e por ICP-MS (Br e I) em mel, empregando o método da MIC proposto, utilizando NH₄OH 50 mmol L⁻¹ como solução absorvedora (média ± desvio padrão, n=3).

Amostra	Cl		S		Br		I	
	IC-CD-MS	ICP-OES	IC-CD-MS	ICP-OES	IC-CD-MS	ICP-MS	IC-CD-MS	ICP-MS
GRE	320 ± 18	311 ± 2	66,2 ± 5,7	70,5 ± 2,1	0,97 ± 0,06	1,06 ± 0,07	< 0,08	< 0,06
MEX	228 ± 17	191 ± 19	35,1 ± 1,7	35,0 ± 3,5	< 0,45	0,37 ± 0,02	< 0,08	< 0,06
EUA1	117 ± 4	111 ± 5	25,5 ± 2,0	29,5 ± 2,1	< 0,45	0,31 ± 0,01	< 0,08	< 0,06
BRA4	330 ± 9	310 ± 16	17,3 ± 1,0	17,7 ± 1,2	1,50 ± 0,18	1,54 ± 0,02	< 0,08	< 0,06
CAN	64,0 ± 8,2	56,0 ± 5,3	18,0 ± 1,0	18,3 ± 1,2	< 0,45	< 0,21	< 0,08	< 0,06
EGI1	160 ± 14	136 ± 10	21,2 ± 1,9	23,5 ± 1,7	< 0,45	< 0,21	< 0,08	< 0,06

GRE: amostra da Grécia; MEX: amostra do México; EUA1: amostra dos Estados Unidos da América; BRA1: amostra do Brasil; CAN: amostra do Canadá; EGI1: amostra do Egito.

Tabela 5. Comparação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos para Cl e S por ICP-OES e IC-CD-MS, e para Br e I por ICP-MS e IC-CD-MS.

	Cl		S		Br		I	
	ICP-OES	IC-CD-MS	ICP-OES	IC-CD-MS	ICP-MS	IC-CD-MS	ICP-MS	IC-CD-MS
LOD (mg kg⁻¹)	17	15	3,8	6,9	0,15	0,21	0,03	0,04
LOQ (mg kg⁻¹)	23	21	5,5	8,7	0,21	0,45	0,06	0,08

Essa comparação é importante em vista da proposta da utilização da IC-CD-MS como alternativa às técnicas baseadas em plasma para determinação de halogênios e enxofre. Apesar de apresentar diversas vantagens, como elevada sensibilidade e capacidade de determinação de uma gama variada de analitos, as técnicas de ICP possuem algumas desvantagens que devem ser consideradas. Dentre essas, pode-se mencionar o uso de complicadas estratégias para superar inconvenientes interferências espectrais, o que também implica em maiores custos para análise.

Nesse sentido, o uso da cromatografia líquida se destaca pelos menores custos de operação e manutenção quando comparada com técnicas como a ICP-OES e ICP-MS, principalmente pela não utilização de gás Ar. Além disso, as estratégias que podem ser empregadas para contornar interferências são mais simples, como utilização de fatores de diluição e gradientes de vazão/concentração de eluente, por exemplo, não requerendo modificações instrumentais custosas. Da mesma forma, a cromatografia líquida também possui capacidade de determinação multielementar e, no caso da IC-CD-MS, uma grande versatilidade para determinar diversos tipos de analitos, bem como LODs e LOQs adequados, especialmente quando combinada com métodos de preparo de amostras adequados.

Por outro lado, além de ser um parâmetro para a avaliação da exatidão do método analítico, os resultados obtidos com a comparação entre as técnicas indicam outro aspecto pertinente. Isto é, tendo em vista a concordância apresentada entre as técnicas mencionadas para a determinação de Br, Cl, I e S, é possível inferir que todas espécies desses elementos presentes na amostra foram convertidas nos digeridos às espécies iônicas monitoradas na IC-CD-MS.

Isto é importante de ser avaliado uma vez que técnicas cromatográficas e técnicas de ICP diferem substancialmente na forma em que quantificam os analitos. No caso do presente trabalho, caso todas as espécies dos elementos não fossem completamente convertidas para Br^- , Cl^- , I^- e SO_4^{2-} , havendo outras espécies concomitantes nos digeridos, uma fração dos analitos não seria quantificada quando empregada a IC-CD-MS. Isto porque as outras espécies dos analitos teriam tempos de retenção diferentes daqueles que foram monitorados. Isso ocorre devido ao fato da cromatografia ser uma técnica de separação, e cada espécie (mesmo que de um mesmo elemento) interage de forma diferente com a f.e. e f.m.

Por outro lado, nas técnicas de espectrometria atômica como é o caso da ICP-OES e ICP-MS, os analitos são convertidos na etapa de atomização pela própria

técnica para os átomos em seu estado fundamental, e depois para o estado excitado ou ionizado. Assim, independentemente de estarem em formas diferentes nos digeridos, os elementos têm seu teor total medido através dessas técnicas. Nesse sentido, observando-se a concordância entre os resultados obtidos por técnicas com princípios de funcionamento tão diferentes, é plausível dizer que Br, Cl e S tiveram suas concentrações totais determinadas nas formas iônicas monitoradas na IC-CD-MS.

Com relação ao F e ao I, que não puderam ter suas concentrações nas amostras comparadas com a determinação por técnicas de ICP, ainda é possível fazer a mesma afirmação. Isso porque em ambos ensaios de recuperação, com adição de solução padrão e de RM, as concentrações totais de F e I foram totalmente recuperadas nas suas formas iônicas monitoradas na IC-CD-MS.

Entretanto, deve-se mencionar que essa afirmação é válida apenas para o presente caso e não deve ser tomada como verdade para outros métodos analíticos. A conversão total das diversas espécies de halogênios e S para as espécies monitoradas neste trabalho deve ser sempre avaliada, podendo variar de acordo com a matriz da amostra, concentração dos analitos e solução absorvedora utilizada.

5.4. Determinação de Br, Cl, F, I e S em única análise

Na Figura 10, estão demonstrados os cromatogramas e espectros de massa, respectivamente, obtidos com a análise de uma das soluções padrão utilizadas na curva de calibração, e um dos digeridos obtidos após a MIC (800 mg de mel, amostra “BRA1”, + 400 mg de celulose microcristalina, e NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora). É válido mencionar que os cromatogramas e espectros estão demonstrados em figuras separadas para melhor visualização, mas foram obtidos em única análise, com o mesmo fator de diluição.

Como é possível observar na Figura 10, não foram observadas interferências de matriz ou espectrais (estas no caso da detecção por massa) que impedissem a quantificação dos analitos. Nesse sentido, é possível inferir que a amostra foi decomposta de forma satisfatória com a MIC, bem como a técnica utilizada é adequada para a finalidade proposta.

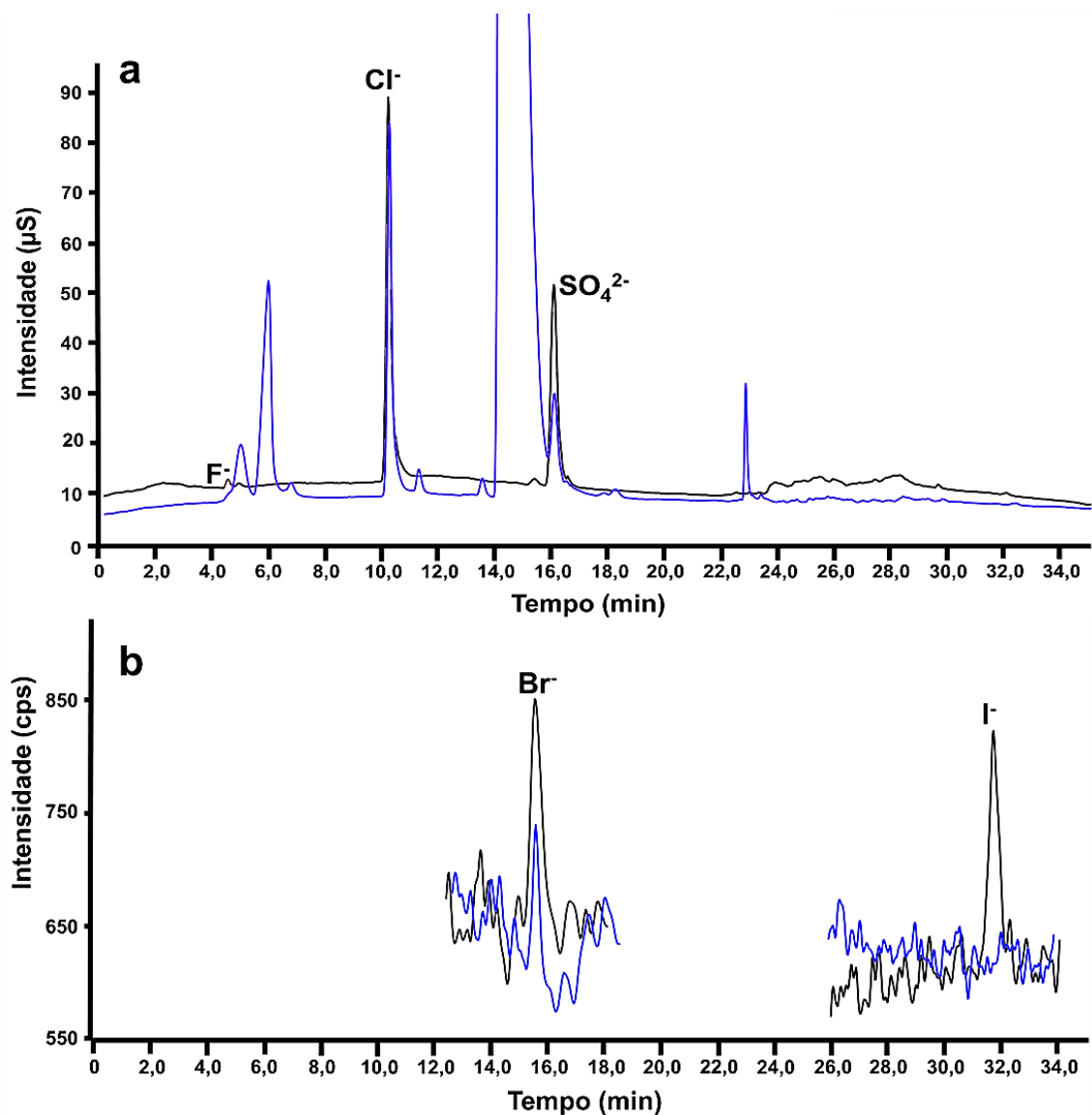


Figura 10. (—) Cromatograma obtido de uma solução padrão de Cl^- , F^- e SO_4^{2-} (a); e espectros de massa de uma solução padrão de Br^- e I^- (b). (—) Cromatograma e espectros de massa (a, b) obtidos após análise da amostra de mel utilizada na otimização do método, após preparo de amostra por MIC utilizando NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora.

5.5. Determinação de halogênios e enxofre em amostras de mel provenientes de diversos países por IC-CD-MS após decomposição por MIC

Após o desenvolvimento do método analítico apresentado nos itens anteriores, este foi aplicado para a análise de 19 amostras provenientes de 11 países. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 6. Concentrações (mg kg⁻¹) de Br, Cl, F, I e S em amostras de mel de diversos países. Determinações feitas por IC-CD-MS após decomposição por MIC (média ± desvio padrão, n=3).

Amostra	Detecção condutimétrica			Detecção de massa	
	Cl	F	S	Br	I
BRA1	274 ± 4	< 3,7	11,3 ± 1,3	< 0,45	< 0,08
BRA2	317 ± 2	< 3,7	34,4 ± 1,6	1,42 ± 0,10	< 0,08
BRA3	429 ± 7	< 3,7	16,6 ± 0,3	2,39 ± 0,23	< 0,08
BRA4	330 ± 9	< 3,7	17,3 ± 1,0	1,50 ± 0,18	< 0,08
EUA1	117 ± 4	< 3,7	25,5 ± 2,0	< 0,45	< 0,08
EUA2	451 ± 7	< 3,7	39,2 ± 2,5	1,42 ± 0,16	< 0,08
EUA3	21,8 ± 0,8	< 3,7	40,7 ± 0,6	< 0,45	< 0,08
EUA4	671 ± 20	< 3,7	84,6 ± 5,5	0,64 ± 0,04	< 0,08
IND1	262 ± 9	< 3,7	30,4 ± 1,1	< 0,45	< 0,08
IND2	590 ± 10	< 3,7	154 ± 4	0,61 ± 0,05	< 0,08
EGI1	160 ± 14	< 3,7	21,2 ± 1,9	< 0,45	< 0,08
EGI2	161 ± 4	< 3,7	34,2 ± 1,1	< 0,45	< 0,08
MEX	228 ± 17	< 3,7	35,1 ± 1,7	< 0,45	< 0,08
TUR	270 ± 9	< 3,7	70,0 ± 2,1	< 0,45	< 0,08
ITA	160 ± 7	< 3,7	21,0 ± 2,2	0,49 ± 0,04	< 0,08
CAN	64,0 ± 8,2	< 3,7	18,0 ± 1,0	< 0,45	< 0,08
ING	82,4 ± 0,8	< 3,7	39,1 ± 1,0	0,51 ± 0,01	< 0,08
GRE	320 ± 18	< 3,7	66,2 ± 5,7	0,97 ± 0,06	< 0,08
AUS+BRA	126 ± 3	< 3,7	15,3 ± 1,5	0,51 ± 0,01	< 0,08

BRA1 a 4: amostras do Brasil; EUA1 a 4: amostras dos Estados Unidos da América; IND1 a 2: amostras da Índia; EGI1 a 2: amostras do Egito; MEX: amostra do México; TUR: amostra da Turquia; ITA: amostra da Itália; CAN: amostra do Canadá; ING: amostra da Inglaterra; GRE: amostra da Grécia; AUS+BRA: amostra mista de produtos da Austrália e do Brasil.

Como demonstram os resultados observados, verificou-se ampla variação nas concentrações de Cl (21,8 ± 0,8 a 671 ± 20 mg kg⁻¹) e S (11,3 ± 1,3 a 154 ± 4 mg kg⁻¹) considerando as amostras analisadas. Como foi discutido anteriormente, essa dispersão nos valores pode estar associada com as diferentes regiões em que os méis avaliados foram produzidos, bem como suas diferentes origens botânicas e condições ambientais próximas ao local de produção. Com relação às concentrações de Br (<

0,45 a $2,39 \pm 0,23 \text{ mg kg}^{-1}$) essa dispersão foi menor, uma vez que esse elemento geralmente se encontra em baixas concentrações naturalmente, e isso se reflete em produtos de origem natural como o mel. Por fim, os valores de F e I ficaram abaixo do LOQ para todas as amostras.

No que diz respeito aos méis de origem brasileira, as quatro amostras avaliadas apresentaram valores de concentração de Cl ($\bar{x} = 337 \text{ mg kg}^{-1}$) e S ($\bar{x} = 20 \text{ mg kg}^{-1}$) próximos entre si. É válido ressaltar que essas quatro amostras apresentavam uma coloração escura bastante semelhante, bem como uma textura mais espessa e cristalizada, reforçando a similaridade entre elas. Por outro lado, os méis provenientes dos Estados Unidos da América, apresentaram diferenças entre si no que diz respeito à concentração desses elementos e aspecto físico. As amostras EUA1 e EUA2 apresentaram aspecto fluido e escuro, enquanto as amostras EUA3 e EUA4 eram viscosas e claras. Esses aspectos não parecem estar associados com as concentrações de Cl e S, com exceção das amostras com coloração escura. Estas apresentaram concentrações de S similares entre si ($\bar{x} = 32 \text{ mg kg}^{-1}$) e próximas aos teores desse elemento nas amostras de origem brasileira.

A respeito das concentrações de Br, este elemento pôde ser quantificado em três das quatro amostras de mel de origem brasileira. Além disso, nessas amostras, as concentrações de Br foram as mais elevadas ($\bar{x} = 1,8 \text{ mg kg}^{-1}$) quando comparadas com as concentrações do elemento em méis de outras origens. Outra amostra que apresentou um teor de Br próximo ($1,42 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$), é de origem norte-americana e apresenta um aspecto escuro semelhante às amostras brasileiras. Por outro lado, todas as amostras de coloração clara apresentaram concentrações mais baixas de Br ($\bar{x} = 0,56 \text{ mg kg}^{-1}$).

Entretanto, não é possível fazer afirmações precisas e confiáveis sobre a relação fator geográfico/aspecto físico/concentração elementar, tendo em vista que seria necessário analisar um número significativamente maior de amostras para realizar esse tipo de avaliação. Com relação aos méis dos demais países, estes não foram comparados tendo em vista que estavam representados por apenas uma ou duas amostras.

É interessante observar que os elementos mais abundantes na crosta terrestre dentre os que foram avaliados nesse trabalho (Cl e S) tenham apresentado uma ampla variação dentre as amostras. Isso demonstra o quanto fatores ambientais e atividades antropogênicas podem influenciar a composição de um alimento que está presente

cotidianamente na rotina alimentar de diversas populações. Por outro lado, Br e I estão presentes em baixas concentrações no mel, de forma geral. Por isso, sua presença em concentrações mais elevadas nesse alimento deve ser avaliada criteriosamente, podendo ser indicativo de atividades irregulares em locais próximos ou condições inapropriadas de produção. Além disso, como já foi descrito anteriormente, os elementos avaliados têm grande relevância no organismo humano, o que torna importante o conhecimento acerca de seus teores em alimentos.

Nesse sentido, o método analítico proposto no presente estudo pode ser uma ferramenta inovadora, útil e adequada para caracterização da composição minoritária e controle de qualidade da produção de mel. Além disso, deve-se mencionar seu potencial para utilização em análises de rotina, devido à elevada frequência analítica e realizar a determinação de halogênios e enxofre em análise única.

6. CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto nesse trabalho, pode-se concluir que foi desenvolvido um método analítico eficiente e adequado para a determinação concomitante de Br, Cl, F, I e S em mel. No método proposto, foi utilizada a MIC para o preparo de amostras e a IC-CD-MS como técnica de determinação. Com relação ao método de preparo das amostras de mel, a MIC proporcionou uma decomposição satisfatória das amostras e a obtenção de digeridos compatíveis com múltiplas técnicas de determinação, promovendo ainda um baixo consumo de reagentes e baixa geração de resíduos. A respeito do desenvolvimento do método, diversos parâmetros foram avaliados e otimizados. Dentre esses, destaca-se a escolha da solução absorvedora (NH_4OH 50 mmol L⁻¹), capaz de reter satisfatoriamente todos analitos.

Para avaliação do método analítico, foram realizados ensaios de recuperação com adição de padrão e de RMs. As recuperações obtidas variaram de 100 a 101% (Br), 95 a 101% (Cl), 94 a 96% (F) e 96 a 99% (I), enquanto que para S as recuperações obtidas nos dois testes foram de 103%. Além disso, foi realizada a comparação da determinação por IC-CD-MS com técnicas bem estabelecidas na literatura (ICP-OES e ICP-MS), e não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados obtidos (Teste-t, nível de confiança de 95%). Ainda, foi possível a obtenção de adequados LOQs para os elementos avaliados (21 para Cl, 3,7 para F, 8,7 para S, 0,45 para Br e 0,08 para I). Após ter sido verificada a adequada exatidão do método, este foi aplicado para a análise de 19 amostras de mel provenientes de diversos países.

Por fim, a respeito da técnica de determinação empregada neste trabalho, esta apresenta-se como uma quebra de paradigma para a determinação de não metais, principalmente os halogênios. A IC-CD-MS é capaz de executar a determinação de halogênios e enxofre em análise única, com adequada sensibilidade, com mínima ocorrência de interferências e sem comprometer a frequência analítica.

7. PROJEÇÕES FUTURAS

Em vista dos resultados alcançados e do potencial apresentado pelo método desenvolvido, novas avaliações serão feitas visando, principalmente, a redução dos LODs e LOQs obtidos. Nesse sentido será avaliado o uso de outros auxiliares de combustão, como amido e algodão, por exemplo. Além disso, será avaliada a execução de ciclos sucessivos de combustão das amostras, sobre a mesma solução absorvedora, como estratégia para pré-concentração dos analitos.

Visando a obtenção de uma melhor capacidade de detecção para o F, será realizada a otimização de parâmetros operacionais, bem como outras estratégias, para tornar possível a determinação desse elemento através da detecção de massa na IC-CD-MS.

Por outro lado, cabe mencionar que será dado andamento a outro trabalho que foi iniciado paralelamente a esse. O trabalho mencionado versa sobre a especiação de Cl em amostras de mel e vem sendo desenvolvido em parceria com o *National Research Council* do Canadá.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIKARA, O. z. B. Ion-exchange chromatography and its applications. *In: Column chromatography*: IntechOpen, 2013.

AHMAD, A.; KHAN, R. A.; MESAİK, M. A. Anti inflammatory effect of natural honey on bovine thrombin-induced oxidative burst in phagocytes. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 23, n. 6, p. 801-808, 2009.

AL-WAILI, N. S.; HAQ, A. Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. **Journal of medicinal food**, 7, n. 4, p. 491-494, 2004.

ALQARNI, A. S.; OWAYSS, A. A.; MAHMOUD, A. A.; HANNAN, M. A. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, 18, n. 5, p. 618-625, 2014.

ANTES, F. G.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G. *et al.* Preparo de amostras de combustíveis fósseis por piroidrólise para a determinação de flúor e cloro. **Química Nova**, 33, p. 1130-1134, 2010.

AOAC. **Official Methods of Analysis** Revision 4, 18th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2011.

ARVANITOYANNIS, I.; CHALHOUB, C.; GOTSIOU, P.; LYDAKIS-SIMANTIRIS, N. *et al.* Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. **Critical reviews in food science nutrition metabolism**, 45, n. 3, p. 193-203, 2005.

BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F.; MELLO, P. A. *et al.* Chapter 5 - Microwave-Induced Combustion. *In: FLORES, E. M. M. (Ed.). Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 143-177.

BILSEL, Y.; BUGRA, D.; YAMANER, S.; BULUT, T. *et al.* Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. **Digestive Surgery**, 19, n. 4, p. 306-312, 2002.

BOSE, R.; SAARI-NORDHAUS, R.; SONAIKE, A.; SETHI, D. S. New suppressor technology improves the ion chromatographic determination of inorganic anions and disinfection by-products in drinking water. **Journal of Chromatography A**, 1039, n. 1, p. 45-49, 2004/06/11/ 2004.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 11, de 20 de Outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Ministério da Agricultura**, Brasília (DF), pp. 16-17.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 11, de 22 de Maio de 2012. Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel, Ovos e Avestruz. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília (DF), pp. 1-16.

BU, X.; WANG, T.; HALL, G. Determination of halogens in organic compounds by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 18, n. 12, p. 1443-1451, 2003. 10.1039/B306570G.

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. **Produção de mel**. Teresina (PI): Embrapa Meio-Norte, 2002.

CHARLES, L.; PEPIN, D. Electrospray Ion Chromatography– Tandem Mass Spectrometry of Oxyhalides at Sub-ppb Levels. **Analytical Chemistry**, 70, n. 2, p. 353-359, 1998.

CHARLES, L.; PEPIN, D.; CASETTA, B. Electrospray ion chromatography– tandem mass spectrometry of bromate at sub-ppb levels in water. **Analytical chemistry**, 68, n. 15, p. 2554-2558, 1996.

COELHO JUNIOR, G. S.; PEREIRA, R. M.; HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G. *et al.* Determination of Cl and S in Edible Seaweed by Ion Chromatography after Decomposition by Microwave-induced Combustion. **REVISTA VIRTUAL DE QUIMICA**, 9, n. 2, p. 492-501, 2017.

CONNELLY, S.; DEMARTINO, J. K.; BOGER, D. L.; WILSON, I. A. Biological and structural evaluation of 10 R-and 10 S-methylthio-DDACTHF reveals a new role for sulfur in inhibition of glycinamide ribonucleotide transformylase. **Biochemistry**, 52, n. 30, p. 5133-5144, 2013.

CORNELIS, R.; CARUSO, J.; CREWS, H.; HEUMANN, K. **Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health**. Wiley Online Library, 2005. 0470855983.

COSTA, V. C.; PEREIRA, R. M.; MELLO, J. E.; BRUM, J. R. *et al.* Indirect determination of chlorine and fluorine in eye shadow by ion chromatography after an eco-friendly sample preparation method based on combustion reaction. **Microchemical Journal**, 150, p. 104125, 2019.

COSTA, V. C.; PICOLOTO, R. S.; HARTWIG, C. A.; MELLO, P. A. *et al.* Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical bioanalytical chemistry**, 407, n. 26, p. 7957-7964, 2015.

CZIPA, N.; ANDRÁSI, D.; KOVÁCS, B. Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. **Food Chemistry**, 175, p. 536-542, 2015/05/15/ 2015.

DA SILVA, P. M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O. *et al.* Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, 196, p. 309-323, 2016.

DRUZIAN, G. T.; NASCIMENTO, M. S.; SANTOS, R. F.; PEDROTTI, M. F. *et al.* New possibilities for pharmaceutical excipients analysis: Combustion combined with pyrohydrolysis system for further total chlorine determination by ICP-OES. **Talanta**, 199, p. 124-130, 2019/07/01/ 2019.

EFEM, S. E. E.; IWARA, C. I. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. **Infection**, 20, n. 4, p. 227-229, 1992.

EHMANN, W. D.; VANCE, D. E. **Radiochemistry and nuclear methods of analysis**. Wiley New York, 1991. 0471600768.

FAO. **Codex Alimentarius. Codex standard for olive oils and olive pomace oils**. FAO/WHO. Roma. 1981a.

FAO. **Codex Alimentarius. Standard for Honey. CXS 12-1981**. FAO/WHO. Roma. 1981b.

FERMO, P.; BERETTA, G.; FACINO, R. M.; GELMINI, F. *et al.* Ionic profile of honey as a potential indicator of botanical origin and global environmental pollution. **Environmental pollution**, 178, p. 173-181, 2013.

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, n. 9, p. 1051-1064, 2007.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A. *et al.* Microwave-Assisted Sample Combustion: A Technique for Sample Preparation in Trace Element Determination. **Analytical Chemistry**, 76, n. 13, p. 3525-3529, 2004.

FLORES, E. M. M.; MELLO, P. A.; KRZYZANIAK, S. R.; CAUDURO, V. H. *et al.* Challenges and Trends for Halogen Determination by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Review. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2020.

FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F. *et al.* Determination of Halogens in Coal after Digestion Using the Microwave-Induced Combustion Technique. **Analytical Chemistry**, 80, n. 6, p. 1865-1870, 2008.

FRITZ, J. S. Ion chromatography. **Analytical Chemistry**, 59, n. 4, p. 335A-344A, 1987.

FRITZ, J. S.; GJERDE, D. T. Chapter 1 - Introduction and Overview. *In: Ion Chromatography*. 3a ed., 2000a. p. 1-21.

FRITZ, J. S.; GJERDE, D. T. Chapter 4 - Detectors. *In: Ion Chromatography*. 3a ed., 2000b. p. 59-80.

FRITZ, J. S.; GJERDE, D. T. Chapter 6 - Anion Chromatography. *In: Ion Chromatography*. 3a ed., 2000c. p. 101-140.

FUGE, R. Sources of halogens in the environment, influences on human and animal health. **Environmental Geochemistry Health**, 10, n. 2, p. 51-61, 1988.

GHOSH, S.; CHALLAMALLA, P.; BANJI, D. Negative ion mode mass spectrometry-an overview. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, 2, p. 1462-1471, 2012.

GILCHRIST, E. S.; HEALY, D. A.; MORRIS, V. N.; GLENNON, J. D. A review of oxyhalide disinfection by-products determination in water by ion chromatography and ion chromatography-mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, 942, p. 12-22, 2016.

GINÉ-ROSIAS, M. F. G. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. Piracicaba (SP): CENA, USP, 1998.

GINÉ-ROSIAS, M. F. G. **Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS)**. Piracicaba (SP): CENA, USP, 1999.

GIOUMOUXOUZIS, C. I.; KOUSKOURA, M. G.; MARKOPOULOU, C. K. Negative electrospray ionization mode in mass spectrometry: A new perspective via modeling. **Journal of Chromatography B**, 998, p. 97-105, 2015.

GUO, W.; JIN, L.; HU, S.; GUO, Q. Method Development for the Determination of Total Fluorine in Foods by Tandem Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with a Mass-Shift Strategy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65, n. 16, p. 3406-3412, 2017.

HO, C. S.; LAM, C.; CHAN, M.; CHEUNG, R. *et al.* Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, 24, n. 1, p. 3-12, 2003.

HOEHNE, L.; PICOLATO, R. S.; ENDERS, M. S. P.; DRUZIAN, G. T. *et al.* Feasibility of pyrohydrolysis as a clean method for further fluorine determination by ISE and IC in high purity nuclear grade alumina. **Microchemical Journal**, 146, p. 645-649, 2019.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6a ed. Bookman, 2009. 8577804607.

HOUK, R. S.; THOMPSON, J. J. Inductively coupled plasma mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, 7, n. 4, p. 425-461, 1988.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=25474&t=publicacoes>.

JAMARI, N. L. A.; DOHMANN, J. F.; RAAB, A.; KRUPP, E. M. *et al.* Novel non-target analysis of fluorine compounds using ICPMS/MS and HPLC-ICPMS/MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 32, n. 5, p. 942-950, 2017. 10.1039/C7JA00051K.

KHANJANI, P.; KING, A. W. T.; PARTL, G. J.; JOHANSSON, L.-S. *et al.* Superhydrophobic Paper from Nanostructured Fluorinated Cellulose Esters. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 10, n. 13, p. 11280-11288, 2018.

KIRK, K. L. **Biochemistry of the elemental halogens and inorganic halides**. 1a ed. Springer Science & Business Media, 1991. 1468458175.

KROPF, U.; KOROŠEC, M.; BERTONCELJ, J.; OGRINC, N. *et al.* Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. **Food Chemistry**, 121, n. 3, p. 839-846, 2010.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. 2ª edição, revisão ampliada ed. São Paulo: EditSBQ, 2019. 586 p. 978-85-64099-22-7.

KRUBE, A.; KAUPMEES, K.; LIIGAND, J.; LEITO, I. Negative electrospray ionization via deprotonation: predicting the ionization efficiency. **Analytical chemistry**, 86, n. 10, p. 4822-4830, 2014.

LU, Z.; LIU, Y.; BARRETO, V.; POHL, C. *et al.* Determination of anions at trace levels in power plant water samples by ion chromatography with electrolytic eluent generation and suppression. **Journal of Chromatography A**, 956, n. 1, p. 129-138, 2002.

MCNAUGHT, A. D. **Compendium of chemical terminology**. Blackwell Science Oxford, 1997.

MELLO, J. E.; NOVO, D. L. R.; COELHO JUNIOR, G. S.; SCAGLIONI, P. T. *et al.* A Green Analytical Method for the Multielemental Determination of Halogens and Sulfur in Pet Food. **Food Analytical Methods**, 13, n. 1, p. 131-139, 2020.

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; DUARTE, F. A.; BIZZI, C. A. *et al.* Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical bioanalytical chemistry**, 405, n. 24, p. 7615-7642, 2013.

MENEGÁRIO, A.; GINÉ, M. Determinações multi-elementares de metais, sulfato e cloreto em amostras de águas por espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). **Química Nova**, 21, n. 4, p. 414-417, 1998.

MERCOSUL. MERCOSUL/GMC/RES. Nº 56/99. Regulamento Técnico MERCOSUL "Identidade e Qualidade do Mel". **MERCOSUL**, Montevideu - UY, pp. 1-8.

MESKO, M. F. **Combustão iniciada por micro-ondas em sistema fechado para a decomposição de amostras biológicas**. 2004. -, Universidade Federal de Santa Maria.

MESKO, M. F. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímico e alimentos após combustão iniciada por micro-ondas**. 2008. -, Universidade Federal de Santa Maria.

MESKO, M. F.; COSTA, V. C.; PEREIRA, R. M.; HARTWIG, C. A. Chlorine and Fluorine Determination in Eye-Pencil: Development of an Eco-Friendly Sample Preparation Method for Ion Chromatography Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 30, n. 10, p. 2191-2198, 2019.

MESKO, M. F.; COSTA, V. C.; PICOLATO, R. S.; BIZZI, C. A. *et al.* Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: challenges and trends of sample preparation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 31, n. 6, p. 1243-1261, 2016.

MESKO, M. F.; PEREIRA, R. M.; SCAGLIONI, P. T.; NOVO, D. L. R. Single analysis of human hair for determining halogens and sulfur after sample preparation based on combustion reaction. **Analytical bioanalytical chemistry**, 411, p. 4873-4881, 2019.

MESKO, M. F.; TORALLES, I. G.; HARTWIG, C. A.; COELHO JR, G. S. *et al.* Bromine and iodine contents in raw and cooked shrimp and its parts. **Journal of agricultural food chemistry**, 64, n. 8, p. 1817-1822, 2016.

MEYERS, L. D.; HELLWIG, J. P.; OTTEN, J. J. **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. National Academies Press, 2006. 0309157420.

MULLER, A. L. H.; MULLER, C. C.; LYRA, F.; MELLO, P. A. *et al.* Determination of toxic elements in nuts by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion. **Food analytical methods**, 6, n. 1, p. 258-264, 2013.

MÜLLER, A. L. H.; PICOLOTO, R. S.; MELLO, P. A.; FERRÃO, M. F. *et al.* Total sulfur determination in residues of crude oil distillation using FT-IR/ATR and variable selection methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 89, p. 82-87, 2012.

MULLER, E. I.; SOUZA, J. P.; ANSCHAU, K. F.; ENDERS, M. S. P. *et al.* Determination of Br, Cl and I in honey using ICP-based techniques following microwave-assisted wet digestion with alkaline H₂O₂ in a single reaction chamber. **Analytical Methods**, 9, n. 4, p. 649-654, 2017. 10.1039/C6AY02865A.

NAOZUKA, J.; DA VEIGA, M. A. M. S.; OLIVEIRA, P. V.; DE OLIVEIRA, E. Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 18, n. 8, p. 917-921, 2003.

NIMNI, M. E.; HAN, B.; CORDOBA, F. Are we getting enough sulfur in our diet? **Nutrition metabolism**, 4, n. 1, p. 24, 2007.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; DE SOUSA, R. A.; CADORE, S. *et al.* Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 61, n. 5, p. 465-495, 2006/05/01/ 2006.

NOVO, D. L. R.; MELLO, J. E.; RONDAN, F. S.; HENN, A. S. *et al.* Bromine and iodine determination in human saliva: Challenges in the development of an accurate method. **Talanta**, 191, p. 415-421, 2019/01/01/ 2019.

NOVO, D. L. R.; PEREIRA, R. M.; HENN, A. S.; COSTA, V. C. *et al.* Are there feasible strategies for determining bromine and iodine in human hair using interference-free plasma based-techniques? **Analytica chimica acta**, 1060, p. 45-52, 2019.

NUNES, T. S.; MULLER, C. C.; BALESTRIN, P.; MULLER, A. L. H. *et al.* 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, n. 5, p. 2129-2134, 2015. 10.1039/C4AY02714K.

O'BRIEN, S. E.; ACON, B. W.; BOULYGA, S. F.; BECKER, J. S. *et al.* Reduction of molecular ion interferences with hexapole collision cell in direct injection nebulization-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 18, n. 3, p. 230-238, 2003. 10.1039/B209047N.

PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; DUARTE, F. A.; SANTOS, M. F. P. *et al.* Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion. **Journal of Chromatography A**, 1213, n. 2, p. 249-252, 2008.

PEREIRA, L. S.; BIZZI, C. A.; SCHMIDT, L.; MESKO, M. F. *et al.* Evaluation of nitrates as igniters for microwave-induced combustion: understanding the mechanism of ignition. **RSC Advances**, 5, n. 13, p. 9532-9538, 2015.

PEREIRA, L. S. F.; ENDERS, M. S. P.; IOP, G. D.; MELLO, P. A. *et al.* Determination of Cl, Br and I in soils by ICP-MS: microwave-assisted wet partial digestion using H₂O₂ in an ultra-high pressure system. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 33, n. 4, p. 649-657, 2018. 10.1039/C7JA00365J.

PEREIRA, R. M.; COSTA, V. C.; HARTWIG, C. A.; PICOLOTO, R. S. *et al.* Feasibility of halogen determination in noncombustible inorganic matrices by ion chromatography after a novel volatilization method using microwave-induced combustion. **Talanta**, 147, p. 76-81, 2016.

PICOLOTO, R. S.; DONEDA, M.; FLORES, E. L.; MESKO, M. F. *et al.* Simultaneous determination of bromine and iodine in milk powder for adult and infant nutrition by plasma based techniques after digestion using microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 107, p. 86-92, 2015.

PICOLOTO, R. S.; ENDERS, M. S.; DONEDA, M.; IOP, G. D. *et al.* An in situ pre-concentration method for fluorine determination based on successive digestions by microwave-induced combustion. **Talanta**, 194, p. 314-319, 2019.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, 30, n. 1, p. 19-34, 2009.

PRYSTUPA, J. Fluorine—a current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides. **Toxicology mechanisms methods**, 21, n. 2, p. 103-170, 2011.

RONDAN, F. S.; HARTWIG, C. A.; NOVO, D. L.; MORAES, D. P. *et al.* Ultra-trace determination of bromine and iodine in rice by ICP-MS after microwave-induced combustion. **Journal of Food Composition Analysis**, 66, p. 199-204, 2018.

RONDAN, F. S.; JUNIOR, G. S. C.; PEREIRA, R. M.; HENN, A. S. *et al.* A versatile green analytical method for determining chlorine and sulfur in cereals and legumes. **Food chemistry**, 285, p. 334-339, 2019.

SILVA, J. S.; DIEHL, L. O.; FROHLICH, A. C.; COSTA, V. C. *et al.* Determination of bromine and iodine in edible flours by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion. **Microchemical Journal**, 133, p. 246-250, 2017.

SMALL, H.; STEVENS, T. S.; BAUMAN, W. C. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. **Analytical Chemistry**, 47, n. 11, p. 1801-1809, 1975/09/01 1975.

SNEDDON, J.; HARDAWAY, C.; BOBBADI, K.; REDDY, A. Sample Preparation of Solid Samples for Metal Determination by Atomic Spectroscopy---An Overview and Selected Recent Applications. **Applied Spectroscopy Reviews**, 41, p. 1-14, 03/01 2006.

SWELLAM, T.; MIYANAGA, N.; ONOZAWA, M.; HATTORI, K. *et al.* Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. **International journal of urology**, 10, n. 4, p. 213-219, 2003.

TETTE, P. A. S.; GUIDI, L. R.; DE ABREU GLÓRIA, M. B.; FERNANDES, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, 149, p. 124-141, 2016.

TORALLES, I. G.; COELHO JR, G. S.; COSTA, V. C.; CRUZ, S. M. *et al.* A fast and feasible method for Br and I determination in whole egg powder and its fractions by ICP-MS. **Food chemistry**, 221, p. 877-883, 2017.

VANHOE, H.; VAN ALLEMEERSCH, F.; VERSIECK, J.; DAMS, R. Effect of solvent type on the determination of total iodine in milk powder and human serum by

inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analyst**, 118, n. 8, p. 1015-1019, 1993.

VINCEVIČA-GAILE, Z. Macro- and trace elements in honey. **Latvijas Lauksaimniecības Universitāte - Raksti**, n. No.25, p. 54-66, 2010.

VOBECKY, M.; BABICKY, A.; LENER, J. Effect of increased bromide intake on iodine excretion in rats. **Biological trace element research**, 55, n. 3, p. 215-219, 1996.

WALTON, H. F. Ion exchange in analytical chemistry. **Journal of Chemical Education**, 42, n. 2, p. 111, 1965.

WANG, F.; DICINOSKI, G. W.; ZHU, Y.; HADDAD, P. R. Simultaneous determination of monofluoroacetate, difluoroacetate and trifluoroacetate in environmental samples by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1032, n. 1, p. 31-35, 2004.

WEISS, J.; JENSEN, D. Modern stationary phases for ion chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 375, n. 1, p. 81-98, 2003.

WEISS, S. J.; TEST, S. T.; ECKMANN, C. M.; ROOS, D. *et al.* Brominating oxidants generated by human eosinophils. **Science**, 234, n. 4773, p. 200-203, 1986.

WHITE, J. W. Moisture in honey: Review of chemical and physical methods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 52, p. 729-737, 1969.

WHITNEY, E. N.; CATALDO, C. B.; ROFLES, S. R. **Understanding Normal and Clinical Nutrition**. New York: West Publishing Company, 2002.

WHO. **Trace elements in human nutrition and health**. World Health Organization Geneva. 1996.

WHO. **Bromide in drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. World Health Organization. Geneva. 2009.

ZIMMERMANN, M. B.; JOOSTE, P. L.; PANDAV, C. S. Iodine-deficiency disorders. **The Lancet**, 372, n. 9645, p. 1251-1262, 2008.

ANEXOS



Fernanda Balbinot <fer.p.balbinot@gmail.com>

ABC-00296-2020 - Letter of Acknowledgement from Analytical and Bioanalytical Chemistry

1 mensagem

ABC Editorial Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>

10 de fevereiro de 2020 15:34

Responder a: abc@springer.com

Para: marciamesko@yahoo.com.br, marcia.mesko@pq.cnpq.br

Cc: marciamesko@yahoo.com.br, marcia.mesko@pq.cnpq.br, fer.p.balbinot@gmail.com,

priscilascaglioni@gmail.com, marielesn@gmail.com, rspicoloto@gmail.com, vanizecaldeira@gmail.com

Date: 10-Feb-2020

Manuscript No. ABC-00296-2020

Title: Determination of Halogen and Sulfur in Honey: A Green Analytical Method Using a Single Analysis

Authors: Foster Mesko, Marcia; Balbinot, Fernanda; Scaglioni, Priscila; Nascimento, Marieli; Picoloto, Rochele; Costa, Vanize

Dear Dr. Foster Mesko,

Thank you for the submission of your above mentioned manuscript. Your manuscript has been received in the Analytical and Bioanalytical Chemistry Editorial Office and is in the process of being forwarded to the handling Editor.

Please be sure to mention the manuscript number in all future correspondence or when calling the office with questions. If there are any corrections to your e-mail address or street address, please let us know.

Yours sincerely,

Dr. Nicola Oberbeckmann-Winter

Managing Editor

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Springer

Tiergartenstr. 17 | 69121 Heidelberg | Germany

tel +49-6221-487-8377

fax +49-6221-487-68377

abc@springer.com

www.springer.com/abc

Branch of Springer-Verlag GmbH, Heidelberger Platz 3, 14197 Berlin, Germany

Registered Office: Berlin | Local Court (Amtsgericht) Berlin-Charlottenburg, HRB 91881 B

Directors: Martin Mos, Dr. Ulrich Vest, Dr. Niels Peter Thomas

New Impact Factor 2018: 3.286, total cites: 30,057 !
