

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 HALOGÊNIO E
ENXOFRE EM CHÁS EM ÚNICA ANÁLISE**

Larissa Cristine Andrade da Costa

Pelotas, 2023

Larissa Cristine Andrade da Costa

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO E
ENXOFRE EM CHÁS EM ÚNICA ANÁLISE**

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

Coorientador: Dr. Filipe Soares Rondan

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C837d Costa, Larissa Cristine Andrade da

Desenvolvimento de método para determinação de halogênios e enxofre em chás em única análise / Larissa Cristine Andrade da Costa ; Márcia Foster Mesko, orientadora ; Filipe Soares Rondan, coorientador. — Pelotas, 2023.

85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Chás. 2. Preparo de amostras. 3. Halogênios. 4. Combustão iniciada por micro-ondas. 5. Cromatografia de íons. I. Mesko, Márcia Foster, orient. II. Rondan, Filipe Soares, coorient. III. Título.

CDD : 663.94

Larissa Cristine Andrade da Costa

Desenvolvimento de método para determinação de halogênios e enxofre em chás em única análise

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

Data da defesa: 03 de agosto de 2023.

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **MARCIA FOSTER MESKO**
Data: 09/08/2023 14:37:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko

Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

Documento assinado digitalmente
 **WILIAM BOSCHETTI**
Data: 09/08/2023 18:46:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wiliam Boschetti

Doutor em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Documento assinado digitalmente
 **PRISCILA TESSMER SCAGLIONI**
Data: 15/08/2023 11:43:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Priscila Tessmer Scaglioni

Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivanil Carlos e Ana Giselle, e também a toda minha família que apesar de uma criação muito simples, sempre me ensinaram a ser resiliente e otimista para alcançar os meus sonhos e objetivos.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel), ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ/UFPel) pela disponibilidade para a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Aos órgãos públicos de fomento (CNPq e FAPERGS) que indiretamente ou diretamente também contribuíram para a boa execução deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a **Márcia F. Mesko**, que além de orientadora foi também amiga, me proporcionando experiências singulares que me fizeram amadurecer como pessoa e profissional. És minha inspiração diária no que trata de liderança feminina na pesquisa científica.

Ao meu coorientador Dr. **Filipe Soares Rondan** por cada ensinamento, pela paciência em cada etapa deste estudo e mais ainda pela disponibilidade até mesmo nas horas mais inesperadas.

Às (aos) minhas (meus) colegas do **Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais (LCCBio, UFPel)** por todas as contribuições, todos de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Em particular para **Fernanda Pitt Balbinot** que foi muito solícita em me acompanhar durante esse período, ajudando o máximo possível.

Aos membros da banca avaliadora **Prof.^a Dr.^a Priscila Tessmer Scaglioni** e ao **Prof. Dr. Wiliam Boschetti** por aceitarem compor esta banca de avaliação.

À minha família por serem meu suporte e motivação nesta etapa da vida, e em todas as outras. Agradeço por terem sido presentes até mesmo com a distância. Vocês são a causa de tudo.

Às minhas amigas **Emilly Cruz de Silva** e **Victoria Ross Soares** por terem sido todo o suporte emocional necessário nessa etapa decisiva da vida. Agradeço à ambas por todo companheirismo e, principalmente, por todos os acalantos nos momentos de aflição.

À **Djanira Maciel**, por todo auxílio e serviços prestados.

Aos técnicos administrativos por cederem materiais e equipamentos sempre que necessário. Às (aos) funcionárias (os) terceirizadas (os), pela manutenção do bom funcionamento dos nossos prédios.

Obrigada.

*“Mesmo as noites totalmente sem estrelas
podem anunciar a aurora de uma grande
realização.”*

Martin Luther King

RESUMO

COSTA, Larissa Cristine Andrade da. **Desenvolvimento de método para determinação de halogênios e enxofre em chás em única análise.** 2023. 85f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Neste estudo, a combustão iniciada por micro-ondas (Microwave-Induced Combustion – MIC) foi avaliada como método de preparo de amostras para variados tipos de chás (chá-preto, chá-verde, erva-cidreira, boldo e hortelã) visando, posteriormente, à determinação de flúor, cloro, bromo, iodo, e enxofre por cromatografia de íons (IC). Foram avaliados alguns parâmetros, como a massa de amostra e a solução absorvedora (água ultrapura e NH_4OH 25, 50, 100 e 150 mmol L^{-1}), levando em consideração os analitos e a técnica de determinação utilizada. A massa máxima de amostra possível de ser decomposta foi de 900 mg, na forma de comprimidos, e a solução absorvedora escolhida (por meio de ensaios de recuperação) foi NH_4OH 100 mmol L^{-1} , a qual proporcionou a adequada estabilização dos analitos. Um material de referência certificado foi analisado para a avaliação da exatidão do método proposto. Recuperações (Br e I) e concordâncias (Cl, F e S) adequadas (101 a 107%) foram obtidas para todos os analitos. O método proposto foi aplicado para amostras de chá e suas concentrações variaram em uma faixa de 549 mg kg^{-1} a 2549 mg kg^{-1} para cloro, para enxofre de 786 mg kg^{-1} a 4023 mg kg^{-1} , de 223 mg kg^{-1} a 828 mg kg^{-1} para flúor, enquanto que as concentrações de bromo e iodo foram abaixo dos limites de quantificação (42 mg kg^{-1} , 80 mg kg^{-1} , respectivamente) para a análise de diferentes tipos de chás.

Palavras-chave: chás; preparo de amostras; halogênios; combustão iniciada por micro-ondas; cromatografia de íons.

ABSTRACT

COSTA, Larissa Cristine Andrade. **Development of a method for the determination of halogens and sulfur in teas in a single analysis**. 2023. 85f. Dissertation (Master's in Chemistry) – Graduate Program in Chemistry Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

In this study, microwave-initiated combustion (Microwave-Induced Combustion – MIC) was evaluated as a sample preparation method for various types of teas (black tea, green tea, lemon balm, boldo and mint) aiming to, subsequently, the determination of fluorine, chlorine, bromine, iodine, and sulfur by ion chromatography (IC). Some parameters were evaluated, such as the sample mass and the absorbing solution (ultrapure water and NH_4OH 25, 50, 100 and 150 mmol L^{-1}), taking into account the analytes and the determination technique used. The maximum sample mass possible to be decomposed was 900 mg, in the form of tablets, and the absorbing solution chosen (through recovery tests) was NH_4OH 100 mmol L^{-1} , which provided adequate stabilization of the analytes. A certified reference material was analyzed to evaluate the accuracy of the proposed method. Adequate recoveries (Br and I) and agreements (Cl, F and S) (101 to 107%) were obtained for all analytes. The proposed method was applied to tea samples and their concentrations varied in a range from 549 mg kg^{-1} to 2549 mg kg^{-1} for chlorine, for sulfur from 786 mg kg^{-1} to 4023 mg kg^{-1} , from 223 mg kg^{-1} to 828 mg kg^{-1} for fluorine, while bromine and iodine concentrations were below the limits of quantification (42 mg kg^{-1} , 80 mg kg^{-1} , respectively) for the analysis of different types of teas.

Keywords: teas; sample preparation; halogens; microwave-induced combustion; ion chromatography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem demonstrativa do forno micro-ondas Multiwave 3000® e seus componentes (a) frascos de quartzo com suportes de quartzo (b) frascos de quartzo com capa de proteção acoplados ao rotor (c) equipamento de forno micro-ondas modelo Multiwave 3000. Fonte: Google Imagens..... 36
- Figura 2.** Amostras obtidas no centro comercial de Pelotas/RS e removidas dos sachês (a) chá verde (b) chá preto (c) chá de erva-cidreira (d) chá de boldo (e) chá de hortelã..... 41
- Figura 3.** Diagrama demonstrativo das etapas realizadas para a avaliação da solução absorvedora..... 43
- Figura 4.** (a) Amostras de 100 mg de chá preto na forma de invólucro (b) danificação na tampa de vedação causada pela decomposição das amostras quando utilizadas massas superiores a 100 mg na forma de invólucro. 51
- Figura 5.** (a) Amostra na forma de comprimido com massa de 500 mg (b) amostra na forma de comprimido com massa de 600 mg utilizando comprimidos sobrepostos de 500 e 100 mg para a obtenção de maiores massas de amostras. 51
- Figura 6.** Aspecto visual da amostra ainda em processo de combustão após etapa de irradiação. 52
- Figura 7.** (a) Solução obtida após decomposição de 900 mg (500 mg + 400 mg) de amostra de chá. (b) resíduo apresentado em suporte de quartzo após a decomposição de 1000 mg (500 mg + 500 mg) de amostra de chá. 54
- Figura 8.** Recuperações obtidas para (■) flúor, (■) cloro, (■) enxofre, (■) bromo e (■) iodo em chá preto após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras para o nível de adição de 100%, (n=3). 58
- Figura 9.** Recuperações obtidas para (■) flúor, (■) cloro, (■) enxofre, (■) bromo e (■) iodo em chá preto após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras para o nível de adição de 50% (n=3). 60
- Figura 10.** Recuperações obtidas para (■) flúor, (■) cloro, (■) enxofre, (■) bromo e (■) iodo em chá preto após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras para o nível de adição de 25%, (n=3). 61

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Principais princípios ativos dos tipos de chás e suas contribuições para a saúde.

..... 23

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios e enxofre em chás e/ou matrizes similares (continua)..... | 27 |
| Tabela 2. Parâmetros operacionais para a determinação da concentração total de halogênios na forma de F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ e I ⁻ e enxofre na forma de SO ₄ ²⁻ por Cromatografia de Íons com Detecção Condutimétrica (Ion Chromatography with Conductimetric Detection Coupled – IC-CD). | 45 |
| Tabela 3. Concentrações dos analitos nas infusões de chá (média ± desvio padrão, n=3). | 50 |
| Tabela 4. Programa de irradiação com micro-ondas utilizado para a combustão de amostras de chá. | 53 |
| Tabela 5. Concentração dos analitos na amostra de chá preto determinadas por IC-CD após a decomposição por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras (média ± desvio padrão, n=3). | 56 |
| Tabela 6. Faixas de trabalho e coeficientes de correlação linear obtidos no trabalho desenvolvido..... | 62 |
| Tabela 7. Concordância entre os valores informados com os obtidos após análise do CRM BCR 060, planta aquática, utilizando o método proposto neste estudo (média ± desvio padrão, n=3). | 63 |
| Tabela 8. Limites de detecção e de quantificação obtidos para o método proposto. | 64 |
| Tabela 9. Comparações das concentrações obtidas para Cl, F e S em chá preto pelo método proposto neste trabalho e pelos métodos 915.01, 975.04 e 923.01 recomendados pela AOAC (média ± desvio-padrão, desvio padrão relativo, n=3)... .. | 65 |
| Tabela 10. Comparação da execução dos métodos oficiais e proposto. | 67 |
| Tabela 11. Concentração de halogênios e enxofre obtidos com o método proposto utilizando 900 mg de amostra e solução absorvedora de 100 mmol L ⁻¹ de NH ₄ OH (média ± desvio-padrão, desvio padrão relativo, n=3). | 69 |
| Tabela 12. Comparação entre as concentrações dos analitos obtidas nos chás e nas suas respectivas infusões..... | 72 |
| Tabela 13. Volume necessário para ingestão de infusões de chá em relação às ingestões diárias recomendadas. | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C – Antes de Cristo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

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

CRM – Certified Reference Material: Material de Referência Certificado

EDXRF – *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*: Espectrometria de Fluorescência de Dispersão de Raios-x

EFSA - *European Food Safety Authority*: Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

HR-CS-MAS – *High Resolution-continuum Source-molecular Absorption Spectrometry*: Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua

IC – *Ion Chromatography*: Cromatografia de Íons

IC-CD – *Ion Chromatography with Conductimetric Detection*: Cromatografia de Íons com Detecção Condutimétrica

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

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IR – Infravermelho

ISE – *Ion-Selective Electrode*: Eletrodo Íon-seletivo

LDPE – *Low Density Polyethylene*: Polietileno de Baixa Densidade

LOD – *Limit of Detection*: Limite de Detecção

LOQ – *Limit of Quantification*: Limite de Quantificação

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

OMS – Organização Mundial da Saúde

PTFE – *Polytetrafluoroethylene*: Politetrafluoretileno

RSD – *Relative Standard Deviation*: Desvio Padrão Relativo

SD – *Standard Deviation*: Desvio-padrão

UV-Vis – Espectrofotometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível

VMP – Valores Máximos Permitidos

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1. Objetivo geral | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos | 19 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 3.1. Aspectos gerais de plantas utilizadas como chá | 20 |
| 3.2. Halogênios e enxofre: aspectos relevantes..... | 24 |
| 3.2.1. Métodos de preparo e determinação de não-metals em plantas e matrizes similares | 26 |
| 3.3. Métodos de preparo de amostras para posterior determinação de não-metals | 29 |
| 3.3.1. Digestão por via úmida..... | 30 |
| 3.3.2. Métodos de combustão em sistemas fechados | 31 |
| 3.3.2.1. Combustão iniciada por micro-ondas..... | 31 |
| 3.4. Técnicas instrumentais para determinação de não-metals | 32 |
| 3.4.1. Cromatografia de íons..... | 33 |
| 3.5. Métodos oficiais para quantificação de não-metals em folhas de plantas..... | 34 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1. Instrumentação | 36 |
| 4.2. Reagentes..... | 37 |
| 4.3. Materiais diversos e procedimentos de descontaminação | 39 |
| 4.4. Amostras | 40 |
| 4.5. Preparo de amostras de chá por infusão | 41 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.6. | Otimização da MIC para o preparo de amostras de chá | 42 |
| 4.7. | Parâmetros de mérito analítico: faixa linear, limites de quantificação e de detecção, exatidão e precisão | 43 |
| 4.8. | Determinação de halogênios e enxofre por IC-CD | 45 |
| 4.9. | Preparo das amostras de chá por métodos oficiais | 46 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 49 |
| 5.1. | Desenvolvimento de método para a determinação de halogênios e enxofre em chás por IC-CD após decomposição por MIC | 49 |
| 5.1.1. | Avaliação das infusões | 49 |
| 5.1.2. | Avaliação da massa máxima de amostra possível de ser decomposta por MIC | 50 |
| 5.1.3. | Escolha da solução absorvedora | 54 |
| 5.1.4. | Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, análise de CRM | 62 |
| 5.2. | Determinação de halogênios e enxofre por métodos oficiais (AOAC) | 64 |
| 5.3. | Determinação de halogênios e enxofre em diferentes chás por IC-CD após a MIC | 68 |
| 5.4. | Comparação da concentração total de halogênios e enxofre em chás diversos e suas respectivas infusões | 70 |
| 5.5. | Estimativa da ingestão diária de halogênios e enxofre | 73 |
| 6. | CONCLUSÃO | 75 |
| 7. | PROJEÇÕES FUTURAS | 76 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |

1. INTRODUÇÃO

O consumo de chá com finalidade terapêutica é uma tradição milenar, portanto, sua história e origem são muito difundidas e indefinidas. Os primeiros relatos de consumo de chá surgiram em meados de 200 a.C (VALENZUELA, 2004). Nesse período, já eram mencionados os efeitos desintoxicantes das plantas utilizadas para o preparo desses chás, e então surgiu a designação de plantas medicinais. Devido às suas propriedades medicinais, o chá se popularizou na sociedade tornando-se a segunda bebida não alcoólica mais consumida do mundo (PAN, *et al.*, 2022). A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), prevê um aumento de 2,2% na produção mundial de chá preto, atingindo uma produção de até 4,4 milhões de toneladas em 2027 (FAO, 2018).

A utilização de plantas para tratamentos, cura e/ou prevenção de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. Assim, muitas plantas passaram a ser utilizadas em forma de infusão e alguns benefícios à saúde, como o auxílio em tratamentos gastrointestinais e doenças respiratórias, foram observados posteriormente. Por isso, há uma maior diversidade de plantas na forma de infusão para fins medicinais (BRAIBANTE, *et al.*, 2014). Porém, as plantas possuem diversos compostos em sua composição, e a maioria são desconhecidos. Os halogênios e o enxofre, por exemplo, são elementos que podem estar presentes nas plantas de maneira natural, e permanecer durante o desenvolvimento da planta até ser ingerida na forma de infusão. Esses elementos, quando em concentrações inadequadas, podem ocasionar algumas complicações à saúde humana, dependendo da concentração e da forma ingerida (CAO, *et al.*, 2005). Assim, a concentração desses elementos deve ser determinada para garantir a qualidade e segurança da bebida que será ingerida.

Dentre as técnicas analíticas comumente utilizadas para a determinação da concentração de halogênios e enxofre nas mais variadas amostras, pode-se citar a cromatografia de íons utilizando detecção por condutividade ou por espectrometria de massas, e a potenciometria com eletrodo íon-seletivo. Porém, anteriormente à etapa de determinação, é necessário realizar o preparo de amostra, de maneira a transformá-la em uma solução compatível com a técnica de determinação (KRUG, *et al.*, 2019). Essa etapa é considerada a mais crítica dentro da sequência analítica, pois

é onde ocorrem os principais erros, além de demandar maior tempo e custos.

Alguns parâmetros devem ser considerados, como a utilização de soluções diluídas, a possibilidade de decompor elevadas massas de amostra visando obter melhores limites de detecção, a frequência analítica, entre outros (KRUG, *et al.*, 2019). Porém, viabilizar um método de análise que contemple todos os requisitos necessários é um grande desafio, principalmente, quando se trata da determinação de halogênios associada à possibilidade da perda dos analitos por volatilização durante o preparo da amostra (MATUSIEWICZ, 2003; MELLO, *et al.*, 2013).

Portanto, neste trabalho foi avaliada a combustão iniciada por micro-ondas (*Microwave-Induced Combustion* – MIC) como método de preparo de amostra, por se mostrar um método adequado para a posterior determinação de halogênios, e a cromatografia de íons (*Ion Chromatography* – IC) como técnica de determinação. Portanto, considerando seu elevado consumo na sociedade, torna-se necessária a determinação destes elementos, tendo em vista o controle de qualidade bem como a segurança alimentar destas bebidas para a sociedade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um método analiticamente confiável para a determinação de halogênios e enxofre em chás dos tipos, preto, verde, erva-cidreira, boldo e hortelã, fazendo uso dos princípios da química verde.

2.2. Objetivos específicos

- a. Otimizar um método de combustão para amostras de chás, utilizando a combustão iniciada por micro-ondas, bem como a solução utilizada para a absorção dos halogênios;
- b. Avaliar a exatidão do método proposto por meio de ensaios de recuperação, análise de material de referência certificado e comparação com métodos oficiais;
- c. Aplicar o método desenvolvido para a determinação total de halogênios e enxofre em diferentes tipos de chás;
- d. Relacionar as concentrações totais de halogênios e enxofre dos chás com as concentrações obtidas nas infusões dos chás.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais de plantas utilizadas como chá

Devido à sua propriedade terapêutica, somado à sua popularização segundo algumas tradições, o chá acabou se tornando uma bebida popularmente consumida no mundo (VALENZUELA, 2004). Dentre essas tradições pode ser citada a tradição do “chá das cinco”, mundialmente conhecida e idealizada na Inglaterra pela duquesa de Bedford, Anna Russel, em meados de 1800 (COSTA *et al.*, 2011). Considerando o elevado consumo de chá na sociedade, o mercado global de chá foi avaliado com um aumento de até quase 200 bilhões de dólares em 2020 e uma estimativa de crescimento de até 318 milhões até 2025 (PAN *et al.*, 2022).

Inicialmente, os primeiros tipos de chás surgiram a partir da espécie *Camellia sinensis*, um arbusto nativo da China e que se produz em regiões com alta umidade e temperaturas amenas (NAMITA *et al.*, 2012). Porém, sua produção foi sendo espalhada ao redor do mundo, tornando possível o seu cultivo também em países tropicais (LIMA *et al.*, 2009). Os chás provenientes da *Camellia sinensis* (chá verde e preto) apresentam em sua composição compostos como os polifenóis, da classe dos flavonoides, que possuem propriedades antioxidantes, além de alcaloides como a cafeína que ajudam no aumento de energia para o organismo.

O chá verde possui concentração elevada de catequina (60 – 80%), e nenhuma concentração de teaflavina, enquanto o chá preto possui maior concentração de teaflavina (6 – 24%), e baixa concentração de catequina (5 – 12%), quando comparada com a concentração de catequina no chá verde (HIGDON, *et al.*, 2003). Compostos como as catequinas atuam indiretamente como antioxidantes nas atividades enzimáticas do organismo (HIGDON *et al.*, 2003), enquanto que as teaflavinas podem contribuir para atividades antiinflamatórias, neuroprotetoras e entre outras (SHAN *et al.*, 2021).

Vale destacar que essa diferença de concentração é dada devido ao processo de oxidação que o chá preto sofre em seu processo produtivo, pois as teaflavinas são formadas a partir da oxidação das catequinas que estão em maiores concentrações no chá verde (SHAN *et al.*, 2021). Portanto, a partir da *Camellia sinensis* é possível obter quatro tipos principais de chás: branco, verde, *oolong* e preto. Sendo assim,

todos são provenientes da mesma espécie de planta, porém se diferem entre si pelo período em que são submetidos a processos de oxidação (WEISBURGER, 1997).

A hortelã (*Mentha arvensis L.*) é uma planta herbácea que possui mais de 60 espécies da família *Lamiaceae*. Esta espécie tem sua origem da região do Mediterrâneo, porém, pode ser encontrada facilmente em todo o mundo. A hortelã é muito utilizada no setor industrial como aromatizante em alimentos, bebidas, gomas e doces, porém, esta planta também é considerada um vegetal folhoso saudável devido a sua constituição por vitaminas e minerais. O seu registro como uso na forma de planta medicinal vem desde a antiguidade na medicina ayurvédica (medicina alternativa indiana) e chinesa. As infusões de hortelã são usadas para reduzir inchaços, aliviar a dor e tratar diversas condições como dores de cabeça, rubéola e problemas digestivos (WEI *et al.*, 2023).

Estudos demonstram que os extratos desta planta podem causar benefícios ao sistema digestivo, nervoso e respiratório, além de possuírem propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antioxidantes, entre outras. Estes efeitos estão relacionados aos compostos bioativos presentes na hortelã como o mentol, a mentona, o acetato de mentila e o 1,8-cineol, além da presença de flavonoides como os ácidos fenólicos e terpenoides (WEI *et al.*, 2023; MAHBOUBI; KAZEMPOUR, 2014; TSAI *et al.*, 2013).

A erva-cidreira (*Melissa officinalis L.*), pertencente à família das mentas *Lamiaceae* e à subfamília *Nepetoideae*, é uma planta que cresce de maneira perene em regiões como o Mediterrâneo e Ásia Ocidental, além de ser comumente cultivada na Europa. Devido sua composição química, esta planta possui diversos efeitos farmacológicos, tornando-a uma planta de grande interesse medicinal em todo o mundo. Por ser uma planta rica em compostos fenólicos e flavonoides, esta está associada a uma variedade de benefícios à saúde como antivirais, antidepressivas, neuroprotetoras, antifúngicas, antibacterianas, além de possuir propriedades calmantes com sua propriedade ansiolítica (PETRISOR *et al.*, 2022).

O boldo chileno (*Peumus boldus*) é uma planta nativa do Chile e amplamente consumida no mundo todo, principalmente na sua forma de chá, devido às suas contribuições farmacológicas à saúde humana (MARIANO *et al.*, 2019). Originalmente, a medicina tradicional chilena fazia o uso desta planta para o tratamento de reumatismo em povos indígenas (SPEISKY; CASSELS, 1994).

Atualmente, o boldo chileno é popularizado por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, anti-helmínticas e diuréticas, enfatizando sua atuação em distúrbios digestivos e hepatobiliares (SPEISKY; CASSELS, 1994; RUIZ, *et al.* 2008). Estas propriedades farmacológicas estão associadas à composição química das folhas de boldo que possui compostos como os alcaloides e flavonoides. A boldina é o principal alcaloide encontrando, representando cerca de 12 a 19% do conteúdo total de alcaloides dessa matriz, dependendo do procedimento de extração, método analítico utilizado e outros parâmetros (MARIANO *et al.*, 2019).

Diante do exposto, devido à constituição destas plantas, compreende-se os motivos para a utilização destas espécies como forma de tratamento medicinal, através de sua infusão, devido ao fato de apresentarem benefícios à saúde, popularizando cada vez mais a utilização de plantas para fins medicinais (BRAIBANTE *et al.*, 2014). No Quadro 1, estão alguns exemplos de plantas comumente utilizadas no Brasil na forma de infusão, seus princípios ativos e usos medicinais.

Quadro 1. Principais princípios ativos dos tipos de chás e suas contribuições para a saúde.

| Denominação | Principal princípio ativo | Usos medicinais |
|--------------------|---|--|
| Hortelã | Mentol (2-isopropil-5-metilciclohexanol) | Tratamento de complicações gastrointestinais e de resfriado (BRAIBANTE, <i>et al.</i> , 2014). |
| Erva-cidreira | Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) | Propriedades calmantes que melhoram a qualidade do sono, combate ao estresse e a ansiedade (SADRAEI, <i>et al.</i> , 2023). |
| Boldo | Boldina (1,10-Dimetoxiaporfina-2,9-diol) | Propriedades analgésicas e digestivas. Comumente utilizado no combate de doenças ligadas ao fígado (BARBOSA, <i>et al.</i> , 2001). |
| Chá preto | Teaflavina (3,4,5-trihidroxi-1,8-is[(2R,3R)-3,5,7-trihidroxi-2-cromaniil]-6-benzo[7]anulenona) | Redução do risco de doenças cancerígenas e cardiovasculares. Além disso, auxilia no tratamento de asma (WANG, <i>et al.</i> , 2022). |
| Chá verde | Catequina (2R, 3S) -2-(3,4-di-hidroxifeni)-3,4-di-hidro-2H – cromeno-3,5,7-triol | Prevenção de doenças cancerígenas, cardiovasculares e diabetes, além de auxiliar na redução de peso (NAMITA, <i>et al.</i> , 2012). |

No entanto, as plantas medicinais possuem uma gama extensa de espécies químicas que fazem parte da sua constituição, e ainda não são completamente compreendidas, como por exemplo os compostos halogenados. Diante disso, há estudos que demonstram que espécies como cloro e enxofre podem estar presentes na composição das plantas por fazerem parte do ciclo bioquímico fundamental das plantas em geral (CHEN *et al.*, 2010; LEUTESK *et al.*, 2000). O iodo é utilizado para biofortificar e melhorar o desempenho de algumas plantas (KIFERLE *et al.*, 2021), o bromo pode estar presente em plantas pelo uso de pesticidas como o bromometano (LANCHEROS, 2011). Além disso, as plantas podem ser hiper acumuladoras de compostos de flúor na raiz, e após estes compostos se acumularem na raiz, estes passam a migrar para as folhas e talos das plantas (fontes majoritárias para a produção de chás) (BAUNTHIYAL, *et al.*, 2013). Portanto, torna-se necessário avaliar as concentrações dessas espécies químicas a fim de verificar e controlar suas dosagens em matrizes alimentares.

3.2. Halogênios e enxofre: aspectos relevantes

Os halogênios podem estar presentes nas plantas de maneira natural ou oriundos de atividades antropogênicas, e podem permanecer durante todo o desenvolvimento da planta até a sua forma de infusão. Portanto, esses elementos podem ocasionar algumas complicações à saúde humana, dependendo da concentração e forma ingerida. O bromo (Br), quando combinado com a hemoglobina pode causar doenças hematológicas (PAVELKA, 2004). Vale ressaltar também que a presença desse elemento no organismo pode causar a diminuição da quantidade de iodo nas glândulas mamárias e da tireoide, causando por consequência a deficiência de iodo no organismo (PICCIRILLO *et al.*, 2010). Alguns estudos relatam que o bromo pode estar presente de maneira natural e/ou antropogênica. A aplicação de bromometano, usado como pesticida, pode aumentar a concentração desse elemento no solo, e consecutivamente, nas plantas (PICCIRILLO *et al.*, 2010). O limite máximo permitido de brometo em plantas é de 125 mg kg^{-1} , de acordo com a Farmacopeia Americana (Farmacopeia Americana, 2015).

O cloro (Cl), geralmente está presente em diversos tipos de produtos

alimentícios, tais como, grãos e proteínas (como os frutos do mar), em elevadas concentrações. Sua presença geralmente está associada à presença do cloreto de sódio (NaCl). Este elemento é um dos componentes do suco gástrico, o qual contribui para digestão efetiva dos alimentos consumidos (SOLL *et al.*, 1979). Quando associado ao sódio ou potássio, ele atua no organismo regulando a pressão osmótica, mantendo o balanço aquoso e controlando o pH da corrente sanguínea (TRUCK *et al.*, 2019). Porém, vale ressaltar que o excesso de cloro pode ocasionar algumas disfunções no organismo, como a acidose metabólica, confusão mental e dor de cabeça (WINDER, 2001). É recomendado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority – EFSA*) que a ingestão diária de cloro seja de 1,7 a 3,1 g dia⁻¹ podendo variar entre crianças e adultos (TRUCK *et al.*, 2019). Além disso, o uso de pesticidas organoclorados, além de serem considerados carcinogênicos, são alguns dos contaminantes mais frequentes em plantas, devido ao fato de serem poluentes orgânicos persistentes e se fixarem no solo e na água (JAYARAJ, *et al.*, 2017).

O flúor (F) é responsável pela preservação da saúde bucal (SINGH, *et al.*, 2021), mas a ingestão de doses maiores que 1,5 mg L⁻¹ em água potável, podem causar complicações ao organismo como a fluorose óssea, que é caracterizada pelo enfraquecimento dos ossos (SINGH, *et al.*, 2021). Segundo o Comitê Científico do Instituto de Medicina do Estados Unidos, a ingestão de flúor pode variar entre homens e mulheres, crianças e adultos e está entre 0,5 e 4 mg dia⁻¹ (INSTITUTO DE MEDICINA DO ESTADOS UNIDOS, 1997).

O iodo (I) está associado à síntese dos hormônios da tireoide, como a tiroxina e triiodotironina. Esses hormônios são essenciais para manter o controle do metabolismo, desenvolvimento da estrutura corpórea e funções neurológicas (HETZEL, 1983). De acordo com estudos, pessoas que possuem deficiência de iodo no organismo podem desenvolver o hipotireoidismo, e o excesso de iodo no organismo pode causar o hipertireoidismo. Assim, a recomendação de ingestão diária de iodo pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO) é de 90 a 250 µg (Instituto de Medicina, 2001; HETZEL, 1983).

O enxofre (S) é essencial para os organismos vivos, desempenhando um papel

importante para o metabolismo (BAYSAL *et al.*, 2011). O enxofre está presente nas estruturas de muitas proteínas e enzimas, disponíveis em aminoácidos. Quanto maior a presença de aminoácidos, maior a disponibilidade de enxofre no organismo e, conseqüentemente, maior a formação de moléculas que atuam na defesa antioxidante e na biossíntese de proteínas (PARCELL, 2002). Esses aminoácidos ricos em enxofre são encontrados principalmente em carnes bovinas, aves, peixes, ovos, entre outros, tornando seu consumo abrangente na sociedade (HEWLINGS *et al.*, 2019). O teor máximo de enxofre é definido em cerca de 140 g dia⁻¹, distribuindo-se em pequenas quantidades por todo o corpo (ANASTASSAKIS, 2022). Vale ressaltar que o excesso de enxofre no organismo tem sido relacionado com doenças como a colite ulcerativa que se caracteriza pela inflamação e ulceração da camada mais superficial do cólon (OTTEN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, é possível observar que os halogênios e o enxofre podem apresentar tanto algum nível de essencialidade quanto de toxicidade, a depender da quantidade ingerida. Porém, a legislação que concerne os valores máximos permitidos (VMP) de não-metals em amostras de matrizes alimentares, especificamente o chá, não é estabelecida. Portanto, compreender o nível de concentração desses elementos em amostras de chá é essencial para elucidar os impactos na saúde humana e colaborar para a construção de uma legislação que garanta a segurança alimentar dos consumidores.

3.2.1. Métodos de preparo e determinação de não-metals em plantas e matrizes similares

A presença de halogênios e enxofre em plantas, incluindo aquelas utilizadas para o preparo de chás, é relatada em alguns trabalhos encontrados na literatura (AKHDHAR *et al.*, 2021; FU *et al.*, 2021). Na Tabela 1, estão descritos alguns métodos de preparo de amostras encontrados na literatura para plantas medicinais e matrizes similares visando à determinação de halogênios e enxofre, bem como as técnicas de determinação utilizadas.

Tabela 1. Métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios e enxofre em chás e/ou matrizes similares (continua).

| Amostra | Analitos | Método de preparo | Técnica de determinação | LOD | LOQ | Referência |
|-------------------------------------|-----------------|---|--------------------------------|--------------------------|---|------------------------------------|
| Planta medicinal | Br e I | MIC | ICP-MS | NI | Br (0,033 $\mu\text{g g}^{-1}$) I (0,003 $\mu\text{g g}^{-1}$) | NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2017 |
| Folhas de chá | F | Extração ácida | ISE | NI | NI | ZHANG <i>et al.</i> , 2023 |
| Amostras botânicas | Cl | Extração com água quente | ICP-OES | 0,041 mg L^{-1} | NI | WHEAL <i>et al.</i> , 2010 |
| Planta (<i>Camellia sinensis</i>) | F | Extração ácida | ISE | NI | NI | DUO <i>et al.</i> , 2023 |
| Planta medicinal | Cl, Br, I, e S | Pulverização | EDXRF | NI | NI | DESIDERI <i>et al.</i> , 2010 |
| Amostras de lantãs | F | Extração facilitada com enzimas α -amilase e protease | ISE | 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ | NI | JUNSEOK <i>et al.</i> , 2015 |

Tabela 1. Métodos de preparo de amostras para determinação de halogênios e enxofre em chás e/ou matrizes similares. (continuação)

| Amostra | Analitos | Método de Preparo | Técnica de Determinação | LOD | LOQ | Referência |
|---|----------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Chás (chá branco, chá verde, chá preto e etc) | F | 1. MIC 2. Solubilização com TMAH 3. Infusão | HR-CS-MAS | 0,16 mg L ⁻¹ | 0,52 mg L ⁻¹ | MORÉS <i>et al.</i> , 2011 |
| Algas (<i>Sargassum muticum</i> ; <i>Undaria pinnatifida</i>) | I | Digestão por via úmida: TMAH (25%); HNO ₃ (65%); HNO ₃ (65%) + H ₂ O ₂ (30%); HNO ₃ (52%) + H ₂ O ₂ (8%); Água Régia | ICP-MS | 3,9 µg g ⁻¹ | ND | BADACCO <i>et al.</i> , 2016 |

LOD: Limite de Quantificação do Método; LOQ: Limite de Detecção do Método; NI: Não Informado; ICP-MS: Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado; ICP-OES: Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente; IC: Cromatografia de Íons; EDXRF: Espectrometria de Fluorescência de Dispersão de Raios-X; ISE: Eletrodo Íon-Seletivo e HR-CS-MAS: Fonte Molecular Contínua de Alta Resolução Espectrometria de Absorção.

Assim, como pode ser visto na Tabela 1, existem alguns métodos de preparo e determinação de halogênios em chás e amostras de matrizes similares. Tendo em vista os trabalhos reportados em literatura, demonstrados acima, neste trabalho será desenvolvido um método de preparo de amostras para a determinação de halogênios e enxofre em chás, especificamente a MIC, para posterior determinação por diferentes técnicas de determinação como a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* – ICP-MS), eletrodo íon-seletivo (*Ion-Selective Electrode* – ISE) e Espectrometria de Fluorescência de Dispersão de Raios-x (*Energy Dispersive X-ray Fluorescence* – EDXRF), entre outras. Além disso, a MIC é um método de preparo que possui mais vantagem quando comparada com o método de digestão por via úmida, por se tratar de um método mais amigável com o meio ambiente, pois utiliza menores volumes e menores concentrações de reagentes, gerando, conseqüentemente, menos resíduos, que causam menos impactos negativos ao meio ambiente.

3.3. Métodos de preparo de amostras para posterior determinação de não-metals

Antes da etapa de determinação elementar é necessária a etapa de preparo de amostra. A maioria das técnicas instrumentais de determinação requer a conversão da amostra em uma solução que seja compatível com a instrumentação, e além disso, que seja adequada para a retenção e disponibilização dos analitos que serão determinados (KRUG; ROCHA, 2019). Portanto, não existe um método de preparo universalmente apropriado para o preparo de todas as amostras e determinação de qualquer analito. Logo, ao escolher um método de preparo, alguns fatores devem ser considerados, como a matriz da amostra, o analito e a técnica de determinação que será utilizada para que se obtenha resultados reprodutíveis e confiáveis (KRUG; ROCHA, 2019). A etapa de preparo de amostras é a etapa em que há um maior tempo e custo a serem dedicados.

Portanto, considerando a variedade de técnicas analíticas disponíveis e as crescentes demandas por métodos mais verdes, rápidos, sensíveis e confiáveis, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias que possibilitem a determinação elementar em concentrações a nível traço em matrizes variadas (TJABADI, 2019). Nesse sentido, o preparo de amostras para posterior determinação de não-metais tem sido um desafio. Quando se trata de amostras majoritariamente orgânicas, os métodos mais comuns utilizam a decomposição por via úmida, nos quais é necessário a utilização de ácidos minerais oxidantes concentrados para a completa eliminação da matriz. Porém, quando objetiva-se determinar halogênios, o uso desses reagentes pode não ser adequado pois em meios ácidos, esses elementos podem formar espécies voláteis (MATUSIEWICZ *et al.*, 2003; MELLO *et al.*, 2013).

3.3.1. Digestão por via úmida

Neste tipo de preparo, os ácidos minerais são comumente utilizados visando à posterior determinação elementar. Nesse caso, a matéria orgânica é oxidada e os analitos permanecem em solução. Diferentes tipos de ácidos podem ser utilizados, como o ácido sulfúrico e o ácido perclórico, sendo o ácido nítrico o mais utilizado, especialmente em frascos fechados. Além disso, misturas de ácidos podem ser empregadas, como por exemplo, ácido clorídrico com ácido nítrico para a digestão de amostras biológicas (BENKHEDDA *et al.*, 2009; BIZZI *et al.*, 2010; KNAPP *et al.*, 1998). A decomposição por via úmida pode ser feita em sistemas com frascos abertos ou fechados, com aquecimento convencional ou por fontes de energias alternativas, como as micro-ondas (COSTA *et al.*, 2020; NAKASHIMA *et al.*, 1988).

Os sistemas com frascos abertos de decomposição apresentam uma boa frequência analítica, baixo custo, e possibilita a decomposição de maiores massas de amostra quando comparados com os sistemas fechados. Porém, a utilização de sistemas com frascos abertos é mais propensa a riscos de contaminação e perdas por volatilização, principalmente, de halogênios na forma de suas espécies voláteis (KRUG; ROCHA, 2019). Logo, uma alternativa para minimizar estas desvantagens é a utilização de sistemas com frascos fechados (FLORES, 2014). Nestes sistemas, o tempo de decomposição e os volumes de ácido utilizados podem ser reduzidos,

especialmente nos sistemas que utilizam micro-ondas, e por se tratarem de sistemas fechados, os riscos de contaminação e perdas por volatilização também são reduzidos (KRUG; ROCHA, 2019). Entretanto, vale ressaltar que quando se trata de determinação de halogênios, mesmo em sistemas com frascos fechados pode haver a perda desses analitos e outras estratégias precisam ser utilizadas (FLORES, 2014; FLORES *et al.*, 2007; NÓBREGA *et al.*, 2002; KRUG; ROCHA, 2019).

3.3.2. Métodos de combustão em sistemas fechados

A reação de combustão é considerada como uma reação mais efetiva e conveniente para a decomposição de materiais orgânicos. Neste tipo de reação, ocorre a conversão dos átomos de carbono e hidrogênio em seus produtos subsequentes de oxidação, ou seja, dióxido de carbono e água, predominantemente (FLORES *et al.*, 2007).

A reação de combustão ocorre em elevada temperatura, portanto, praticamente todas as matrizes orgânicas podem ser decompostas nesse tipo de reação. Esse tipo de reação resulta em soluções com menor presença de interferentes, devido ao uso de elevadas temperaturas que causam a total decomposição da matriz amostral (KRUG; ROCHA, 2019). Dentre os métodos de combustão em sistema fechado pode-se mencionar a bomba de combustão, o frasco de Schöniger e a MIC, que são comumente utilizados para a combustão de amostras majoritariamente orgânicas (FLORES *et al.*, 2007; KRUG; ROCHA, 2019; MELLO *et al.*, 2012). No próximo item será dado maior foco para a MIC devido às várias vantagens quando comparada a outros métodos de combustão em sistema fechado e por ter sido o método utilizado nesse trabalho.

3.3.2.1. Combustão iniciada por micro-ondas

A MIC foi proposta com o intuito de unificar as vantagens da digestão por via úmida e da combustão em sistemas fechados, somados ao uso da radiação micro-ondas como fonte alternativa de energia (FLORES *et al.*, 2004). Este método de preparo é amplamente utilizado para decompor eficientemente amostras majoritariamente orgânicas e de difícil decomposição (FLORES *et al.*, 2004). Inicialmente, este método foi desenvolvido para posterior determinação de metais e

não-metals em produtos farmacêuticos, utilizando um forno de micro-ondas doméstico com o uso de oxigênio líquido (BARIN, 2003). Em seguida, o método foi adaptado para um modelo industrial.

Uma das vantagens de utilizar a MIC é que, durante a combustão das amostras, temperaturas acima de 1000 °C podem ser atingidas, auxiliando na eficiência da conversão da matéria orgânica em gás carbônico e água (KRUG; ROCHA, 2019). Assim, é possível decompor massas de amostra mais elevadas do que outros métodos de combustão em sistema fechado, contribuindo para a melhora de limites de detecção (*Limit of Detection* – LODs) e limites de quantificação (*Limit of Quantification* – LOQs). Outro fator que contribui para a melhora nos LODs e LOQs diz respeito à obtenção de baixos valores de brancos analíticos após a decomposição por MIC devido à utilização de materiais fabricados com elevada pureza, como frascos e suportes de quartzo, além de tampas de vedação de politetrafluoretileno (*Polytetrafluoroethylene* – PTFE). Além disso, por ser um sistema fechado não há a necessidade de reposição de reagentes durante o preparo, diminuindo conseqüentemente o consumo destes. Vale ressaltar que por meio da MIC também há a possibilidade de utilização de soluções diluídas para a absorção dos analitos (KRUG; ROCHA, 2019; RONDAN *et al.*, 2019).

Como o processo de decomposição se dá pela reação de combustão e, portanto, não requer o uso de ácido concentrado para essa função, é possível utilizar soluções mais adequadas às características dos analitos e da técnica de determinação. No caso dos halogênios e outros não-metals, o uso de água ou soluções alcalinas são indicados (MELLO *et al.*, 2013). Por fim, com este sistema é possível obter uma elevada frequência de análise em comparação a outros métodos clássicos de combustão, com o frasco de Schöniger, por exemplo, visto que com o método de frasco de Schöniger, é possível decompor somente uma amostra por vez. Entretanto, com o método MIC, em cerca de 25 min é possível decompor eficientemente até oito amostras simultaneamente. Ademais, geralmente, a solução final é compatível com as mais variadas técnicas de determinação (FLORES *et al.*, 2007).

3.4. Técnicas instrumentais para determinação de não-metals

Diversas técnicas podem ser empregadas para a determinação de não-metals. Entretanto, alguns fatores importantes devem ser levados em consideração para a escolha da técnica mais adequada ao objetivo da análise, tais como características da amostra, método de preparo de amostra utilizado, faixa de concentração e características dos analitos, possíveis interferências durante a etapa de determinação e disponibilidade do equipamento (KNAPP *et al.*, 1998; VARGA, 2007). São exemplos de técnicas instrumentais que permitem a determinação de halogênios: análise por ativação neutrônica instrumental (INAA), espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), cromatografia de íons (IC), ICP-MS e ISE. Dentre as técnicas mencionadas, a IC destaca-se por suas vantagens quando comparada com as outras técnicas de determinação, e será dado maior enfoque pois foi a técnica utilizada nesse trabalho.

3.4.1. Cromatografia de íons

A IC é uma técnica de separação que se baseia no processo de troca iônica entre uma fase móvel e os grupos de troca iônica, com cargas opostas, ligados a uma fase estacionária. A cromatografia iônica é utilizada tanto para a separação de íons inorgânicos quanto íons orgânicos. Assim, quando um íon da resina de troca iônica é substituído por um íon contido na amostra, este permanece retido por um tempo com carga fixa, e então é eluído à medida que a fase móvel passa pela coluna cromatográfica. Os diferentes íons contidos na amostra permanecem retidos por períodos distintos, pois cada um tem o seu tempo de retenção na coluna e isso varia de acordo com a afinidade desses íons com a fase estacionária e com a fase móvel, para assim ocorrer a separação dos analitos. Logo, para a separação de ânions, a fase estacionária, geralmente é composta por grupos amino quaternários (COLLINS *et al.*, 2006).

A IC quando comparada a técnicas espectrométricas com plasma, por exemplo, apresenta um baixo custo no que diz respeito à manutenção e operação do equipamento, visto que não é necessária a utilização de gases como o argônio (MOURA *et al.*, 2021). Em contrapartida, a determinação de alguns elementos, como

bromo e iodo em baixas concentrações é limitada no que diz respeito à capacidade de detecção. Além disso, quando são utilizados detectores de condutividade na IC, a etapa de determinação pode ser afetada pela ocorrência de algumas interferências, como por exemplo, a presença de alguns íons que possuem elevada condutividade, além de dificuldade na separação de íons interferentes que possuem o mesmo tempo de retenção dos analitos. Entretanto, estes problemas podem ser contornados a partir da utilização de sistemas de supressão de condutividade e gradientes de eluição (MENDES, 2019). Além disso, a presença de outras espécies iônicas, além dos analitos, podem também causar interferências durante as análises, como por exemplo, a sobreposição de picos (COLLINS *et al.*, 2006).

3.5. Métodos oficiais para quantificação de não-metals em folhas de plantas

A Associação Oficial de Químicos Analíticos (*Association of Official Analytical Chemists* – AOAC) recomenda os métodos para a determinação de elementos químicos nas mais variadas matrizes. Dentre eles, estão os métodos oficiais 915.01 (HORWITZ; LATIMER, 2005) para a determinação de cloreto em plantas por titulometria, 923.01 (HORWITZ; LATIMER, 2005) para a determinação de enxofre em plantas por gravimetria, e o método 975.04 (HORWITZ; LATIMER, 2005) para a determinação de fluoreto em plantas por potenciometria. Vale destacar que não há métodos oficiais para a determinação de bromo e iodo em folhas de plantas. Sendo assim, a respeito dos métodos oficiais possíveis de serem utilizados neste trabalho, é importante compreender que o método 915.01 recomenda a decomposição por via seca com solução de carbonato de sódio 5% como método de preparo de amostras, e a titulação pelo método de Mohr como método de quantificação; o método 923.01 também recomenda a decomposição por via seca com dissolução em HCl como preparo e uma determinação gravimétrica a partir da formação de BaSO₄; e o método 975.04 sugere a extração em HNO₃ diluído para determinação por ISE. Esses métodos oficiais apresentam as vantagens de utilizar equipamentos simples, mas são métodos monoelementares, morosos, com combinação de reagentes concentrados em volumes relativamente elevados, além de gerarem uma grande quantidade de resíduos. Nesse sentido, a proposição de métodos de análise que contornem essas

desvantagens é uma tendência dentro da química analítica e também foi um dos objetivos que motivou esse trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

Para o preparo das amostras de chá avaliadas por MIC foi utilizado um forno de micro-ondas (modelo Multiwave 3000[®], Anton Paar, Áustria) equipado com um rotor que permite utilizar até oito frascos, dispondo de sensores que permitem medir, em tempo real, a pressão e temperatura média dos frascos. Foram utilizados frascos de quartzo, com volume interno de 80 mL, que suportam pressão e temperatura máximas de 80 bar e 300 °C, respectivamente. A Figura 1 demonstra os componentes utilizados na MIC e o forno micro-ondas Multiwave 3000[®].

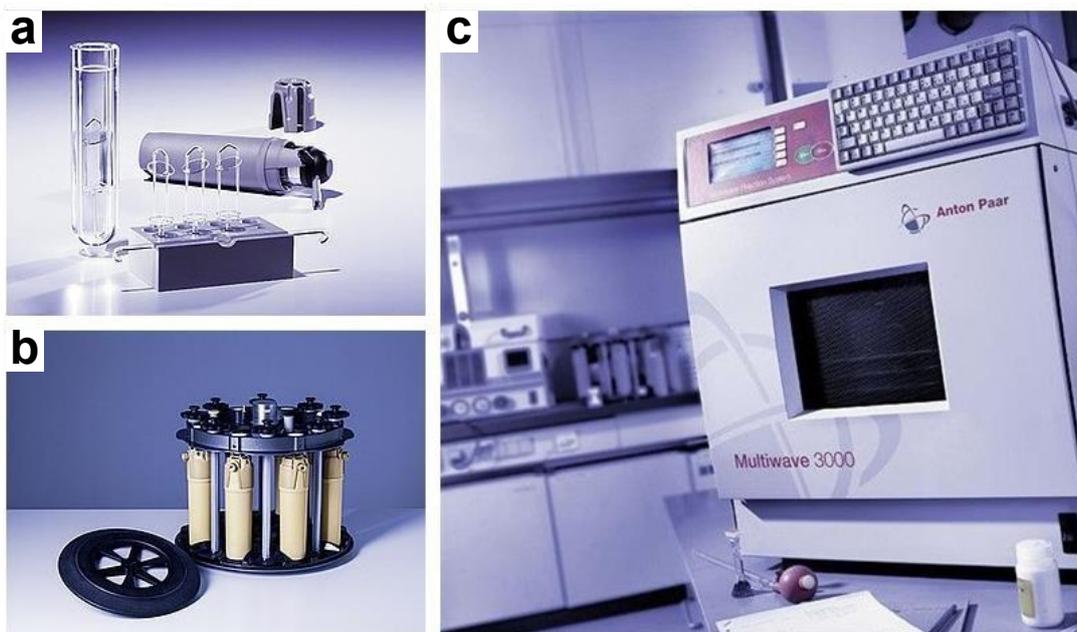


Figura 1. Imagem demonstrativa do forno micro-ondas Multiwave 3000[®] e seus componentes (a) frascos de quartzo com suportes de quartzo (b) frascos de quartzo com capa de proteção acoplados ao rotor (c) equipamento de forno micro-ondas modelo Multiwave 3000. Fonte: Google Imagens.

Para realizar as decomposições das amostras por MIC, além dos frascos, é necessária também a utilização de dispositivos de quartzo que servem como suportes para as amostras para que estas não entrem em contato com a solução absorvedora utilizada (Figura 1a). Para tanto, estes dispositivos foram inseridos no interior de cada frasco.

Para a determinação dos analitos, através das soluções obtidas na MIC, foi

utilizado um cromatógrafo de íons (modelo ICS-5000+, Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA) equipado com detector de condutividade (Dionex ICS-5000+ Conductivity Detectors, Thermo, EUA). Para separação dos íons foram utilizadas uma coluna analítica (modelo IonPac[®] AS11-HC, 4 µm, 2 × 250 mm) e uma pré-coluna (modelo IonPac[®] AG11-HC, 4 µm, 2 × 50 mm). Um cartucho gerador de KOH (EGC 500 KOH) foi usado como fonte de eluente. Para a supressão de condutividade do eluente foi utilizado uma supressora eletrolítica (membrana de 2 mm) com sistema de autorregeneração e um amostrador automático AS-AP.

Para a execução dos métodos oficiais, a instrumentação utilizada foi um forno mufla (ZEZIMAQ, Minas Gerais), chapas de aquecimento (IKA, RHB2, Synth, São Paulo) e um potenciômetro (HI 3221 Meter, Hanna Instruments, São Paulo), acompanhado de um eletrodo íon-seletivo para fluoreto (HI 4110, Hanna Instruments, São Paulo).

A respeito da instrumentação utilizada para a descontaminação dos filmes de polietileno de baixa densidade (KL Embalagens, Brasil), utilizados para os invólucros na MIC, e dos papéis filtro (Qualy 15 Ø, Jprolab, Brasil), foi utilizado um banho ultrassônico com frequência de 40 kHz (modelo USC 2800 A, Unique, Brasil). A secagem desses materiais foi realizada em uma capela de fluxo laminar classe 100 (modelo CFLH-09, Veco, Brasil). Os reagentes sólidos, vidrarias e as amostras foram secas em estufa (modelo 400/2ND, De Leo, Brasil). Para lavagem das vidrarias e descontaminação dos materiais, foi utilizada água ultrapura (18,2 MΩ cm) obtida através de um ultrapurificador de água (modelo Simplicity[®] UV, Millipore, Merck KgaA, Alemanha). Para a medição de massas de reagentes e amostras, uma balança analítica (modelo AY 220, Shimadzu, Japão) com carga máxima de 220 g e resolução de 0,0001 g foi utilizada.

4.2. Reagentes

O preparo de todas as soluções/diluições de amostras, foi realizado com água ultrapura. Para a descontaminação do sistema do forno micro-ondas foi utilizado ácido nítrico concentrado (HNO₃ 65%, Synth, Brasil). O álcool etílico bidestilado (96°, GL,

Hyglass, Brasil) foi utilizado para a descontaminação de papéis filtro, invólucros e vidrarias em geral, além dos recipientes de polipropileno utilizados para o armazenamento das soluções digeridas.

A solução de nitrato de amônio (NH_4NO_3 6 mol L^{-1}), utilizada como solução ignitora para a execução da MIC, foi preparada a partir da dissolução do sal correspondente (Merck, Alemanha). Para avaliação da solução absorvedora a ser utilizada no método proposto, soluções de hidróxido de amônio (NH_4OH) foram preparadas em diferentes concentrações por diluição do reagente concentrado (NH_3 27%, Synth). Para a pressurização dos frascos de quartzo utilizados para a combustão das amostras por MIC, foi utilizado oxigênio gasoso com 99,96% de pureza (White Martins, Brasil).

Para as determinações por IC-CD, as soluções de calibração foram de 1,0 a 12 mg L^{-1} para SO_4^{2-} , 0,1 a 1,5 mg L^{-1} para Cl^- e 0,05 a 1,5 mg L^{-1} para F^- , Br^- e I^- que foram preparadas pela diluição de soluções padrão concentradas (1000 mg L^{-1}). Estas soluções foram preparadas a partir das dissoluções dos seguintes sais, respectivamente, sulfato de sódio (Na_2SO_4 , Synth), cloreto de potássio (KCl , Synth), fluoreto de sódio (NaF , Synth), brometo de sódio (NaBr , Isofar, Brasil) e iodeto de sódio (NaI , Isofar). Estas mesmas soluções foram utilizadas nos ensaios de recuperação realizados durante a escolha da solução absorvedora e avaliação da exatidão do método. A exatidão foi avaliada utilizando o material de referência certificado (CRM – *Certified Reference Material*) BCR 060, planta aquática.

A respeito dos métodos oficiais, para o preparo do método 915.01 (Cl), foram utilizadas as soluções de carbonato de cálcio (CaCO_3 , 5%) a partir do reagente sólido (CaCO_3 , Dinâmica) e ácido nítrico (HNO_3 , 1:4), a partir da solução concentrada (HNO_3 , 65%, Synth). Após, para a determinação de cloro via titulometria, foram utilizadas as soluções de nitrato de prata (AgNO_3 0,1 mol L^{-1}) a partir do reagente (AgNO_3 , Merck), solução indicadora de cromato de potássio (K_2CrO_4 , 40%) a partir do reagente (K_2CrO_4 , Dinâmica) e solução de cloreto de potássio (KCl 0,1 mol L^{-1}) a partir do reagente (KCl , Synth).

No método 923.01 (S) foram utilizadas as soluções de nitrato de magnésio hexahidratado ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,7 mol L^{-1}) a partir de seu reagente sólido e ácido

clorídrico bidestilado p.a. (HCl, Merck). Para a determinação de enxofre, foi aplicado o método gravimétrico utilizando cloreto de bário (BaCl_2 , 10%) a partir do reagente sólido (BaCl_2 , Nuclear).

O método 975.04 teve como etapa preparo a utilização de ácido nítrico nas concentrações de 0,2 e 0,05 mol L⁻¹ a partir do reagente ácido nítrico p.a. (HNO_3 , Synth). Para a determinação de flúor pelo método potenciométrico, foram utilizadas as soluções de hidróxido de potássio (KOH 0,05 mol L⁻¹) a partir do reagente (KOH, Êxodo Científica, Brasil), citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,4 mol L⁻¹) a partir do reagente ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, Dinâmica). A curva de calibração flúor utilizada foi de 0,05 à 1,5 mg L⁻¹, preparada com o sal de fluoreto de sódio (NaF, Synth).

4.3. Materiais diversos e procedimentos de descontaminação

As vidrarias utilizadas na rotina do laboratório e na realização dos métodos oficiais, como recipientes para armazenamento das amostras e vidrarias foram descontaminados por meio de imersão em álcool etílico bidestilado em banho de ultrassom por cerca de 20 min, a temperatura ambiente, seguido de lavagem com água ultrapura e secagem com jato de ar comprimido. Os papéis filtro, utilizados como auxiliares de ignição na MIC, assim como os papéis filtros utilizados para a filtração nos métodos oficiais, foram submersos em álcool etílico bidestilado por 20 min em banho ultrassônico, em temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi executado para a descontaminação dos filmes de polietileno de baixa densidade (*Low Density Polyethylene* – LDPE) utilizados para envolver as amostras na forma de invólucros (8 x 8 cm) durante o processo de decomposição por MIC, dos filtros cromatográficos de PTFE com diâmetro de poro de 0,2 µm (Filtrilo, KASVI, Paraná) utilizados para a filtração das soluções digeridas previamente à análise por IC-CD, dos frascos de vidro utilizados para o armazenamento das amostras, bem como das ponteiras utilizadas nas micropipetas. Após às etapas de descontaminação, todos os materiais foram enxaguados com água ultrapura para a remoção do excesso de álcool e secos em estufas à 60 °C.

No sistema utilizado para o método de MIC, todos os componentes utilizados, como tampas de PTFE, frascos e suportes de quartzo, foram descontaminados com

6 mL de HNO₃ 65%, sob aquecimento em forno micro-ondas. O programa de irradiação utilizado neste estudo foi de 1400 W por 10 min, para o aquecimento, seguido de uma etapa de 0 W por 20 min, para o resfriamento do sistema. Após isso, este mesmo processo foi realizado contendo 6 mL de água ultrapura como solução, para que houvesse a diminuição da acidez residual do sistema.

4.4. Amostras

Neste estudo, foram utilizadas amostras de chás em sachês, todas da mesma marca, nas espécies de *Camelia sinensis* (chá preto e chá verde), *Melissa officinalis* (chá de capim-cidreira), *Peumus boldus* (chá de boldo) e *Mentha arvensis L.* (chá de hortelã), adquiridas no comércio local da cidade de Pelotas/RS, conforme demonstradas na Figura 2. Estas amostras foram definidas para a execução deste trabalho por estarem entre os tipos de chás mais consumidas do Brasil (CERQUEIRA, *et al.*, 2020). Dois procedimentos iniciais foram realizados, sendo uma parte das amostras destinada ao preparo das suas infusões (extração) e outra parte destinada à secagem em estufa para a posterior decomposição. Ambas as frações foram analisadas por IC-CD.

Para a secagem, as amostras foram submetidas a 60 °C em estufa por aproximadamente 24 h, até peso constante. Então, a amostra foi moída em gral de porcelana com pistilo e, posteriormente, armazenada em frascos de polipropileno.

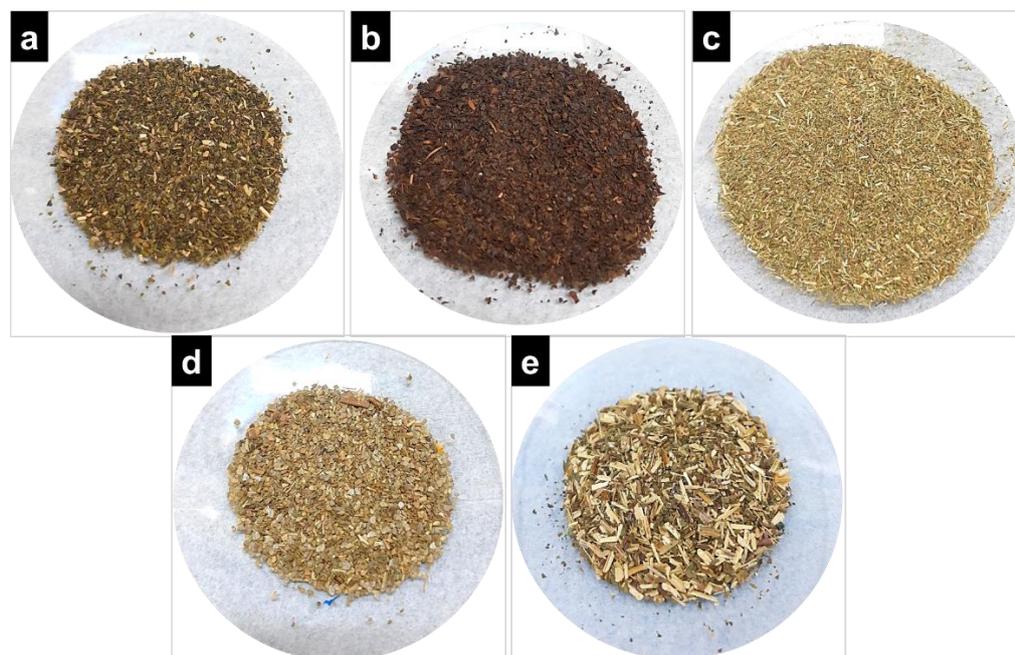


Figura 2. Amostras obtidas no centro comercial de Pelotas/RS e removidas dos sachês (a) chá verde (b) chá preto (c) chá de erva-cidreira (d) chá de boldo (e) chá de hortelã.

4.5. Preparo de amostras de chá por infusão

Para o preparo das infusões foi utilizada água ultrapura seguindo as instruções da embalagem de cada produto. Para isso, as amostras foram retiradas dos sachês, para a diminuição dos riscos de contaminação cruzada durante o preparo. Foi pesada aproximadamente 1 g de amostra, referente a todo o conteúdo contido nos sachês das embalagens comerciais. Posteriormente, a amostra foi depositada em béqueres previamente descontaminados e imersa em 130 mL de água ultrapura a 100 °C por aproximadamente 5 minutos, conforme recomendação do fabricante. Após isso, as soluções foram filtradas com papel filtro previamente descontaminados e coletadas em frascos de polipropileno.

Para a decantação de sólidos suspensos contidos nas amostras, e facilitação no processo de filtragem, estas foram submetidas a um processo de centrifugação a 12 000 rpm pelo período de 2 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtros de seringa de PTFE, em seguida foram diluídos e analisados por IC-CD.

4.6. Otimização da MIC para o preparo de amostras de chá

Foram estudados diferentes aspectos para execução da MIC, sendo o primeiro a maneira de introdução da amostra no sistema (invólucro ou comprimidos) e a massa máxima de amostra que pode ser eficientemente decomposta no sistema. Para o invólucro, foram avaliadas as massas de 100 e 200 mg de chá preto. A confecção dos invólucros consistiu em depositar a amostra sobre um filme de LDPE, os quais foram selados com fonte de aquecimento. Para as amostras na forma de comprimido foi utilizada uma prensa hidráulica (SSP-10, Shimadzu, Japão) a 60 kN, variando a massa de amostra de chá de 500 a 1000 mg. As amostras (invólucro e comprimido) foram depositadas na base de suportes de quartzo, sobre um disco de papel filtro previamente umedecido com 50 μL da solução ignitora (NH_4NO_3 6 mol L^{-1}), os quais foram introduzidos nos frascos de quartzos contendo 6 mL de água ultrapura. Após, os frascos foram fechados e fixados ao rotor para serem pressurizados com 20 bar de O_2 e submetidas a uma irradiação de 1400 W em um programa teste, a fim de avaliar o tempo necessário para a total combustão da amostra, seguido de um arrefecimento do sistema.

Para a escolha da solução absorvedora, foram avaliadas água ultrapura e NH_4OH (25 mmol L^{-1} , 50 mmol L^{-1} , 100 mmol L^{-1} e 150 mmol L^{-1}). A escolha da concentração mais adequada da solução absorvedora foi realizada com base em ensaios de recuperação dos analitos, em que foram adicionadas soluções padrões contendo o equivalente a 25%, 50% e 100% da concentração inicial dos analitos presentes na amostra. Os ensaios de recuperação foram realizados com a adição de 70 μL de uma solução padrão multielementar, anteriormente à etapa de preparo de amostra, conforme demonstrada na Figura 3. As concentrações determinadas por IC-CD, após a decomposição da amostra, utilizando diferentes soluções absorvedoras são apresentadas na Tabela 5, seção 5.1.3 deste trabalho.

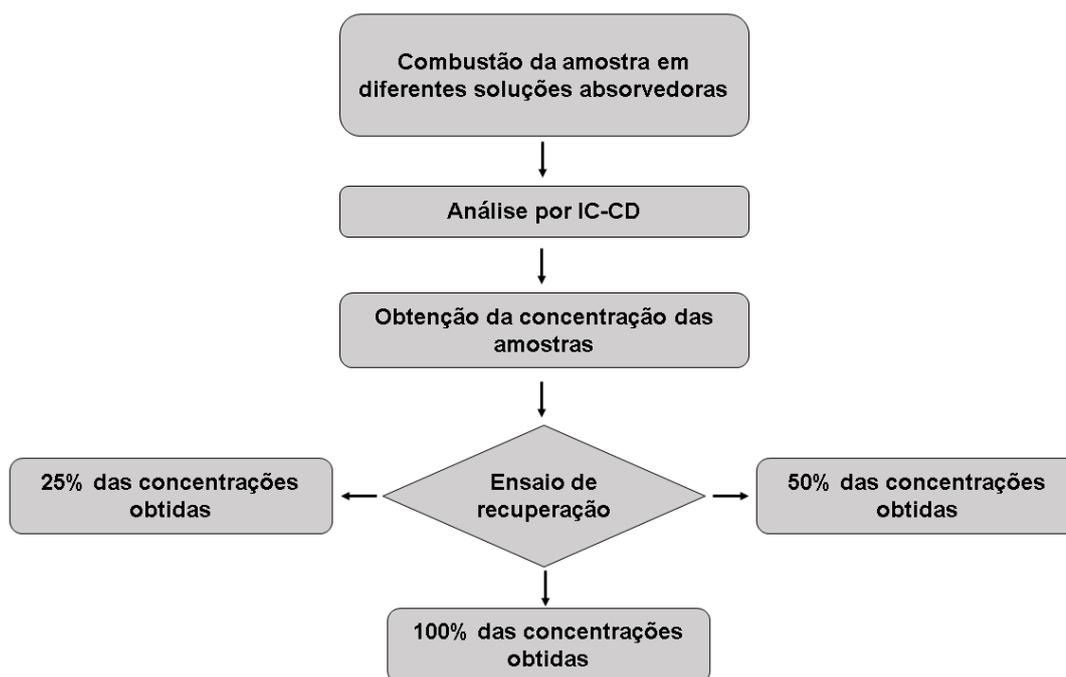


Figura 3. Diagrama demonstrativo das etapas realizadas para a avaliação da solução absorvedora.

A determinação dos elementos Br, Cl, F, I e S foi realizada a partir da conversão dos analitos para a forma de íons (Br^- , Cl^- , F^- e SO_4^{2-}) que são formados durante a etapa de combustão, esta conversão foi realizada conforme MESKO, *et al.* (2008). Sequencialmente, as soluções obtidas foram avolumadas a 25 mL e analisadas por IC-CD. As condições de preparo da amostra foram otimizadas com a amostra de chá preto, e o programa de irradiação foi adaptado do trabalho de COSTA, (2017) definido nas seguintes etapas: *i*) 1400 W por 50 s (etapa de ignição), *ii*) 0 W por 3 min (etapa de combustão), *iii*) 1400 W por 5 min (etapa de refluxo) e *iv*) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento).

4.7. Parâmetros de mérito analítico: faixa linear, limites de quantificação e de detecção, exatidão e precisão

Após o estabelecimento dos parâmetros para o preparo das amostras de chás (massa máxima decomposta, forma de inserção da amostra no sistema, concentração da solução absorvedora e programa de irradiação), foi realizada a verificação de algumas figuras de mérito que fazem parte da validação analítica de métodos, determinadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

(INMETRO) para a validação de métodos analíticos (INMETRO, 2018). A faixa linear de trabalho foi definida de acordo com a sensibilidade da técnica e a faixa de concentração dos analitos presentes nas amostras.

Os LODs do método desenvolvido foram calculados de acordo com o método sugerido também pelo INMETRO (INMETRO, 2018). A equação 1 mostra os parâmetros utilizados para a realização do cálculo, obtidos através da mensuração da concentração em solução dos brancos analíticos. Em que \bar{x} representa a média de dez medidas da concentração dos brancos, t é distribuição de *Student* que depende do tamanho da amostra ($n-1$) e do grau de confiança ($1-\alpha$), e s representa o desvio-padrão amostral dos brancos na amostra. O limite de quantificação, demonstrado pela equação 2, mostra os parâmetros utilizados para a realização do cálculo que utilizam valores obtidos através da medição da concentração em solução dos brancos da amostra. Para obter o resultado em massa (mg kg^{-1}) foi considerado o volume de aferição das soluções obtidas após a decomposição, e a massa da amostra utilizada no método desenvolvido.

$$\text{LOD} = \bar{x} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \times s \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \bar{x} + 10s \quad (2)$$

A exatidão foi avaliada através da realização da decomposição de um CRM de planta aquática para avaliar a concordância nas concentrações dos analitos. Além disso, este CRM contém valores informados de concentrações de todos os analitos, exceto iodo. Para este elemento, adicionou-se uma concentração conhecida de brometo e iodeto previamente à decomposição do CRM, equivalente à 100 mg kg^{-1} deste analito no material de referência. Portanto, foi comprimido 100 mg de um CRM com composição semelhante à amostra (BCR 060, planta aquática), o material foi decomposto pelo método de MIC.

Para a elaboração do comprimido de CRM, 50 mg de amostra foram adicionadas em um pastilhador, e em seguida foi pipetado uma alíquota de 70 μL na amostra da solução de Br^- e I^- com a concentração supracitada (100 mg kg^{-1}) e, sobreposta a esta alíquota, foi adicionada a outra fração da amostra (50 mg). A amostra foi submetida a uma compressão em prensa hidráulica com uma pressão de 60 kN.

A avaliação de precisão das medidas obtidas com o método desenvolvido foi feita realizando o cálculo de desvio padrão (*Standard Deviation* – SD) e desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation* – RSD), a fim de calcular a dispersão dos resultados. Onde: \bar{x} representa a média das medidas; x_1 , x_2 e x_n representam medidas individuais, e n representa o número de replicatas. As equações utilizadas estão demonstradas na Equação 3 e 4:

$$SD = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_1)^2 + (\bar{x} - x_2)^2 + \dots + (\bar{x} - x_n)^2}{n-1}} \quad (3)$$

$$RSD = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}} \quad (4)$$

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8 (ANOVA/teste de Turkey, nível de confiança de 95%) e (Teste *Student*, nível de confiança 95%).

4.8. Determinação de halogênios e enxofre por IC-CD

Diante do exposto na Tabela 2, são apresentadas as condições operacionais do cromatógrafo utilizado. Essas condições foram baseadas em trabalhos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (MESKO, *et al.*, 2019).

Tabela 2. Parâmetros operacionais para a determinação da concentração total de halogênios na forma de F⁻, Cl⁻, Br⁻ e I⁻ e enxofre na forma de SO₄²⁻ por IC-CD.

| Parâmetros | Condição |
|--|-----------------------------|
| IC-CD | |
| Fase móvel | KOH |
| Gradiente da fase móvel | 5 a 90 mmol L ⁻¹ |
| Vazão de eluente (mL min ⁻¹) | 0,28 |
| Volume da injeção (µL) | 50 |
| Tempo de análise (min) | 33 |
| Método de integração do sinal | Área do pico |
| Modo de detecção | Condutividade |

4.9 Preparo das amostras de chá por métodos oficiais

Para a execução do método 915.01 da AOAC que objetiva a determinação de cloreto em plantas, inicialmente foram pesados 5 g de amostra e adicionados 20 mL de CaCO_3 (5%). Após isso, a amostra foi calcinada em forno mufla com temperatura de 500 °C por aproximadamente 4 h. Após a amostra atingir temperatura ambiente, foi realizada a extração do analito com água ultrapura aquecida a 100 °C. Para a total dissolução da amostra foi adicionado ácido nítrico (HNO_3 , 1:4 v/v). A amostra foi filtrada e diluída, em seguida foi realizada a titulação com solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,1 mol L^{-1}), previamente padronizada com solução de cloreto de potássio (KCl , 0,1 mol L^{-1}) e solução indicadora de cromato de potássio (K_2CrO_4 , 40%). O ponto final dessa reação é indicado pela formação de uma solução de coloração vermelho-tijolo, resultante da formação de Ag_2CrO_4 após toda a precipitação de AgCl . Vide equações de reações 5 e 6.



A determinação da concentração é dada a partir da equação:

$$\text{ppm Cl}^- (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{(a - b) \cdot M \cdot 35453}{V_{\text{am}}} \quad (7)$$

Onde,

a = volume de solução de AgNO_3 gasto na titulação da amostra

b = volume de solução de AgNO_3 gasto na titulação do branco

M = concentração molar da solução de AgNO_3 previamente padronizada

V_{am} = volume utilizado na amostra

Para a determinação de flúor (975.04, AOAC), foram pesados 0,25 g de amostra e adicionados 20 mL de HNO_3 (0,05 mol L^{-1}) sob agitação magnética pelo período de 20 min. Em seguida, foram adicionados 20 mL de KOH (0,1 mol L^{-1}) sob agitação durante 20 min. Após isso, foram adicionados 5 mL de solução de citrato de

sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ $0,4 \text{ mol L}^{-1}$) também com agitador magnético pelo período de 20 min. Após isso, a solução foi diluída e analisada por ISE por meio da equação:

$$\text{ppm F (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{(C - 0,10) * 25}{m} \quad (8)$$

Onde,

C = concentração ppm (mg L^{-1}) F da curva

0,10 = correção de fundo ppm (mg L^{-1}) de F na solução final

25 = volume final da solução (mL)

m = massa da amostra (g)

Para enxofre (923.01, AOAC), foi pesado 1 g de amostra e adicionados 15 mL de solução de nitrato de magnésio hexahidratado ($(\text{MgNO}_3)_6\text{H}_2\text{O}$, $3,7 \text{ mol L}^{-1}$). A solução foi mantida em aquecimento em uma temperatura de aproximadamente $180 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 min. Em seguida, ainda quente, a amostra foi submetida ao processo de calcinação por aproximadamente 2 h (tempo suficiente para que a amostra apresentasse aspecto branco, conforme orientado pelo método oficial). Para a dissolução da amostra, esta foi aquecida e adicionado HCl p.a até que não houvesse mais partículas sólidas na solução. Em seguida, a amostra foi filtrada e avolumada em balão volumétrico de 250 mL utilizando água ultrapura. Foi retirada uma alíquota de 200 mL da amostra, aquecida até o ponto de ebulição sob agitação magnética, e adicionados 40 mL de BaCl_2 gota a gota. Após a adição, a amostra ficou em agitação durante 15 min. Adicionou-se 20 mL de água ultrapura quente para a obtenção do precipitado. A amostra foi armazenada em estufa de aquecimento pelo período de 5 h. Para a separação do precipitado, foi utilizado um processo de filtração utilizando água ultrapura quente para a lavagem do precipitado. Após isso, os filtros com o precipitado foram secos em estufa e pesados até atingirem peso constante.

Este método baseia-se na decomposição da amostra em um forno mufla causando a formação de MgSO_4 a partir do enxofre presente na amostra. O HCl age como agente solubilizante de MgSO_4 para a posterior determinação pela formação de precipitado, e pesagem de BaSO_4 . Este método pode ser expresso a partir das

reações de equações 8 e 9. Além disso, a concentração obtida pode ser dada a partir da equação 10.



$$\text{S} = \text{massa do precipitado} * 0,1374 \quad (11)$$

Onde 0,1374 é o fator de correção para a determinação de enxofre via método gravimétrico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Desenvolvimento de método para a determinação de halogênios e enxofre em chás por IC-CD após decomposição por MIC

A MIC tem se demonstrado como uma ferramenta bastante adequada para o preparo de amostras visando a posterior determinação da concentração total de não-metais em vários tipos de amostras (líquidas, semissólidas ou sólidas) com diferentes composições (OZBEK, *et al.*, 2015; MESKO, *et al.*, 2020a; MESKO, *et al.*, 2020b). Apesar disso, é sempre necessário que sejam avaliados alguns parâmetros específicos para cada caso, tendo em vista que cada método de preparo tem sua especificidade. São exemplos disso, a massa máxima de cada amostra que é possível decompor utilizando a MIC e a melhor forma de introdução no sistema, bem como a composição e concentração da solução absorvedora.

Vale ressaltar que o comportamento da reação de combustão varia de acordo com a composição da amostra. Assim, em alguns casos, mesmo a utilização de massas consideradas baixas pode acarretar chamas intensas, capazes de danificar o sistema. Ainda, vale ressaltar que a escolha inapropriada de uma solução absorvedora pode causar a absorção incompleta dos analitos, gerando resultados inexatos e não reproduzíveis. Desta forma, neste capítulo são apresentados os principais resultados obtidos para o desenvolvimento de um método para a determinação de halogênios e enxofre em chás utilizando a cromatografia de íons com detecção condutimétrica (IC-CD).

5.1.1. Avaliação das infusões

Inicialmente, foram realizadas infusões dos cinco tipos de chás, utilizando o procedimento descrito pelo fabricante, para selecionar a amostra com maior concentração de halogênios e enxofre, visando utilizá-la nos estudos subsequentes para otimização dos principais parâmetros da MIC. Na Tabela 3, são apresentadas as concentrações (mg L^{-1}) de Cl, F e S obtidas para cada infusão. Bromo e iodo não foram detectados nas infusões.

Tabela 3. Concentrações de cloro, flúor e enxofre nas infusões de chá (média \pm desvio padrão, n=3).

| Tipos de chás | Concentração (mg kg ⁻¹) | | | | |
|---------------|-------------------------------------|----------------|-------------|---|---------------|
| | Br | Cl | F | I | S |
| Boldo | - | 1767 \pm 113 | < 9** | - | 639 \pm 11 |
| Erva-cidreira | - | 4041 \pm 24 | < 9** | - | 930 \pm 2 |
| Hortelã | - | 6821 \pm 32 | < 9** | - | 3401 \pm 89 |
| Verde | - | 506 \pm 8 | 223 \pm 4 | - | 2116 \pm 10 |
| Preto | - | 529 \pm 9 | 828 \pm 6 | - | 2123 \pm 4 |

*LOQ

Dentre as amostras avaliadas, é possível observar que foi possível quantificar Cl e S em todas as amostras. Esse comportamento já era esperado, tendo em vista que estes elementos fazem parte do ciclo bioquímico das plantas (Chen, *et al.*, 2010; Chao, *et al.*, 2014).

A amostra de chá preto foi a amostra que apresentou maior concentração de flúor (6,84 mg L⁻¹). Além disso, esse resultado está de acordo com estudos reportados na literatura que correlacionam o avanço de casos de fluorose óssea, na China, com o consumo excessivo de chá preto (CAO, *et al.*, 2005), o que reforça a importância da avaliação da concentração de flúor neste tipo de chá. Portanto, tendo em vista que Cl, F e S foram detectados apenas nas infusões de chá verde e chá preto, e que Br e I não foram detectados em nenhuma das infusões analisadas, a amostra de chá preto foi selecionada para os estudos subsequentes de desenvolvimento do método.

5.1.2. Avaliação da massa máxima de amostra possível de ser decomposta por MIC

Para os testes de avaliação da massa máxima de amostra na forma de invólucro não foi possível decompor massas superiores a 100 mg (Figura 3 a). Quando utilizadas massas superiores a esta, a amostra apresentou irreprodutibilidade nas queimas, além de causar danos às tampas de vedação do sistema, conforme demonstrado na Figura 3b.

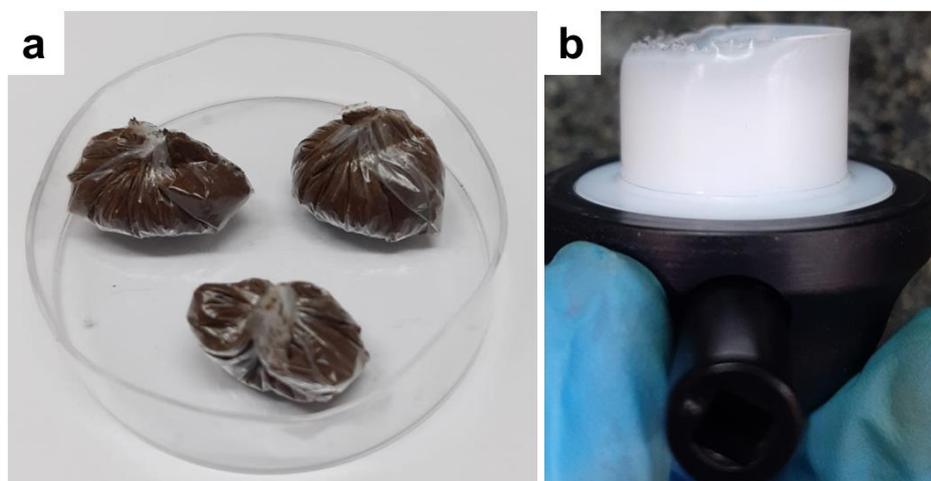


Figura 4. (a) Amostras de 100 mg de chá preto na forma de invólucro (b) danificação na tampa de vedação causada pela decomposição das amostras quando utilizadas massas superiores a 100 mg na forma de invólucro.

A prensa hidráulica utilizada para a confecção dos comprimidos permitia a utilização de no máximo até 500 mg de amostra, portanto, para obter comprimidos com massas superiores a 500 mg, foram feitas combinações de massas, como por exemplo, 1 comprimido de 500 mg somado a 1 comprimido de 100 mg foram sobrepostos e depositados sobre o suporte de quartzo para a obtenção de uma massa de 600 mg, e assim sucessivamente para as demais massas, conforme demonstrado na Figura 4.

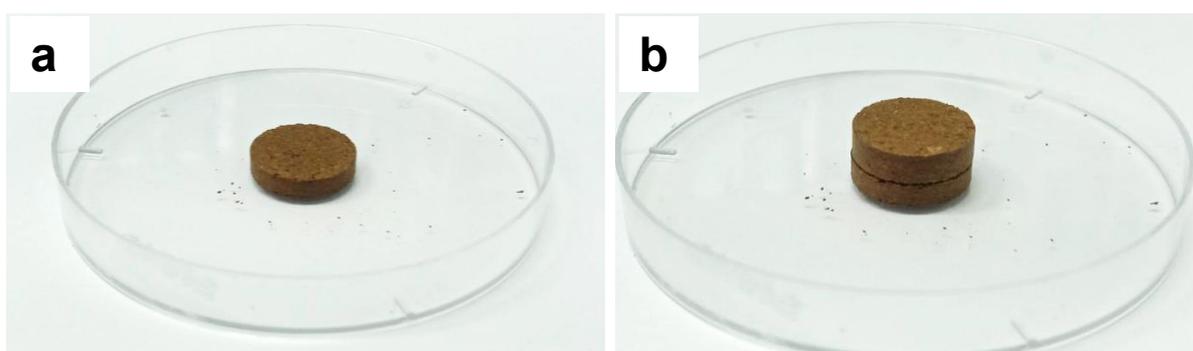


Figura 5. (a) Amostra na forma de comprimido com massa de 500 mg (b) amostra na forma de comprimido com massa de 600 mg utilizando comprimidos sobrepostos de 500 e 100 mg para a obtenção de maiores massas de amostras.

Para massas de amostra superiores a 700 mg na forma de comprimido foi necessário um tempo maior para que a combustão da amostra fosse finalizada e um

novo ciclo de irradiação fosse iniciado, dando sequência a etapa de refluxo da solução absorvedora. Durante a realização desta etapa, foi observado que havia amostra remanescente no suporte, conforme a Figura 5, e caso o processo de refluxo fosse iniciado a combustão seria cessada.



Figura 6. Aspecto visual da amostra ainda em processo de combustão após etapa de irradiação.

Para massas de amostra de 500 mg, o tempo de combustão foi de 87 s, para 700 mg de 120 s, e para 900 mg de 180 s, e o tempo de ignição para todas as massas foi entre 6 e 10 s. Assim, considerando o tempo de combustão para a massa de 900 mg, o seguinte programa de irradiação foi estabelecido, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Programa de irradiação com micro-ondas utilizado para a combustão de amostras de chá.

| Etapa | Potência (W) | Duração | Exaustão |
|------------------|--------------|---------|--------------|
| 1 (ignição) | 1400 | 50 s | Ventilação 1 |
| 2 (combustão) | 0 | 3 min | Ventilação 1 |
| 3 (refluxo) | 1400 | 5 min | Ventilação 1 |
| 4 (resfriamento) | 0 | 20 min | Ventilação 2 |

Taxa de aumento de pressão: 0,8 bar s⁻¹; temperatura máxima: 280 °C; pressão máxima: 80 bar.

Após a etapa de ignição (realizada com uma potência de 1400 W por 50 s), foi adicionada uma nova etapa sem irradiação com micro-ondas, por 3 min, para que a amostra pudesse ser completamente decomposta. Comportamento semelhante foi observado para amostras com compostos que apresentavam cinética de combustão mais lenta (COSTA, 2017).

Com a introdução da amostra no sistema na forma de comprimido, foi possível obter uma combustão completa de até 900 mg de amostra, sem causar danos ao sistema, conforme demonstrado na Figura 6a. Para massa de amostra de 1000 mg não foi possível obter uma combustão completa, demonstrada pelo resíduo remanescente no suporte de quartzo, conforme demonstrado na Figura 6b.

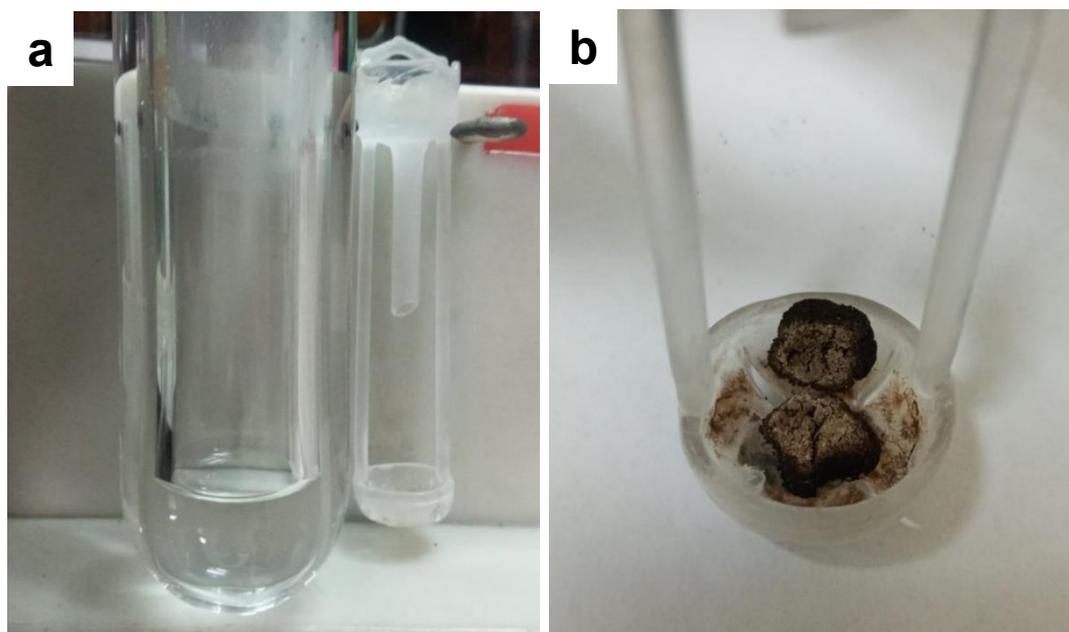


Figura 7. (a) Solução obtida após decomposição de 900 mg (500 mg + 400 mg) de amostra de chá. (b) resíduo apresentado em suporte de quartzo após a decomposição de 1000 mg (500 mg + 500 mg) de amostra de chá.

Vale ressaltar que durante as decomposições das diferentes massas de amostra, a pressão máxima alcançada e o aspecto final da solução foram observados para controlar a segurança e a efetividade da decomposição. A pressão máxima obtida para a combustão de 900 mg de chá foi de 30,4 bar (sendo 80 bar a pressão máxima recomendada pelo fabricante), demonstrando que o método é seguro em termos de condições de operação. A avaliação do aspecto da solução oriunda da decomposição foi feita de maneira visual. Sendo assim, a coloração da solução, a presença de resíduos no frasco e no suporte das amostras, a projeção da amostra na parede dos frascos, e a presença de fuligem em excesso, foram levadas em consideração no fim do processo. Foram consideradas adequadas as decomposições em que as soluções apresentaram aspecto límpido, sem a presença de material não decomposto e fuligem, conforme demonstrado na Figura 7a.

5.1.3. Escolha da solução absorvedora

A escolha da solução absorvedora mais apropriada utilizando 900 mg de amostra, foi feita a partir de ensaios de recuperação em que adicionou-se concentrações conhecidas dos analitos, nos níveis de concentração de 25, 50 e 100%.

A seguir, será discutida esta escolha, e os valores obtidos na etapa inicial desta avaliação estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração dos analitos na amostra de chá preto determinadas por IC-CD após a decomposição por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras (média \pm desvio padrão, n=3).

| Solução absorvedora | Concentração (mg kg ⁻¹) | | | | |
|---|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|----------------------------|
| | Br | Cl | F | I | S |
| Água ultrapura | < 42* | 506 \pm 15 ^a | 779 \pm 10 ^b | < 80* | 2392 \pm 11 ^a |
| NH ₄ OH 25 mmol L ⁻¹ | < 42* | 546 \pm 23 ^a | 865 \pm 30 ^a | < 80* | 2394 \pm 19 ^a |
| NH ₄ OH 50 mmol L ⁻¹ | < 42* | 540 \pm 37 ^a | 822 \pm 16 ^a | < 80* | 2397 \pm 31 ^a |
| NH ₄ OH 100 mmol L ⁻¹ | < 42* | 548 \pm 21 ^a | 835 \pm 19 ^a | < 80* | 2399 \pm 17 ^a |
| NH ₄ OH 150 mmol L ⁻¹ | < 42* | 562 \pm 15 ^a | 823 \pm 11 ^a | < 80* | 2394 \pm 23 ^a |

*LOQ

^{a,b}Letras minúsculas iguais na coluna não possuem diferença significativa (ANOVA/Teste Tukey, nível de confiança de 95%)

Como pode ser observado na Tabela 5, para o teste com água ultrapura como solução absorvedora, a concentração de flúor foi inferior e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) comparada às demais soluções. Isso indica que a água pode não ter sítios de interação (H^+) suficientes que sejam capazes de absorver, ou ligar-se ionicamente, com todos os íons do analito presente na amostra. Além disso, vale ressaltar que não foi possível quantificar bromo e iodo na amostra, independente da solução absorvedora avaliada pois as concentrações estavam abaixo do limite de quantificação do método.

A definição de concentração da solução padrão foi feita partindo dos valores obtidos nas soluções absorvedoras de NH_4OH , visto que para as concentrações dos analitos nestas soluções (25, 50, 100 e 150 mmol L^{-1}), não houve diferença estatística ($p < 0,05$) nas concentrações de Cl, F e S. Portanto, a partir das concentrações obtidas nesta etapa inicial, estas concentrações foram adicionadas à amostra em níveis diferentes (25, 50 e 100%) para todas as outras soluções absorvedoras avaliadas. As soluções finais obtidas também foram analisadas por IC-CD.

Os resultados dos ensaios de recuperação obtidos estão representados na Figura 7. As concentrações adicionadas representam 100% da concentração dos analitos, previamente determinadas na amostra. Para o ensaio de recuperação de bromo e iodo, foi adicionada uma concentração que representou 5x o LOQ para bromo e 2,5x o LOQ para iodo, tendo em vista que estes analitos não foram detectados na amostra analisada. O brometo é um íon que sofre interferência cromatográfica do nitrato devido à sua alta concentração, causando a coeluição do pico de brometo. Para que essa interferência não ocorresse, foi aumentada a concentração de brometo.

Na Figura 7, as barras maiores representam as médias de recuperação obtidas e as barras de erros representam o desvio padrão das medidas. Como pode ser visto, a utilização de água ultrapura como solução absorvedora não propiciou recuperação satisfatória para flúor (40%), e o mesmo comportamento se repete para soluções de 25 e 50 mmol L^{-1} de NH_4OH (40 e 80%, respectivamente). Por outro lado, quando a solução absorvedora de NH_4OH 100 mmol L^{-1} foi utilizada, foi obtida uma recuperação de 102% para flúor, para cloro foi obtida recuperação de 101%, para enxofre e bromo foram obtidas recuperações de 103 e 100%, e para iodo foi obtida uma recuperação

de 95%. A cerca da solução absorvedora de 150 mmol L⁻¹, foram obtidas recuperações de 101% para flúor, 103% para cloro, 102% para enxofre, 104% para bromo e 105% para iodo.

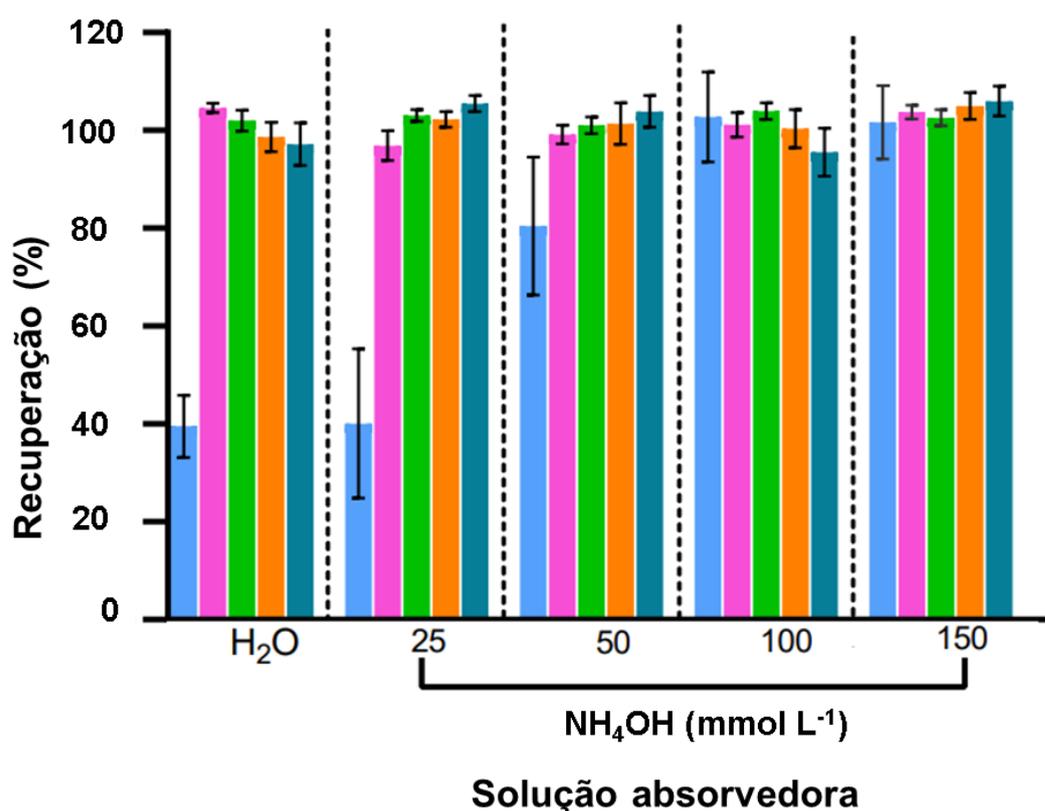


Figura 8. Recuperações obtidas para (■) flúor, (■) cloro, (■) enxofre, (■) bromo e (■) iodo em chá preto após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras para o nível de adição de 100%, (n=3).

As baixas recuperações para flúor podem estar associadas aos baixos valores de pH nas soluções absorvedoras de água ultrapura, 25 mmol L⁻¹ e 50 mmol L⁻¹ de NH₄OH que apresentaram um pH de 2, 3 e 3, respectivamente. Essa baixa recuperação obtida nessas soluções absorvedoras se deve ao fato da formação de espécies voláteis em meio ácido reduzindo significativamente a recuperação deste analito (FLORES *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2013; TJABADI; MKETO, 2019). A acidez da solução pode estar relacionada a matriz amostral, tendo em vista que fatores como íons livres em solução e teor de gás carbônico dissolvido podem afetar diretamente o

pH da solução (SKOOG *et al.*, 2018). Sendo assim, apenas quando utilizadas soluções com maiores concentrações (100 e 150 mmol L⁻¹ NH₄OH) foi possível obter uma recuperação satisfatória para todos os analitos. Os valores de pH para estas soluções foram em torno de 8.

Foram realizados ensaios de recuperação para os níveis de 50% e 25% adicionando uma solução padrão contendo concentração conhecida dos analitos presentes na amostra. Para o nível de 50%, é possível observar as recuperações obtidas na Figura 8, em que para a solução absorvedora de 25 mmol L⁻¹ foram de 97% para F, 105% para Cl, 105% para S, 104% para Br e 103% para I. Para a solução absorvedora de 50 mmol L⁻¹ foram obtidas recuperações de 102% para F, 107% para Cl, 103% para S, 103% para Br e 105% para I. Com a solução de 100 mmol L⁻¹ foi possível obter recuperação de 104% para F, 106% para Cl, 102% para S, 103% para Br e 102% para I, e para 150 mmol L⁻¹, obteve-se recuperações de 102% para F, 105% para Cl, 104% para S, 101% para Br e 102% para I.

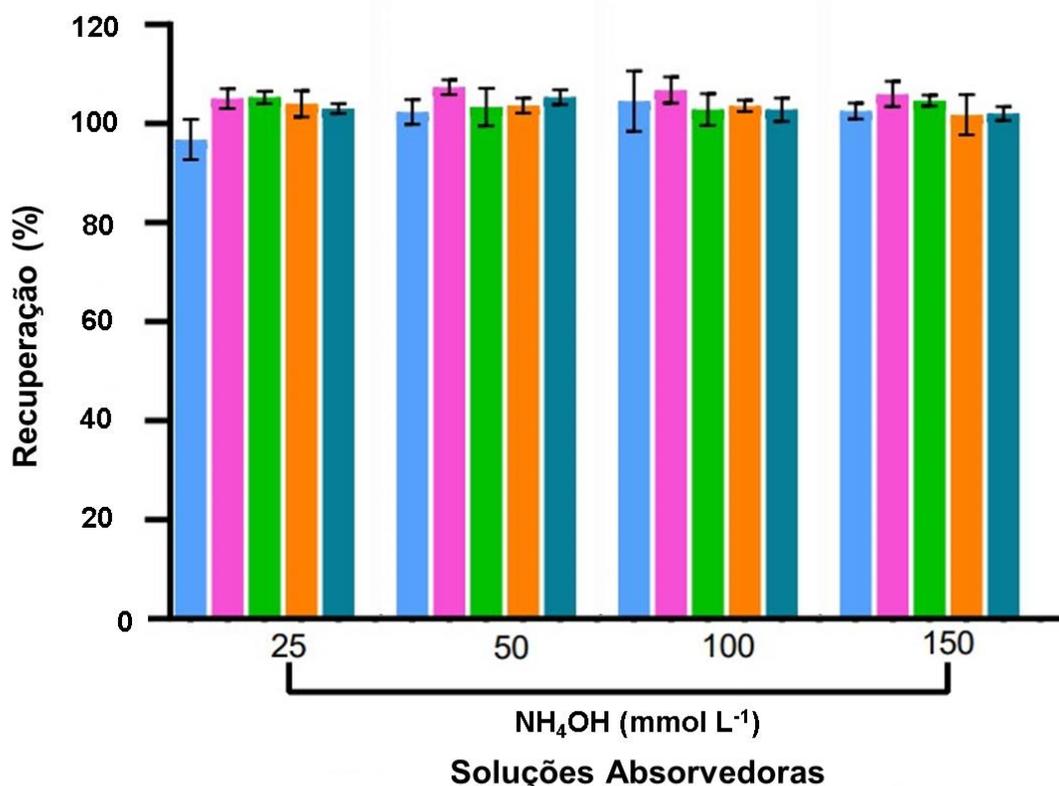


Figura 9. Recuperações obtidas para (■) flúor, (■) cloro, (■) enxofre, (■) bromo e (■) iodo em chá preto após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras para o nível de adição de 50% (n=3).

Para as recuperações no nível de 25%, conforme a Figura 9, as recuperações foram obtidas na solução absorvedora de NH₄OH 25 mmol L⁻¹ foram de 101% para F, 106% para Cl e S, 108% para Br e 103% para I. Para a segunda solução absorvedora avaliada (NH₄OH 50 mmol L⁻¹) as recuperações foram de 104% para F, 103% para Cl, 105% para S, 107% e 103% para Br e I. No que diz respeito as recuperações obtidas na solução de 100 mmol L⁻¹, foi possível obter os respectivos valores, 104% para F, 108% para Cl, 107% para S, 105% para Br e 103% para I. Por fim, para a solução de 150 mmol L⁻¹, as recuperações foram de 103% para F, 107% para Cl, 109 e 101% para S e Br, e por fim, 102% para I.

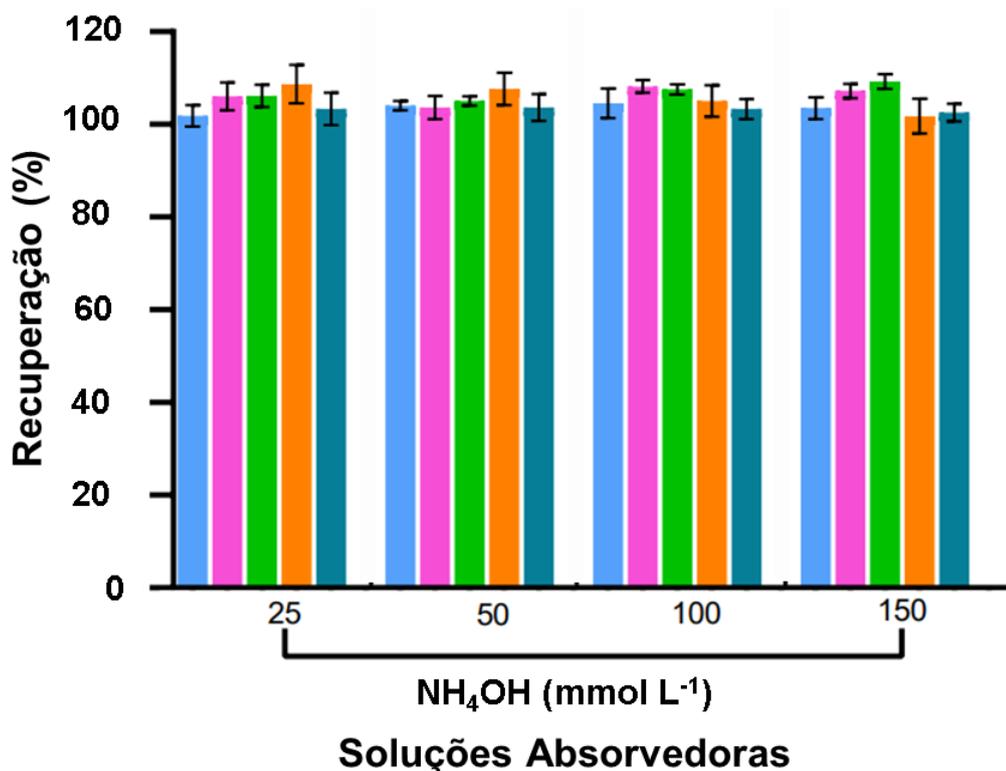


Figura 10. Recuperações obtidas para (■) flúor, (■) cloro, (■) enxofre, (■) bromo e (■) iodo em chá preto após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras para o nível de adição de 25%, (n=3).

Além disso, foram avaliados os RSDs e o valor obtido para as soluções de água ultrapura, 25 e 50 mmol L⁻¹ foi de 3%, e para as soluções de 100 e 150 mmol L⁻¹ foi de 5%. Apesar de as soluções de 100 e 150 mmol L⁻¹ apresentarem um valor de RSD maior, cabe salientar que estas foram as soluções que apresentaram adequabilidade para a absorção de todos os analitos, sendo assim a solução de 100 mmol L⁻¹ foi escolhida como condição do método por ser mais diluída quando comparada à solução de 150 mmol L⁻¹.

Adicionalmente, em relação aos valores de recuperações obtidos nesta etapa do estudo, destaca-se que para os diferentes níveis (25, 50 e 100%), os valores de recuperação estão dentro dos critérios de aceitação previstos na orientação de validação de métodos do INMETRO, que prevê como critério de aceitação recuperações no intervalo de 90 a 107%, para amostras com concentrações de

analitos a partir 100 mg kg⁻¹. Sendo assim, é possível afirmar que o método desenvolvido demonstra exatidão satisfatória para posterior quantificação de halogênios e enxofre em chás (INMETRO, 2020).

5.1.4. Faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, análise de CRM

A linearidade do método foi dada a partir da avaliação da curva de calibração dos analitos, diluídos em água ultrapura, conforme a sensibilidade da técnica de determinação, nesse caso, a IC-CD. Na Tabela 6 são apresentadas as faixas de trabalho utilizadas para a execução do trabalho, e seus respectivos coeficientes de correlação linear (r).

Tabela 6. Faixas de trabalho e coeficientes de correlação linear obtidos no trabalho desenvolvido.

| Analito | Faixa de trabalho (mg L⁻¹) | Equação da reta | r |
|----------------|--|------------------------|----------|
| Br | 0,05 – 1,5 | $y = 0,9952x + 0,0051$ | 0,99946 |
| Cl | 0,1 – 1,5 | $y = 1,0208x - 0,0221$ | 0,99706 |
| F | 0,1 – 1,5 | $y = 0,9711x - 0,0182$ | 0,99780 |
| I | 0,1 – 1,5 | $y = 1,0001x - 0,0001$ | 0,99570 |
| S | 1,0 – 12 | $y = 0,9999x - 0,0009$ | 0,99535 |

Dado os valores expostos acima, é possível observar que os coeficientes lineares obtidos neste trabalho foram adequados, para todos os analitos, dentro da faixa estabelecida de $r > 0,990$ pela ANVISA (2017).

A respeito das concentrações dos analitos obtidas a partir da avaliação do CRM, a concentração informada de bromo correspondia a 20 mg kg⁻¹ de bromo, uma concentração abaixo do LOQ do método para este analito. Devido à baixa concentração deste elemento presente no CRM e a dificuldade na determinação de brometo que sofre interferência pelo nitrato na cromatografia de íons, foi adicionada uma alíquota de solução padrão com concentração conhecida do analito, equivalente à 100 mg kg⁻¹ de bromo no CRM, previamente à decomposição. Vale destacar que para iodo não havia concentração informada deste analito, portanto, adicionou-se uma solução de concentração conhecida, equivalente a concentração em massa de 100 mg kg⁻¹ de iodo.

Adicionalmente, por se tratar de uma amostra botânica, compreende-se que a concentração de espécies nitrogenadas pode ser elevada, devido à necessidade das plantas em obter altas concentrações de nitrato e amônio para ter um bom crescimento (Singh, *et al.*, 2022). Além disso, no preparo da MIC a solução ignitora utilizada neste método é composta por nitrato de amônio, o que pode influenciar no aumento da concentração de nitrato na amostra. Esse aumento de concentração de nitrato, bem como a similaridade no tempo de retenção entre nitrato e brometo, pode ser um fator prejudicial na quantificação de brometo por cromatografia de íons, quando este analito estiver em concentrações baixas. Pois, o excesso de concentração de nitrato, pode causar a coeluição do íon brometo, não sendo possível quantificá-lo (Morrow; Minear, 1984; Zhu, *et al.*, 2006).

Após a decomposição, as soluções foram analisadas por IC-CD e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Concordância entre os valores informados com os obtidos após análise do CRM BCR 060, planta aquática, utilizando o método proposto neste estudo (média \pm desvio padrão, n=3).

| Valores | Concentração (mg kg ⁻¹) | | | | |
|--------------|-------------------------------------|-----------------|---------------|-------------|----------------|
| | Br* | Cl | F | I* | S |
| Informado | 120 | 10000 | 24 | 100 | 5200 |
| Obtido | 122 \pm 3 | 10710 \pm 169 | 25 \pm 0,20 | 106 \pm 9 | 5289 \pm 154 |
| Concordância | 101% | 107% | 104% | 106% | 101% |

*valor adicionado (100 mg kg⁻¹)

Conforme a Tabela 7, pode ser observado que foram obtidas concordâncias de 101 a 107% para todos os analitos com concentrações informadas no CRM, bem como a concentração adicionada para brometo e iodeto, resultando em recuperações adequadas. Os limites de detecção e quantificação estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Limites de detecção e de quantificação obtidos para o método proposto.

| Analito | LOD (mg kg⁻¹) | LOQ (mg kg⁻¹) |
|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Br | 17 | 42 |
| Cl | 2 | 3 |
| F | 4 | 9 |
| I | 31 | 80 |
| S | 1 | 2 |

Os valores de LOD e LOQ foram adequados para a amostra utilizada, apesar de Br e I apresentarem concentrações abaixo do LOQ. Vale salientar que os valores apresentados neste estudo foram calculados utilizando como massa de amostra 900 mg.

Quando comparados o LOD e LOQ para F obtidos neste estudo com estudos que utilizaram a MIC como preparo de amostra para matrizes alimentares e a IC-CD como técnica de determinação, MESKO *et al.* (2020b) obtiveram valores de LOD de 4,9 mg kg⁻¹ e LOQ de 10,4 mg kg⁻¹, no presente estudo foram obtidos valores semelhantes. Ao comparar os valores obtidos para Cl neste estudo, com os valores obtidos em trabalhos que utilizaram a IC-CD como técnica de determinação, MESKO *et al.* (2020a) obtiveram valores de LOD e LOQ de 15 e 21 mg kg⁻¹, respectivamente. Enquanto que para este estudo foi possível obter menores valores de LOD e LOQ.

Considerando o método de preparo deste trabalho com métodos de preparo reportados em literatura, para Br em plantas medicinais, neste trabalho foi possível obter LOQ de 42 mg kg⁻¹. Em contrapartida, NASCIMENTO *et al.* (2017), obtiveram valor de LOQ de 3,3 mg kg⁻¹ para bromo.

5.2. Determinação de halogênios e enxofre por métodos oficiais (AOAC)

Como forma de avaliar a exatidão e comparar alguns parâmetros de mérito do método proposto para a determinação de halogênios e enxofre em chás, os elementos cloro, flúor e enxofre foram determinados seguindo os procedimentos recomendados pela AOAC para análise de folhas de plantas. Cabe salientar que nesta etapa não

pueram ser avaliados os elementos bromo e iodo, pois não há métodos oficiais para a determinação destes em folhas de plantas.

Posto isto, na Tabela 9, quando comparados método proposto e método oficial, é possível observar que o método proposto demonstrou valores de desvio-padrão satisfatórios (variando de 1 a 4%) e similares aos valores do método oficial (2 a 4%). Vale ressaltar que as concentrações obtidas pelo método proposto apresentaram concordâncias satisfatórias quando comparadas com o método oficial, variando entre 95 e 105%. Além disso, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os métodos, para nenhum dos analitos avaliados (teste *student*, nível de confiança de 95%).

Tabela 9. Comparações das concentrações obtidas para Cl, F e S em chá preto pelo método proposto neste trabalho e pelos métodos 915.01, 975.04 e 923.01 recomendados pela AOAC (média \pm desvio-padrão, desvio padrão relativo, n=3).

| Analitos | Método oficial (mg kg⁻¹) | Método proposto (mg kg⁻¹) | Concordância (%) |
|-----------------|--|---|-----------------------------|
| Bromo | - | - | - |
| Cloro | 547 \pm 21 (4%) | 575 \pm 22 (4%) | 105% |
| Flúor | 822 \pm 16 (2%) | 815 \pm 9 (1%) | 99% |
| Iodo | - | - | - |
| Enxofre | 2.542 \pm 76 (3%) | 2.419 \pm 129 (4%) | 95% |

Os dados de concordâncias obtidos para os analitos apontam que o método proposto é capaz de produzir os mesmos resultados que o método oficial, estando dentro do critério de aceitação de 90 a 107% (INMETRO, 2020). Estes resultados satisfazem os objetivos desse estudo, uma vez que o método proposto permite o uso de menor volume de reagentes (produzindo uma menor geração de resíduos), além

de possuir um menor número de etapas (favorecendo a execução do método em um tempo hábil) e permitir a determinação de todos os analitos em única técnica de determinação e único método de preparo. Portanto, a IC por se tratar de uma técnica multielementar, torna-se mais apropriada quando se visa a quantificação de vários analitos. Tendo em vista que os métodos oficiais, em sua maioria, são morosos em sua execução além de serem executado com técnicas de determinação monoelementares.

A Tabela 10 apresenta um resumo comparativo das etapas realizadas em cada método (oficial e proposto) além de indicar as técnicas de quantificação utilizadas. Pode ser observado nos métodos recomendados pela AOAC um maior número de etapas durante a realização do procedimento, tempos de preparo prolongados, combinação de muitos reagentes, massas de amostra superiores ao método proposto para Cl e S, além da determinação monoelementar. Além disso, não existe método oficial para a determinação de Br e I. Em contrapartida, também é possível observar no método proposto que com um menor tempo de preparo e com única massa de amostra, solução absorvedora e técnica de determinação é possível determinar todos os analitos com valores de RSDs comparáveis aos RSDs obtidos em métodos oficiais.

Tabela 10. Comparação da execução dos métodos oficiais e proposto.

| Métodos Oficiais | | Método Proposto | |
|--|--|--|---|
| Execução do método para CI (AOAC 923.01) | Execução do método para S (AOAC 915.01) | Execução do método para F (AOAC 975.04) | Execução do método para Br, Cl, F, I e S |
| 1. 5000 mg de amostra | 1. 1000 mg de amostra + 15 mL de (MgNO ₃)6H ₂ O + aquecimento em chapa aquecedora | 1. 250 mg de amostra | 1. Preparo do comprimido (900 mg de amostra) |
| 2. 20 mL de CaCO ₃ (5%). | (± 180 °C) | 2. 20 mL de HNO ₃ (0.05 mol L ⁻¹) | 2. Preparo da solução absorvedora (6 mL de NH ₄ OH |
| 3. Calcinação em forno mufla por 4 h ± 500 °C. | 2. Calcinação em forno mufla por 2 h. | 3. Agitação de 20 min | 100 mmol L ⁻¹) |
| 4. Extração com água quente. | 3. Dissolução da amostra com HCl p.a + filtração + avolumar a solução obtida em 200 mL. | 4. 20 mL de KOH (0,1 mol L ⁻¹) | 3. Combustão por MIC 30 min (até 8 amostras por rodada) |
| 5. Dissolução da amostra com HNO ₃ (1:4). | 4. Aquecimento com agitação 200 mL até ponto de ebulição + adição de 40 mL de BaCl ₂ gota a gota, sob agitação. | 5. Agitação por 20 min | 4. Coleta da solução digerida |
| 6. Determinação portitulação argentimétrica. | 5. Armazenamento em estufa de aquecimento por ± 5 h. | 6. 5 mL de Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (0,4 mol L ⁻¹) | 5. Filtração da solução da amostra |
| | 6. Adicionar 20 mL de água quente para formar precipitado. | 7. Agitação durante 20 min. | 6. Diluição da solução da amostra |
| | 7. Filtração com lavagem usando água quente. | 8. Determinação por ISE. | 7. Determinação por IC-CD de todos os analitos. |
| | 8. Determinação por gravimetria. | | |

5.3. Determinação de halogênios e enxofre em diferentes chás por IC-CD após a MIC

O método proposto foi aplicado para a determinação de halogênios e enxofre em variados tipos de chás. As concentrações são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração de halogênios e enxofre obtidos com o método proposto utilizando 900 mg de amostra e solução absorvedora de 100 mmol L⁻¹ de NH₄OH (média ± desvio-padrão, desvio padrão relativo, n=3).

| Tipos de chás | Concentração (mg kg ⁻¹) | | | | |
|---------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------|
| | Br | Cl | S | F | I |
| Boldo | < 42* | 2420 ± 59 (2%) | 786 ± 15 (2%) | < 9* | < 80* |
| Erva-cidreira | < 42* | 4243 ± 84 (2%) | 1100 ± 24 (2%) | < 9* | < 80* |
| Hortelã | < 42* | 6961 ± 64 (1%) | 4023 ± 62 (2%) | < 9* | < 80* |
| Verde | < 42* | 549 ± 24 (4%) | 2530 ± 76 (3%) | 223 ± 4 (4%) | < 80* |
| Preto | < 42* | 557 ± 9 (2%) | 2605 ± 10 (4%) | 828 ± 6 (2%) | < 80* |

*LOQ

Dentre os tipos de chás avaliados, flúor foi quantificado apenas nos chás do tipo verde e preto, sendo assim, foram obtidas concentrações que variaram entre 223 e 828 mg kg⁻¹. Os resultados corroboram com outros reportados na literatura, no estudo de Zhang *et al.*, (2023) foram obtidas concentrações que variaram na faixa de 6 a 808 mg kg⁻¹ para amostras de chá de preto. As amostras avaliadas neste estudo são de diversas regiões da China, os autores utilizaram um método oficial que consiste em uma extração com ácido perclórico, tamponada com citrato sódio-acetato de sódio e determinação por potenciometria de íon seletivo.

As concentrações de cloro e enxofre nas amostras analisadas foram comparadas com resultados obtidos no estudo de Desideri *et al.* (2010). A concentração de cloro e enxofre em *Mentha arvensis* (Hortelã) foi de 5714 mg kg⁻¹ para cloro e 3899 mg kg⁻¹ para enxofre. Neste estudo, foram obtidas concentrações de 6961 mg kg⁻¹ para cloro e 4023 mg kg⁻¹ para enxofre. Na amostra de *Melissa officinalis* (Erva-cidreira), Desideri *et al.*, (2010) obteve concentração de cloro de 3549 mg kg⁻¹. No presente estudo, a concentração de cloro foi de 4243 mg kg⁻¹ em erva-cidreira. Em todos os tipos avaliados foram encontradas concentrações significativas de cloro e enxofre, este é um comportamento esperado tendo em vista que estes elementos

fazem parte do ciclo bioquímico das plantas. O preparo de amostra avaliado no estudo de Desideri et al. (2010) foi realizado a partir da homogeneização da amostra sólida com um aglutinante para obtenção de pastilhas. A técnica de determinação utilizada foi espectrometria de fluorescência de raios-x polarizados, cabe salientar que para este estudo foram analisadas amostras de diferentes regiões do mundo incluindo China, Itália e outras.

No que diz respeito às concentrações de Br e I nos chás avaliados para este trabalho, as concentrações foram abaixo do LOQ do método (42 mg kg^{-1} para Br e 80 mg kg^{-1} para I), porém foi possível detectá-los em praticamente todos os tipos, exceto boldo. Adicionalmente, no estudo de Nascimento, *et al.* 2017, foram obtidas concentrações que variaram de $0,17 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ a $53,1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de bromo e para iodo, foi obtida a concentração máxima de $1,27 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de plantas medicinais.

Tendo em vista os resultados obtidos reforça-se a necessidade de viabilizar métodos de preparo que possuam um menor tempo de execução, uma menor quantidade de reagente, contemplados por técnicas multielementares, como o método proposto neste estudo.

5.4. Comparação da concentração total de halogênios e enxofre em chás diversos e suas respectivas infusões

Após a aplicação do método proposto para a determinação de halogênios e enxofre em amostras de chá, foi avaliada a porcentagem de lixiviação dos analitos a partir das concentrações obtidas nas infusões dos chás, descritas no item 5.1.1. deste trabalho. Esta avaliação foi realizada devido às concentrações significativas que foram obtidas principalmente para F em chá preto, considerando que este pode ser potencialmente tóxico quando comparado com Cl e S que são mais fundamentais ao organismo do que F. Conforme demonstrado na Tabela 12, não foi possível quantificar F para os tipos de chás de boldo, erva-cidreira e hortelã, devido à baixa concentração deste analito nestes chás. Além disso, para boldo, a determinação de flúor também não foi possível devido à interferência cromatográfica que esta amostra sofre no tempo de retenção de flúor.

Nas amostras de chá verde e chá preto foram lixiviados em cada infusão, 88 e 97% de flúor, respectivamente. Essas porcentagens elevadas demonstram que a

quantidade de flúor presente nos chás é solúvel em água, estando associado à sua presença na forma inorgânica (F^-). É possível observar para os chás dos tipos de boldo, cidreira, hortelã, chá verde e chá preto as seguintes porcentagens de lixiviação: i. Para cloro, as porcentagens foram de 73, 95, 98, 92 e 94%, respectivamente; ii. Para enxofre foram observadas porcentagens de lixiviação de 81, 84, 84, 83 e 81%, respectivamente. Esses resultados já eram esperados, devido à alta concentração dessas espécies nas amostras. Isso acontece, pois, cloro e enxofre são elementos essenciais para o funcionamento das plantas, participando de sua atividade osmótica e crescimento. Além disso, a alta porcentagem de lixiviação destes elementos também está associada à forma química que estes se apresentam (Cl^- e SO_4^{2-}), tendo em vista que esta é a mesma forma química utilizada para a quantificação destas espécies na técnica de determinação proposta por esse trabalho, a IC-CD.

Apesar das infusões extraírem mais de 70% dos analitos, é importante ter um método de preparo como a MIC que permita a determinação da concentração total destes analitos. A partir da concentração total é possível estimar quanto destes elementos podem ser lixiviados para a infusão, por exemplo, pode-se observar que para enxofre as porcentagens de lixiviação foram em torno de 80%, demonstrando que cerca de 20% desta infusão compõe a parte não lixiviada da amostra que pode estar presente no chá em outras formas químicas. Portanto, cabe um estudo de especiação para essas amostras, para que possam ser identificadas outras formas em que esses elementos se apresentam nessas amostras de chá.

Tabela 12. Comparação entre as concentrações dos analitos obtidas nos chás e nas suas respectivas infusões.

| Tipos de chá | Concentração (mg kg ⁻¹) | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------|------|------------------------|------------------|------|------------------------|-------------------|------|
| | CI | | | F | | | S | | |
| | Total (MIC + IC-CD) | Infusão | (%)* | Total (MIC + IC-CD) | Infusão | (%)* | Total (MIC + IC-CD) | Infusão | (%)* |
| Boldo | 2420 ± 59 (2%) | 1767 ± 113 (6%) | 73 | < 9** | < 9** | - | 786 ± 15 (2%) | 639 ± 11 (1%) | 81 |
| Erva - cidreira | 4243 ± 84 (2%) | 4041 ± 24 (2%) | 95 | < 9** | < 9** | - | 1100 ± 24 (2%) | 930 ± 2 (2%) | 84 |
| Hortelã | 6961 ± 64 (1%) | 6821 ± 32 (1%) | 98 | < 9** | < 9** | - | 4023 ± 62 (2%) | 3401 ± 89 (3%) | 84 |
| Verde | 549 ± 24 (4%) | 506 ± 8 (2%) | 92 | 223 ± 4 (4%) | 198 ± 2 (1%) | 88 | 2530 ± 76 (3%) | 2116 ± 10 (2%) | 83 |
| Preto | 557 ± 9 (2%) | 529 ± 9 (2%) | 94 | 828 ± 6 (2%) | 807 ± 46 (2%) | 97 | 2605 ± 10 (4%) | 2123 ± 4 (2%) | 81 |

*Concentração da infusão em termos de porcentagem em relação a MIC.

**LOQ

5.5. Estimativa da ingestão diária de halogênios e enxofre

A partir da avaliação comparativa (concentração total *versus* concentração na infusão), considerando as porcentagens de lixiviação relativamente altas, também foi avaliado quanto em volume (L) seria necessário consumir de cada chá para que fosse possível atingir a recomendação diária desses elementos presentes nessas infusões. Os valores estão descritos na Tabela 13.

Vale ressaltar que as considerações realizadas neste item foram feitas a partir das recomendações de ingestão diária para cada elemento: 3,1 g dia⁻¹ para cloro (TRUCK, et al., 2019), considerando um homem adulto; 4,6 mg kg⁻¹ para flúor considerando um homem adulto de 75 kg (INSTITUTO DE MEDICINA DO ESTADOS UNIDOS, 1997) e 140 g dia⁻¹ para enxofre em que não há especificações de gênero nem faixa etária para esta recomendação (ANASTASSAKIS, 2022). Além disso, vale ressaltar que estas avaliações foram feitas considerando o chá como única fonte de ingestão.

Tabela 13. Volume necessário para ingestão de infusões de chá para atingir as concentrações de ingestões diárias recomendadas.

| Infusão dos chás | Ingestões diárias (L) | | |
|------------------|-----------------------|-----|-------|
| | Cl | F | S |
| Boldo | 161 | - | 22452 |
| Erva - cidreira | 91 | - | 15981 |
| Hortelã | 54 | - | 4122 |
| Chá Verde | 676 | 163 | 6633 |
| Chá Preto | 760 | 44 | 7900 |

Conforme a Tabela 12, observa-se que para cloro, o menor volume obtido foi no chá de hortelã, correspondendo a 54 L de infusão. Este comportamento era

esperado, tendo em vista que a espécie de hortelã foi a que apresentou maior concentração de cloro sendo assim, é preciso um volume menor quando comparado com os demais volumes obtidos para os chás avaliados neste estudo. Nessa mesma linha de raciocínio, o chá que apresentou menor concentração de cloro (chá preto), requer um volume de 760 L de infusão para atingir a ingestão diária recomendada.

Para as amostras de boldo, erva-cidreira e hortelã não foi possível avaliar o volume de ingestão necessário para atingir o valor recomendado para flúor. Tendo em vista que não foi possível obter concentrações deste elemento quando realizada a avaliação das infusões, descritas no item 5.1.1 deste trabalho. Em chá preto e chá verde foi possível avaliar o volume máximo de consumo em 44 L e 163 L, respectivamente.

Para enxofre, foi estimado como volume máximo, 22 000 L para boldo, e 4 000 L para hortelã como volume mínimo. Todos os valores de volumes obtidos correspondem às concentrações totais obtidas neste estudo.

Baseado nos resultados obtidos e nas especificações de ingestões diárias consideradas, pode-se concluir que para ultrapassar os limites máximos de ingestão desses elementos, apenas ingerindo chá, seriam necessários volumes muito altos (de 44 L até 22 000 L). Dessa forma, pode-se considerar que as amostras avaliadas nesse estudo são consideradas seguras quanto à ingestão desses elementos, porém vale ressaltar que essa afirmação é realizada quando considerados apenas os parâmetros avaliados neste estudo.

6. CONCLUSÃO

O método proposto neste trabalho utilizando a MIC para o preparo de amostras e da IC-CD para a posterior determinação de halogênios e enxofre foi adequado. Foi observado a necessidade da introdução da amostra no sistema na forma de comprimidos, possibilitando que a reação de combustão ocorresse de forma controlada, além da obtenção de maiores massas de amostras a serem decompostas. Além disso, vale ressaltar que foi necessário realizar a otimização do programa de irradiação utilizado para a total decomposição da amostra.

Na análise cromatográfica foi possível obter valores de concordância satisfatórios para a determinação de halogênios e enxofre, que demonstram a exatidão do método, expressos em concordâncias de 101 a 107% usando o CRM (BCR 060, planta aquática). Além das concordâncias entre os resultados obtidos em métodos oficiais e o proposto que variou entre 95 e 105%. O método proposto pode ser considerado ambientalmente amigável por utilizar soluções diluídas e menos etapas, pequenas massas de amostra e gera menor quantidade de resíduos quando comparado aos métodos oficiais executados neste trabalho. Além disso, são quantificados cinco analitos em uma única determinação.

A partir dos parâmetros otimizados, foi possível quantificar praticamente todos os analitos, em todos os tipos de chás, exceto para bromo e iodo. Porém, para estes analitos vale destacar que foram possíveis detectá-los nas amostras, mas não foi quantificá-los. É importante destacar que o estudo foi aplicado para a avaliação de halogênios e enxofre em diferentes tipos de chás, tendo em vista que estes produtos são amplamente consumidos. As comparações entre as concentrações totais e obtidas nas infusões mostrou que apesar desses elementos estarem em uma espécie química bastante solúvel em água, é importante utilizar um método de preparo como a MIC que possibilite a determinação da concentração total desses analitos. Pois a partir da concentração total é possível avaliar quanto desses elementos podem lixiviar para a infusão. Vale ressaltar que o consumo dos chás avaliados neste estudo foi considerado seguro, tendo em conta apenas os parâmetros avaliados neste estudo, como ingestão diária e porcentagens de lixiviação.

7. PROJEÇÕES FUTURAS

A partir dos resultados alcançados e do potencial que o método desenvolvido apresentou, estudos devem ser realizados para novas avaliações visando principalmente a determinação de bromo e iodo nestes chás, como por exemplo, a obtenção de menores valores de LODs e LOQs utilizando maiores massas de amostras a partir da combinação de queimas sucessivas, ou ainda a utilização de técnicas de determinação que possam apresentar uma maior sensibilidade. Destaca-se também a importância da avaliação de variáveis como massa de amostra e concentração de solução absorvedora, por meio de análise multifatorial, para que se possa ser definido futuramente a melhor condição para a absorção desses analitos da forma mais satisfatória possível.

Além disso, estudos podem ser continuados visando avaliar outros tipos de chás de diferentes regiões do Brasil e do mundo. Considerando suas concentrações totais e de infusões, porcentagem de lixiviação, bem como a quantidade necessária de consumo para cada analito avaliado neste estudo. Adicionalmente, seguindo a temática acerca de concentração e absorção do organismo, podem também ser realizados ensaios de bioacessibilidade destes elementos no organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 166**, 2017. Disponível em:

http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acessado em: 13 jul. 2023

AKHDHAR, A., SCHNEIDER, M., HELLMANN, S., ORME, A., CARASEK E., KRUPP, E. M., FELDMANN, J., The use of microwave-induced plasma optical emission spectrometry for fluorine determination and its application to tea infusions, **Talanta**, v. 227, p. 122190, 2021.

ANASTASSAKIS, K., Sulfur (S), **Springer**, v. 62, p. 357 – 362, 2022.

BADACCO, D., DI MARCO, V., PIOVAN, A., CANIATO, R., PASTORE, P., A procedure for the quantification of total iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry, and its application to the determination of iodine in algae sampled in the lagoon of Venice. **Analytical Methods**, v. 8, n.41, p. 7545 – 7551, 2016.

BARBOSA, M. C. S., BELLETI, K. M. De S., CORRÊA, T. F., SANTOS, C. A. de M., Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Pneumus boldus Molina*) comercializadas em Curitiba, PR. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 1 – 4, 2001.

BARIN, J. S., **Determinação de metais e não metais em produtos farmacêuticos após decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por micro-ondas**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

BARNES, R. M.; SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. Introduction to sample preparation for trace element determination. In: Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis. **Elsevier: Amsterdam**, p. 1 – 58, 2014.

BAUNTHIYAL, M., RANGHAR. S., Accumulation of Fluoride by Plants: Potential for Phytoremediation. **Clean Soil Air Water**, v. 43, n. 1, p. 127 – 132, 2013.

BAYSAL, A., AKMAN, S., A practical method for the determination of sulphur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry, **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2662 – 2665, 2011.

BENKHEDDA, K., ROBICHAUD, A., TURCOTTE, S., BÉRALDIN, F. J., Determination of total iodine in food samples using inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of AOAC International** v. 92, n. 6, 2009.

BIZZI, C. A., FLORES, E. M. M., PICOLOTO, R. S., BARIN, J. S., NÓBREGA, J. A., Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods**, v. 2, n. 6, p. 734 – 738, 2010

BRAIBANTE, M. E. F., SILVA, D., BRAIBANTE, H. T. S., PAIZANATO, M. S., A Química dos Chás. **Química Nova na Escola**, v. 0, n. 0, p. 1 – 8, 2014.

CAO, J., et al. Dental and early-stage skeletal fluorosis in children induced by fluoride in brick-tea. **Fluoride**, v. 38, n. 1, p. 44 – 47, 2005.

CERQUEIRA, T.M.G., DE CARVALHO CORREIA, A.C., DOS SANTOS, R.V., LEMOS, R.P.L., DA SILVA, S.A.S., BARRETO, E. The Use of Medicinal Plants in Maceió, Northeastern Brazil: An Ethnobotanical Survey. **Medicines**, n. 7, p. 7, 2020.

CHEN, W., HE, Z. L., YANG, X. E., MISHRA, S., STOFFELLA, P. J., Chlorine nutrition of higher plants: progress and perspectives. **Journal of Plant Nutrition**, v. 33, n. 7, p. 943 – 952, 2010.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., PIERINA, S. B., **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da Unicamp, 2006, p. 110 – 114

COSTA, P.P.; SILVA, D.C. Uma xícara (chá) de química. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, p. 27-36, 2011.

COSTA, V. C. **Desenvolvimento de métodos para a determinação de As, Cd, Cl, Cr, F, Ni e Pb em cosméticos usados para maquiagem**. 2017. Tese

(Doutorado em Química) - Centro de Ciência Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

COSTA, V. C., BABOS, D. V., GAMELA, R. R., AMORIM, F. A. C., PEREIRA-FILHO, E. R., Proposition of sample preparation procedure of cassava flour with diluted acid using mixture design and evaluation of nutrient profiles by multivariate data analysis. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 145 – 154, 2020.

DESIDERI, D., MELI, M. A., ROSELLI, C., Determination of essential and non-essential elements in some medicinal plants by polarised X ray fluorescence spectrometer (EDXRF). **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 174 – 180, 2010.

DUO Z., XIAOQIONG X., XIAOLING W., YULI L., BING L., YINING C., XIANGYU L., JUNCHUN S., LEHAN X., SHAOYOU L., Monitoring fluorine levels in tea leaves from major producing areas in China and the relative health risk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 118, p. 105205, 2023.

Farmacopeia dos Estados Unidos (USP). <561> Articles of Botanical Origin, Chemical Tests, p. 11, 2015. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/DS/2015-dsc-chapters-561-616-1010-1092.pdf](https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/DS/2015-dsc-chapters-561-616-1010-1092.pdf) Acessado em: 13 jul. 2023

LIANG, F., HUALING, X., JIANHUA, H. et al. Determination of the Non-metallic Elements in Herbal Tea by Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry. **Biological Trace Element Research** v. 199, p. 769–778, 2021.

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**, v. 62, p. 1051 – 1064, 2007.

FLORES, E. M. M., BARIN, J. S., PANIZ, J. N. G., MEDEIROS, J. A. M., KNAPP, G., Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 3525 – 3529, 2004.

FLORES, É. M. M., Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination, **Elsevier, Amsterdam**, p. 77 – 172, 2014.

FLORES, E. M. M.; MELLO, P. A.; KRZYZANIAK, S. R.; CAUDURO, V. H.; PICOLOTO, R. S. Challenges and trends for halogen determination by inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, p. e8727, 2020.

HETZEL, B. S. Iodine deficiency disorders (IDD) and their eradication. **The Lancet**, v. 322, n. 8359, p. 1126 – 1129, 1983.

HEWLINGS, S., KALMAN, D., Sulfur in Human Health. **EC Nutrition**, v. 14, n. 9, p. 785 – 791, 2019.

HIGDON JV, FREI B. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. **Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89-143, 2003.

HOLME, J. A., SODERLUND, E. J., BRUNODORG, G., LAG, M., NELSON, S.D., DYBING, E., DNA damage and cell death induced by 1,2-dibromo-3- chloropropane (DBCP) and structural analogs in monolayer culture of rat hepatocytes: 3-aminobenzamide inhibits the toxicity of DBCP. **Cell Biology and Toxicology**, v. 7, p. 413 – 432, 1991.

HORWITZ, W., LATIMER, G. W., **Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists International**. 18.ed. USA: AOAC, 2005. 17 p.

HORWITZ, W., LATIMER, G. W., **Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists International**. 18.ed. USA: AOAC, 2005. 23 p.

HORWITZ, W., LATIMER, G. W., **Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists International**. 18.ed. USA: AOAC, 2005. 18 p.

Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2020.

Disponível em:

http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaio. Acessado em: 29 ago. 2023.

Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. National Academies Press (US); 1997. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK109832/> . Acessado em: 20 fev. 2023

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc external link disclaimer. Washington, DC: National Academy Press, 2001, p. 258.

JAYARAJ, R., MEGHA, P., SREEDEV, P., Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, n. 3 – 4, p. 90 – 100, 2017.

JERŠE, A., JAČIMOVIĆ, R., MARŠIĆ, N. K., GERM, M., ŠIRCELJ, H., STIBILJ, V., Determination of iodine in plants by ICP-MS after alkaline microwave extraction. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 355 – 362, 2018.

JUNSEOK L., JINSUNG A., HYE-ON Y., Determination of fluorine contents in plant samples by means of facilitated extraction with enzyme, **Talanta**, v. 132, p. 648 – 652, 2015.

KIFERLE et. al. Evidences for a Nutritional Role of Iodine in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 616868, p. 1 – 18, 2021.

KNAPP, G., MAICHIN, B., FECHER, P., HASSE, S., SCHRAMEL, P., Iodine determination in biological materials options for sample preparation and final determination. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 362, p. 508 – 513, 1998.

KRUG, F. J., ROCHA, F. R. P., **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**, EditSBQ, 2019, p. 43 – 73.

KRUG, F. J., ROCHA, F. R. P., **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**, EditSBQ, 2019, p. 373 – 438.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P., **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. Piracicaba: EditSBQ, p. 3-16, 2019.

LANCHEROS, Y. A. P. Caracterización General de Suelos Afectados por Bromometano. **Boletín Semillas Ambientales**, 2011.

LEUTESK, T., MARTIN, M. N., BICK, J.A., DAVIES, J. P., Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, n. 65, p. 141 – 146, 2000.

LIMA, J. D., MAZZAFERA, P., MORAES, W. da S., e SILVA, R. B. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 39 n. 4, p. 1258–1266, 2009.

MATUSIEWICZ, H., Wet digestion methods. In: MESTER, Z., STURGEON, R., Sample preparation for trace elements analysis, vol XLI. **Elsevier, Amsterdam**, p. 193–233, 2003.

MAHBOUBI, M. KAZEMPOUR, N. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) Essential oil. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 36, n. 1, p. 83-87, 2014.

MARIANO, X. M., SOUZA, W. F. M., ROCHA, C. B., et al. Bioactive volatile fraction of Chilean boldo (*Peumus boldus* Molina) – an overview, **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, v. 6, p. 474 - 486, 2019.

MELLO, P. A., PEREIRA, J. S. F., MESKO, M. F., et al. Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil—A review, **Analytica Chimica Acta**, v. 746, p. 15 – 36, 2012.

MELLO, P. A., BARIN, J. S., DUARTE, F. A., BIZZI, C. A., DIEHL, L. O., MULLER, E. I., FLORES, E. M. M., Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7615 – 7642, 2013.

MESKO, M. F. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímico e alimentos após combustão iniciada por microondas**. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MESKO, M. F., BALBINOT, F. P., SCAGLIONI, P. T., NASCIMENTO, M. S., PICOLOTO, R. S., COSTA, V. C., Determination of halogens and sulfur in honey: a green analytical method using single analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, 6475 – 6484, 2020a.

MESKO, M. F., TORALLES, I. G., COELHO JUNIOR, G. S., RONDAN, F. S., COSTA, V. C., HARTWIG, C. A., SCAGLIONI, P. T., Ion chromatography coupled to mass spectrometry as a powerful technique for halogens and sulfur determination in egg powder and its fractions. **Rapid Commun Mass Spectrometry**, v. 34, n. S3, 2020b.

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 and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 19, p. 4873–4881, 2019.

MORROW, C.M., MINEAR, R.A., Determination of bromide in natural waters by ion chromatography using a concentrator column. **Water Research**, v. 18, n. 9, p.1165-1168, 1984.

MOURA, A. V., SILVA, J. D. S., GUBERT, P., Ion Chromatography: principles and instrumentation. **The Electronic Journal of Chemistry**, v. 14, n. 2, 110 – 115, 2021.

NAKASHIMA, S., STURGEON, R. E., WILLIE, S. N., BERMAN, S. S., Acid digestion of marine samples for trace element analysis using microwave heating. **Analyst**, v. 113, 159 – 153, 1988.

NAMITA, P., MUKESH, R., e VIJAY, K. J. Camellia Sinensis (Green Tea): A Review. **Global Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 52-59, 2012.

NASCIMENTO, M. S., MENDES, A. L. G., HENN, A. S., PICOLOTO, R. S., MELLO, P. A., FLORES, E. M. M., Accurate determination of bromine and iodine in medicinal plants by inductively coupled plasma-mass spectrometry after microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 138, p. 58 – 63, 2017.

NÓBREGA, J. A., TREVIZAN, L. C., ARAÚJO, G. C. L., NOGUEIRA, A. R. A., Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. **Spectrochimica Acta, part: B**, v. 57, p. 1855 – 1876, 2002.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. *FAO Global tea consumption and production driven by robust demand in China and India*. Disponível em: <https://www.fao.org/news/story/en/item/1136255/icode/>. Acesso em: 01 fev. 2023.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. Dietary Reference Intakes: The

Essential Guide to Nutrient Requirements. **Washington: National Academies Press**, p. 400, 2006.

OZBEK, N., AKMAN, S., Determination of fluorine in Turkish wines by molecular absorbance of CaF using a high resolution continuum source atomic absorption spectrometer, **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 112 – 116, 2015.

PAN, S. Y., NIE, Q., TAI, H. C. et al. Tea and tea drinking: China's outstanding contributions to the mankind. **Chinese Medicine** v. 17, n. 27, 2022.

PARCELL, S., Sulfur in human nutrition and applications in medicine. **National Library of Medicine**, v. 7, n. 1, p. 22 – 24, 2002.

PAVELKA, S., Metabolism of bromide and its interference with the metabolism of iodine. **Physiological Research**, v. 53, n. 1, p. S81 – S90, 2004.

PICCIRILLO, V. J., PICCIRILLO, A. L., Methyl Bromide. **Haye's Handbook of Pesticide Toxicology**, p. 2267 – 2279, 2010.

PETRISOR, G., MOTELICA, L., CRACIUN, L. N., et al. Melissa officinalis: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3591, 2022.

RONDAN, F. S., HENN, A. S., MELLO, P. A., PEREZ, M., BULLOCK, L. A., PARNELL, J., FELDMANN, J., FLORES, E. M. M., MESKO, M. F., Determination of Se and Te in coal at ultra-trace level by ICP-MES after microwave-induced combustion. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 34, n. 5, p. 998 – 1004, 2019.

RUIZ, A. L. T. G., TAFFARELLO, D., SOUZA, V. H. S., et al. Farmacologia e Toxicologia de Peumus boldus e Baccharis genistelloides. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 295 – 300, 2008.

SADRAEI, H., GANNADI, A., MALEKSHAHI, K., Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. **Fitoterapia**, v. 74, p. 445 – 452, 2003.

SHAN, Z. et al. Theaflavin Chemistry and Its Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. vol. 2021, p. 1 – 16, 2021.

SINGH, A., HIDANGMAYUM, A., TIWARI, P., KUMAR, V., SINGH, B. N., DWIVEDI, P. Chapter 5 - How the soil nitrogen nutrient promotes plant growth—a critical assessment. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, **Elsevier**, p. 99-118, 2022.

SINGH, A., SINGH, J., Effects on Human Health due to Fluoride. **Green Technologies for the Fluoridation of Water**, p. 1 – 16, 2021.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2018.

SOLL, A. H., WALSH, J. H., Regulation of gastric acid secretion. **Annual Review of Physiology** , v. 41, p. 35 – 53, 1979.

SPEISKY, H., CASSELS, B. K., Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development, **Pharmacological Research**, v. 29, n. 1, p. 1 – 12, 1994.

TSAI, M-L., WU, C-T., et al., Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils of Two Mint Species. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research August**, v. 12, n. 4, p. 577 – 582, 2013.

TJABADI, E., MKETO, N., Recent developments for spectrometric, chromatographic and electroanalytical determination of the total sulphur and halogens in various matrices, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 207 – 222, 2019.

TURCK, D., et al., Dietary reference values for sodium. **European Food Safety Authority Journal**, v. 17, n. 9, p. e05778, 2019.

- VALENZUELA, A.B. El Consumo te y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 31, n. 2, p. 72 – 82, 2004.
- VARGA, Imre. Iodine determination in dietary supplement products by TXRF and ICP-AES spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 85, n. 1, p. 127 – 131, 2007.
- WANG, S., GAN, Z., WANG, B., ZHANG, N., LI, K., YAO, T., Effect of Brewing conditions on polyphenols in the dark tea (*Camellia sinensis* L.) infusions: content, composition and antioxidant activities. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 36322, p. 1 – 9, 2022.
- WEISBURGER, J. H., Tea and health: a historical perspective. **Cancer Letters** v. 114, p. 315 – 317, 1997.
- WHEAL, M. S., PALMER, L. T., Chloride analysis of botanical samples by ICP-OES, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.25, n. 12, p. 1946 – 1952, 2010.
- WINDER, C., The Toxicology of Chlorine. **Environmental Research: Section A**, v. 85, p. 105 – 114, 2001.
- HAO, W., KONG, JAYARAMAN, S. V., et al. Mentha arvensis and Mentha × piperita- Vital Herbs with Myriads of Pharmaceutical Benefits. **Horticulturae** v. 9, n. 2, p. 224, 2023.
- ZHANG, D., et al., Monitoring fluorine levels in tea leaves from major producing areas in China and the relative health risk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 118, p. 105205, 2023.
- ZHU, B., ZHIXIONG, Z., JING, Y., Ion chromatographic determination of trace iodate, chlorite, chlorate, bromide, bromate and nitrite in drinking water using suppressed conductivity detection and visible detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, n. 1, p. 106-110, 2006.