

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 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS  
PARA A DETERMINAÇÃO DE Br E I EM CAMARÃO POR ICP-MS**

Carla de Andrade Hartwig

PELOTAS, RS

2011

Carla de Andrade Hartwig

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS  
PARA A DETERMINAÇÃO DE Br E I EM CAMARÃO POR ICP-MS**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Foster Mesko

PELOTAS, RS

2011

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a determinação de Br e I em camarão por ICP-MS”, de autoria de Carla de Andrade Hartwig.

**Banca examinadora:**



Prof. Dra. Márcia Foster Mesko (Orientadora)



Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte - FURG



Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin – UFSM

Dedico este trabalho aos meus pais Albino e Eva Maria, pelo carinho dedicado, e por serem os meus exemplos de trabalho, honestidade e amor. A minha irmã Liliana e meu cunhado Renato, por toda a amizade, carinho e apoio. Ao meu namorado José Carlos pelo inigualável incentivo, amor e compreensão.

**"As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam."**

**(Bernard Shaw)**

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, pela possibilidade da execução deste trabalho.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Márcia Foster Mesko**, pela incansável orientação e incentivo, pela amizade construída, e por acreditar que seria possível.

Ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte**, pelas contribuições para este trabalho, e pela participação como banca examinadora.

Ao Prof. Dr. **Juliano Smanioto Barin**, pela participação como banca examinadora, e pelas sugestões para este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, coordenador do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais da UFSM, pela oportunidade de realização de meus experimentos, e pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Aos integrantes do LAQIA (UFSM), em especial a **Aline Lima Hermes Müller**, por todo o apoio recebido na realização de minhas análises.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, **Lizângela R. Ferreira, Luciana A. Santos, Marcelo G. Crizel, Isis G. Toralles, Renata A. Balaguez, Vanize C. Costa, Glauco R. Betemps, Natanael Rodrigo X. Pires, Vanda A. Pereira e Juliana V. Maciel**, por toda a ajuda e apoio, e pelos momentos de descontração.

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Departamento de Veterinária Preventiva, pelas liberações de horário para estudo, e aos meus colegas e amigos do laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária, **Sílvia Regina L. Ladeira, Renata C. Schramm, Beatriz M. Silva, Luís Filipe D. Schuch e João Luiz Zani**, por todo o apoio e amizade recebido.

Aos colegas de mestrado, em especial à **Lara M. P. Montenegro**, pelos dias de estudos, onde construímos conhecimento e amizade.

A **Daiane M. Xavier**, pela amizade, apoio e incentivo.

A **Djanira**, secretária do PPGQ, pelo sempre dedicado auxílio.

Agradeço ainda à minha família por todo o apoio, incentivo e carinho, e a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram e apoiaram até esta conquista.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Bromo e iodo .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Camarão: aspectos gerais .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Preparo de amostras .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1 Preparo de amostras para a determinação de Br e I.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2 Extração alcalina .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.3 Frasco de combustão de Schöniger .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.4 Bomba de combustão .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.5 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC) .....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Determinação de Br e I por espectrometria de massa com plasma         indutivamente acoplado (ICP-MS) .....</b>	<b>37</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Instrumentação .....</b>	<b>41</b>

3.2	Reagentes .....	43
3.3	Materiais diversos .....	44
3.4	Amostras .....	44
3.5	Determinação de umidade, peso médio e relação massa corpórea/casca, nas amostras de camarão .....	47
3.6	Procedimento de decomposição por MIC .....	48
3.7	Extração alcalina com aquecimento em banho-maria .....	49
3.8	Procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado .....	49
3.9	Determinação dos analitos por ICP-MS .....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.1	Determinação de umidade, peso médio e relação massa corpórea/casca, nas amostras de camarão .....	53
4.2	Procedimento por MIC para a decomposição das amostras e subsequente determinação de bromo e iodo por ICP-MS .....	55
4.3	Procedimento de extração alcalina com aquecimento em banho-maria .....	64
4.4	Procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas .....	70
4.5	Comparação entre os diferentes procedimentos de preparo de amostras avaliados .....	72
4.6	Branco analítico e limites de detecção .....	75
4.7	Estimativa da distribuição de Br e I em camarão .....	77
5	CONCLUSÃO .....	80
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Parâmetros operacionais para a determinação de Br e I por ICP-MS.....	<b>51</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Teor de umidade em amostras de camarão com e sem casca (n=3). .....	<b>54</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Determinação de Br e I em material de referência certificado (NIST RM 8414), por ICP-MS, após decomposição por MIC, utilizando NH <sub>4</sub> OH, 50 e 100 mmol l <sup>-1</sup> , como solução absorvedora (n=3). .....	<b>60</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Determinação de Br e I em amostras de camarão com e sem casca, por ICP-MS, após decomposição por MIC (n=3). .....	<b>61</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Determinação de Br e I em amostras de casca de camarão e casca e camarão com celulose, por ICP-MS, após decomposição por MIC .....	<b>62</b>
<b>Tabela 6 -</b>	Determinação de Br e I por ICP-MS, após extração alcalina em diferentes temperaturas, utilizando 1 g de camarão com casca (n=3). .....	<b>66</b>
<b>Tabela 7 -</b>	Determinação de Br e I em amostras de camarão com e sem casca, e em casca de camarão, por ICP-MS, após extração alcalina assistida por micro-ondas (n=3). .....	<b>71</b>
<b>Tabela 8 -</b>	Comparativo entre os diferentes procedimentos de preparo de amostras. ....	<b>73</b>
<b>Tabela 9 -</b>	Limites de detecção obtidos por ICP-MS após os diferentes preparos de amostras .....	<b>76</b>
<b>Tabela 10 -</b>	Concentrações de Br e I nas amostras de camarão com e sem casca, determinadas por ICP-MS após decomposição por MIC, considerando o teor de umidade (n=3). .....	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Frasco de combustão de Schöniger (adaptado de Flores <i>et al.</i> , 2007) .....	<b>30</b>
<b>Figura 2 -</b>	Esquema de uma bomba de combustão (adaptado de Flores <i>et al.</i> , 2007) .....	<b>31</b>
<b>Figura 3 -</b>	Frasco de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas .....	<b>34</b>
<b>Figura 4 -</b>	Suportes de quartzo utilizados no procedimento de decomposição por MIC, adaptado de Mesko, 2004 (a) e Mesko, 2008 (b) .....	<b>36</b>
<b>Figura 5 -</b>	Forno de micro-ondas comercial <i>Multiwave 3000</i> <sup>®</sup> (a), rotor equipado com 8 frascos de quartzo (b) e rotor equipado com 16 frascos de PTFE (c) .....	<b>41</b>
<b>Figura 6 -</b>	Suporte contendo apenas papel-filtro (a), e suporte contendo papel-filtro e comprimido de amostra (b) .....	<b>42</b>
<b>Figura 7 -</b>	Amostras de camarão com casca (a) e camarão sem casca (b), obtidas no comércio local .....	<b>45</b>
<b>Figura 8 -</b>	Amostras de camarão com casca (a), camarão sem casca (b) e resíduos de casca e cabeça de camarão (c), secas em estufa e moídas em processador doméstico .....	<b>46</b>
<b>Figura 9 -</b>	Amostras de camarão com casca (a) e camarão sem casca (b) trituradas em moinho convencional .....	<b>46</b>
<b>Figura 10 -</b>	Comprimidos preparados com: camarão sem casca (a), camarão com casca (b) e resíduos de casca e cabeça de camarão (c) .....	<b>47</b>
<b>Figura 11 -</b>	Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo das amostras de camarão com e sem casca e de resíduos de casca e cabeça de camarão para posterior determinação de bromo e iodo, por ICP-MS .....	<b>50</b>
<b>Figura 12 -</b>	Camarões comercializados como “miúdos” (a) e “graúdos” (b).....	<b>53</b>

<b>Figura 13 -</b>	Relação massa corpórea/casca de camarões comercializados como “miúdos” (a) e “graúdos” (b) .....	<b>54</b>
<b>Figura 14 -</b>	Cápsula de policarbonato contendo a amostra (a) e cápsula disposta no suporte (b) .....	<b>56</b>
<b>Figura 15 -</b>	Influência da solução absorvedora para a determinação de Br e I em camarão sem casca (a) e camarão com casca (b) usando o procedimento por MIC com 5 min de refluxo e determinação por ICP-MS (massa de amostra = 500 mg, n=3) .....	<b>58</b>
<b>Figura 16 -</b>	Comprimidos de resíduos (casca e cabeça) de camarão sem adição de celulose (a) e com adição de celulose (b) .....	<b>62</b>
<b>Figura 17 -</b>	Suporte contendo resíduo após a combustão de comprimido com somente casca de camarão (a) e de comprimido preparado com casca de camarão e celulose (b) .....	<b>63</b>
<b>Figura 18 -</b>	Soluções obtidas após decomposição por MIC utilizando $\text{NH}_4\text{OH}$ 50 $\text{mmol l}^{-1}$ como solução absorvedora: camarão com casca (a), camarão sem casca (b), casca de camarão (c) e casca de camarão com parcela de celulose (d) .....	<b>64</b>
<b>Figura 19 -</b>	Soluções obtidas após extração alcalina com aquecimento em banho-maria a 60 °C, utilizando como solução extratora TMAH 25%. Condições para a proporção 1 g de amostra e 1 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (a), camarão com casca por 1 h (b), camarão com casca por 2 h (c), camarão sem casca por 30 min (d), camarão sem casca por 1 h (e), e camarão sem casca por 2 h (f). Condições para a proporção 1 g de amostra e 0,5 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (g), camarão com casca por 1 h (h), camarão com casca por 2 h (i), camarão sem casca por 30 min (j), camarão sem casca por 1 h (l), e camarão sem casca por 2 h (m) .....	<b>68</b>

- Figura 20 -** Soluções obtidas após extração alcalina com aquecimento em banho-maria a 90 °C, utilizando como solução extratora TMAH 25%. Condições para a proporção 1 g de amostra e 1 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (a), camarão com casca por 1 h (b), camarão com casca por 2 h (c), camarão sem casca por 30 min (d), camarão sem casca por 1 h (e), e camarão sem casca por 2 h (f). Condições para a proporção 1 g de amostra e 0,5 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (g), camarão com casca por 1 h (h), camarão com casca por 2 h (i), camarão sem casca por 30 min (j), camarão sem casca por 1 h (l), e camarão sem casca por 2 h (m) ..... **69**
- Figura 21 -** Soluções obtidas após extração alcalina assistida por radiação micro-ondas, utilizando as soluções extradoras de  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol l}^{-1}$ : camarão com casca (a) e camarão sem casca (b); e solução extratora de TMAH 0,11  $\text{mol l}^{-1}$ : camarão com casca (c) e camarão sem casca (d) ..... **70**

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AAS – espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*
- CE-ICP-MS – eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *capillary electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry*
- CRM – material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
- CSV – voltametria de redissolução catódica, do inglês *Cathodic stripping voltammetry*
- EDXRF – fluorescência de raios X por dispersão em energia, do inglês *energy dispersive X-ray fluorescence*
- GF AAS – espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*
- IC – cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*
- ICP-MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*
- ICP OES – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
- IDD – distúrbio de deficiência de iodo, do inglês *iodine deficiency disorders*
- ISE – eletrodo de íon seletivo, do inglês *ion-selective electrode*
- LODs – limite de detecção, do inglês *limit of detection*
- MIC – combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave induced combustion*
- MS – Ministério da Saúde
- NAA – análise por ativação neutrônica, do inglês *neutron activation analysis*
- NIST – *National Institute of Standards and Technology*
- PTFE – politetrafluoretileno
- RCC – teor de carbono residual, do inglês *residual carbon content*
- RSD – desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

TMAH – hidróxido de tetrametilamônio, do inglês *tetramethyl ammonium hydroxide*

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

## RESUMO

Título: Avaliação de diferentes procedimentos de preparo de amostras para a determinação de Br e I em camarão por ICP-MS

Autor: Carla de Andrade Hartwig

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Foster Mesko

Amostras de camarão foram submetidas a diferentes procedimentos de preparo de amostras para a subsequente determinação de Br e I por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Extração alcalina com aquecimento em banho-maria, ou assistida por radiação micro-ondas, bem como a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), com diferentes tipos e concentrações de soluções extratoras e absorvedoras, foram estudadas. Com relação aos procedimentos de preparo de amostras, as melhores recuperações dos analitos foram obtidas quando a MIC, com uma solução absorvedora de 50 mmol l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH, foi utilizada. A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação e decomposição de material de referência certificado (CRM, NIST RM 8414), onde se obteve recuperações dos analitos e concordância com os valores certificados, superiores a 99% para Br e I. Com o uso da MIC observou-se valores mais baixos para os brancos, assim como melhores limites de detecção (LOD) para ambos os analitos (Br = 0,12 µg g<sup>-1</sup> e I = 0,03 µg g<sup>-1</sup>). Desta forma, a MIC foi adequada para decompor amostras de camarão, com e sem casca, para a posterior determinação de Br e I por ICP-MS, e possibilitou observar que as concentrações mais elevadas de Br (182,43 ± 4,23 µg g<sup>-1</sup>) e I (11,31 ± 0,95 µg g<sup>-1</sup>) estão presentes nos camarões inteiros.

Palavras-chaves: preparo de amostra, halogênios, camarão.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado em Química

Pelotas, Novembro de 2011.

## ABSTRACT

Title: Evaluation of different sample preparation procedures for Br and I determination in shrimp by ICP-MS

Author: Carla de Andrade Hartwig

Supervisor: Dr. Márcia Foster Mesko

Samples of shrimp were digested by different sample preparation procedures for further Br and I determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Procedures as alkaline extraction with heating in a water bath, or assisted by microwave radiation, and microwave induced combustion (MIC) were evaluated. Different solutions and concentrations were studied as extraction medium or absorbing solution for the analites. Taking into account the sample preparation procedures evaluated, better recoveries for Br and I were obtained by MIC using 50 mmol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH as absorbing solution. Accuracy was evaluated for Br and I using certified reference material (CRM, NIST RM 8414) as well as using spike recoveries. Then, the recoveries and the agreement with the certified values were better than 99%, for both analites. It is important to point out that using MIC lowest values for the blanks were obtained and the limits of detection (LODs) were better, in comparison with the others procedures, for Br (0.12 µg g<sup>-1</sup>) and I (0.03 µg g<sup>-1</sup>). Therefore, MIC was suitable for shrimp digestion for subsequently Br and I determination by ICP-MS. In addition, with this procedure was possible to observe that Br (182.43 ± 4.23 µg g<sup>-1</sup>) and I (11.31 ± 0.95 µg g<sup>-1</sup>) concentration were higher in shrimp with shell.

Key-words: sample preparation, halogens, shrimp.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Master Dissertation in Chemistry  
Pelotas, November 2011.

## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A determinação de elementos traço em alimentos é de suma importância visto que a presença ou deficiência de alguns elementos pode ocasionar sérios problemas à saúde de quem os ingere. Halogênios, como o bromo e o iodo, devem ter sua concentração monitorada em alimentos, pois estando presentes nos mesmos, seja de forma natural, adicionados como suplementos, ou por ação humana (ROSE *et al.*, 2001; RÄDLINGER, HEUMANN, 1998; VANHOE *et al.*, 1993), podem provocar graves consequências no organismo humano, dependendo da concentração em que estejam presentes (VOBECKY, BABICKY, LENER, 1996; HETZEL, DUNN, 1989; WHO, 1996).

Por outro lado, o monitoramento das concentrações dos elementos traço nos alimentos também permite que seja mantida a dieta nutricional, visto que alguns destes elementos, que podem ser danosos ao organismo quando presentes em altas concentrações, também são elementos essenciais ao metabolismo humano. Um exemplo de elemento traço essencial à saúde é o iodo, cuja função no metabolismo humano encontra-se diretamente relacionada com os hormônios da tireóide (CRESSEY, 2003), mas que estando presente em excesso pode ocasionar doenças (HETZEL, DUNN, 1989).

A determinação de halogênios sempre foi considerada um desafio, principalmente devido à elevada volatilidade destes elementos e da possibilidade de contaminação (ANTES *et al.*, 2010). Sob este aspecto, diferentes procedimentos de preparo de amostras têm sido discutidos com o intuito de promover a solubilização da amostra, de modo a fornecer recuperações quantitativas dos halogênios, sendo compatível às técnicas de determinação (NÓBREGA *et al.*, 2006; POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998; FLORES *et al.*, 2004).

Em se tratando de formas de determinação dos halogênios, várias técnicas podem ser utilizadas, dependendo do tipo de amostra e nível de concentração do analito que se queira determinar (VARGA, 2007; KNAPP, 1998). Neste sentido, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) vêm sendo empregada na determinação de halogênios ao nível de traço devido às suas características de seletividade e baixos limites de detecção (SCHRAMMEL, HASSE, 1994; KNAPP *et al.*, 1998).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo a avaliação de diferentes procedimentos de preparo de amostras para a determinação de bromo e iodo, em amostras de camarão por ICP-MS. Estas amostras foram selecionadas devido à pouca informação sobre a concentração de bromo e iodo em camarões, e do interesse em se conhecer a distribuição destes elementos nas frações de casca, cabeça e massa corpórea destes organismos. Camarões criados em cativeiro na região de Pelotas/RS foram escolhidos como amostras para a determinação destes halogênios, por não se ter conhecimento deste tipo de estudo na região, sobretudo em camarões cultivados em água doce.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Esta revisão bibliográfica está dividida em quatro partes principais. Na primeira delas, são abordados alguns aspectos gerais sobre bromo e iodo, relacionados principalmente às suas funções no organismo humano e à necessidade de determinação das concentrações dos mesmos nos alimentos. Na segunda parte, são discutidos aspectos gerais sobre camarões, incluindo a contribuição nutricional destes crustáceos, e dados estatísticos sobre a produção nacional da espécie utilizada neste trabalho. Em uma terceira parte são descritos procedimentos de preparo de amostras empregados para a determinação de halogênios, sendo dada maior atenção àquelas utilizadas na execução deste trabalho. Na quarta e última parte, são abordados aspectos relacionados à determinação de bromo e iodo por ICP-MS.*

## 2.1 Bromo e iodo

Estudos realizados por Rose *et al.* (2001) descrevem a presença natural de halogênios nos alimentos, tendo em vista sua existência no ambiente, como por exemplo, na água do mar, solos e rochas, assim como acontece também com os metais e outros elementos.

O bromo e o iodo são exemplos de halogênios que podem estar presentes nos alimentos de forma natural ou resultantes de atividades humanas, sendo que o iodo pode também ser adicionado aos alimentos como suplemento (ROSE *et al.*, 2001; RÄDLINGER; HEUMANN, 1998; VANHOE *et al.*, 1993).

O bromo não possui função fisiológica clara no organismo humano, de forma que são desconhecidas recomendações para seu consumo na dieta humana (ROSE *et al.*, 2001). Entretanto, embora o mecanismo de ação deste elemento possa ainda ser considerado como desconhecido (ROMARÍS–HORTAS *et al.*, 2011), Vobecky *et al.* (1996) descreveu que o bromo pode interferir no transporte de iodo para a glândula tireóide, o que poderia inibir a função da mesma.

As consequências da deficiência de bromo no organismo humano ainda são incertas, mas problemas relacionados a retardo de crescimento e insônia são relatados. Este último fator é mais evidenciado em pacientes de hemodiálise, os quais têm uma significativa parcela deste elemento reduzida em seu sangue durante o tratamento. Contudo, a ingestão excessiva deste elemento pode causar dores de cabeça, broncoespasmos, distúrbios gastrointestinais, fadiga, tolerância reduzida a exercícios, entre outros (KOHLMEIER, 2003). Segundo Van Dokkum *et al.* (1989) doses diárias de 8 mg dia<sup>-1</sup> do elemento parecem ser adequadas a jovens adultos. Essa dose pode ser alcançada pela ingestão de grãos, nozes, sal do mar, mariscos e pães, tendo em vista que estes alimentos são conhecidamente fontes importantes de bromo (KOHLMEIER, 2003). Contudo, cabe destacar que estudos sobre determinação de bromo e sua importância no organismo humano ainda são escassos na literatura, diferentemente dos dados referentes ao iodo, cuja vasta literatura permite maiores discussões.

O iodo é considerado um dos elementos traço essenciais à saúde, presente em processos metabólicos de humanos e animais e, sendo assim, sua determinação em alimentos torna-se de grande importância (KNAPP *et al.*, 1998; VANHOE *et al.*, 1993; GÉLINAS; KRUSHEVSKA; BARNES, 1998; SCHRAMEL; HASSE, 1994).

No organismo humano o iodo participa da síntese dos hormônios da tireóide (tiroxina-T4 e tri-iodotironina-T3), bem como intermediários desses hormônios e seus produtos de degradação (moniodotirosina-MIT e diiodotirosina-DIT) (KNAPP *et al.*, 1998; CRESSEY, 2003). Assim, o papel do iodo na alimentação está diretamente ligado ao importante papel desempenhado pelos hormônios da tireóide no crescimento e desenvolvimento dos seres humanos e animais (WHO, 1996).

Os efeitos da deficiência de iodo no crescimento e desenvolvimento humano são denotados pelo termo distúrbios de deficiência de iodo (IDD). Estes efeitos são vistos em todas as fases de desenvolvimento e, particularmente em fetos, recém nascidos e crianças, ou seja, nos períodos de crescimento rápido (WHO, 1996). O mais conhecido efeito da deficiência de iodo é o bócio endêmico, evidenciado pelo aumento visível da glândula tireóide, na parte frontal do pescoço (ECKHOFF; MAAGE, 1997). Entretanto, o bócio é apenas uma das manifestações do amplo espectro dos distúrbios de deficiência de iodo, os quais incluem cretinismo endêmico, mortalidade infantil, infertilidade, aborto, retardo mental, problemas neuromusculares e nanismo (HETZEL; DUNN, 1989; WHO, 1996). Em oposição aos IDD, ingestões excessivas de iodo também evidenciam efeitos clínicos que incluem bócio endêmico e hipotireoidismo (WHO, 1996).

As necessidades diárias de iodo variam, em média, de 90 µg para crianças de 0 a 59 meses, a 150 µg para crianças a partir de 12 anos e adultos (WHO, 1996; ANVISA, 2011). Para Joseph *et al.* (1980) a ingestão segura de iodo, sem causar distúrbios por deficiência ou excesso deste elemento, deve ficar entre 100 e 200 µg dia<sup>-1</sup>.

Em alimentos e materiais biológicos, o iodo está geralmente presente como iodeto, forma química que pode ser eficientemente absorvida pelo trato gastrointestinal (KNAPP *et al.*, 1998). As mais importantes fontes naturais de iodo na dieta humana incluem leite, peixes marinhos e outros frutos do mar (ECKHOFF; MAAGE, 1997; JULSHAM; DAHL; ECKHOFF, 2001; HALDIMANN; ALT; BLANC; BLONDEAU, 2005), sendo que as fontes primárias naturais de iodo são os oceanos, podendo este elemento ser acumulado nos peixes, crustáceos e algas marinhas (MOREDA-PIÑEIRO; ROMARÍS-HORTAS; BERNEJO-BARRERA, 2011). Entretanto, o conteúdo de iodo nos alimentos é influenciado pela geoquímica do solo, e pelas condições culturais que modificam a absorção de iodo de cultivos

básicos e alimentos de origem animal. Ações como cozinhar, fritar ou grelhar podem reduzir bastante o teor natural de iodo de um alimento (WHO, 1996).

Em 1993, a iodação universal do sal, que já vinha sendo realizada em alguns países, como o Brasil, desde a década de 50, foi recomendada pela WHO e o Fundo das Nações Unidas para a criança (Unicef), como estratégia mais efetiva, de menor custo e de mais fácil implementação para alcançar a eliminação dos IDD's (ANVISA, 2011; HETZEL; DUNN, 1989, WHO, 1996). A recomendação é de que países com média de consumo diário de sal em torno de 10 g devem estabelecer uma faixa de iodação de 20 a 40  $\mu\text{g g}^{-1}$ , mas pode ser ajustada com base nos dados de ingestão de sal em cada país. Atualmente, o sal comercializado no Brasil deve possuir entre 20 e 60  $\text{mg kg}^{-1}$ , conforme estabelece a Resolução RDC nº 130, 26 de maio de 2003. Entretanto, segundo a Anvisa (2011) o brasileiro possui, em média, um consumo diário de 12 g de sal, somando o consumo domiciliar e o sal proveniente de alimentos processados. Assim, a ingestão diária de iodo do brasileiro pode chegar a 300  $\mu\text{g}$ , podendo vir a ocasionar doenças auto-imunes da tireóide (ANVISA, 2011). Desta forma, reconhecendo a importância de atender as recomendações de doses diárias permitidas de iodo, representantes do Ministério da Saúde, da Anvisa, do Ministério da Educação, da indústria salinera e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), propuseram recente consulta pública para revisão da norma atual que contempla a faixa de iodação do sal, com alteração da faixa atual de 20 e 60  $\mu\text{g g}^{-1}$  para 15 a 45  $\mu\text{g g}^{-1}$  (ANVISA, 2011).

Cabe destacar que, mesmo o sal de cozinha iodado sendo hoje a principal fonte de iodo adicional na nutrição humana, é necessário que se obtenham informações sobre a contribuição de iodo dos alimentos, a fim de que se possam fazer recomendações que venham a melhorar a dieta dos indivíduos. Rose *et al.* (2001) estudou a concentração de Br e I em alimentos que compunham a dieta nutricional em 20 cidades do Reino Unido. Foram determinadas neste estudo, as concentrações destes elementos em pães, produtos cárneos, peixes, ovos, vegetais, frutas, bebidas, produtos lácteos, entre outros. Outros trabalhos, presentes na literatura, também descrevem a determinação de iodo em alimentos, como por exemplo, em fígado bovino, amido de milho, farinha de trigo, leite em pó (MESKO *et al.*, 2010), suplementos alimentares (VARGA, 2007), sal (HALDIMANN; WEGMÜLLER; ZIMMERMANN, 2010), leite (NÓBREGA *et al.*, 1997; REID *et al.*,

2008), produtos lácteos (CRESSEY, 2003) ou peixes, cereais, verduras, legumes e chás (ECKHOFF; MAAGE, 1997).

## 2.2 Camarão: aspectos gerais

Segundo o Instituto Adolfo Lutz, o camarão pode ser classificado como Pescado. Essa denominação abrange todo animal que vive normalmente em água doce ou salgada, e que serve para alimentação humana. O pescado, geralmente, é designado pela espécie animal a que pertence ou pelo seu nome comum, como por exemplo, a sardinha, a tainha, o camarão, o siri, o polvo, a lula e o marisco (IAL, 2008).

Além de o pescado ser fonte natural de proteínas para o organismo, ele fornece outros nutrientes importantes para os seres humanos, como vitaminas, minerais e ácidos graxos essenciais. Os principais minerais encontrados nos pescados de origem marinha são o zinco, o fósforo, o ferro, o cálcio e o iodo. Ainda, os peixes são importantes fontes de vitaminas do complexo B (Cartilha Semana do Peixe, <http://www.anvisa.gov.br>).

Junto às lagostas e aos caranguejos, os camarões integram o grupo mais conhecido dentre as 38.000 espécies de crustáceos, que ocorrem nos ecossistemas terrestre e aquático. Conforme dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2003), a produção de camarão cultivado no Brasil vem crescendo em ritmo acelerado nos últimos vinte anos, devido ao desenvolvimento tecnológico presente em toda a cadeia produtiva.

Os camarões da espécie, *Litopenaeus vannamei*, são os mais cultivados no Brasil, respondendo por mais de 95% da produção nacional, tendo sido introduzido no país na década de oitenta. A causa dessa grande procura são a sua acelerada taxa de crescimento em altas densidades, conversões alimentares excelentes e, grande capacidade para se adaptar às diferentes condições climáticas (CASTRO; PAGANI, 2004).

Dados estatísticos da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2003) demonstram que a produção brasileira de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* cresceu entre os anos 1998 a 2005, e sua produtividade subiu, entre

esses anos, de 7 mil para 65 mil toneladas por ano. Esta elevada produção de camarões tem gerado grandes quantidades de resíduos sólidos, tendo em vista que cabeça e casca do animal correspondem a aproximadamente 40% do seu peso total, culminando num forte impacto ambiental (ASSIS; STAMFORD; STAMFORD, 2008). Este Resíduo, segundo os autores Gildberg e Stenberg (2001) é composto por cerca de 70 a 75% de água, enquanto que na massa corpórea do camarão, alguns autores têm relatado índices de umidade entre 78 e 88% (PEDROZA; COZZOLINO, 2001; SILVA *et al.*, 2010).

O resíduo da produção de camarões (casca e cabeça) contém cerca de 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteínas e 40 a 55% de carbonato de cálcio (ASSIS; STAMFORD; STAMFORD, 2008; MATHUR; NARANG, 1990). Assim, alternativas de reaproveitamento dos resíduos da produção de camarões têm sido estudadas com vistas ao desenvolvimento de produtos com valor agregado, aumentando a produtividade do setor e garantindo a preservação ambiental (ASSIS; STAMFORD; STAMFORD, 2008; MATHUR; NARANG, 1990). Normalmente, os resíduos são utilizados na produção de farinha de pescado, porém esse uso reduz a qualidade nutricional do produto (MOURA *et al.*, 2006).

Contudo, é importante salientar que, embora o consumo de camarões esteja aumentando significativamente, e que informações sobre as concentrações de Br e I nestes organismos sejam de grande relevância, não há na literatura dados sobre a concentração de Br e I em camarões, e sobre a forma de distribuição destes elementos neste tipo de crustáceos.

### **2.3 Preparo de amostras**

A etapa de preparo da amostra visando a determinação de metais e não-metais merece destaque dentro da sequência analítica uma vez que, trata-se da etapa mais demorada, de maior custo, e onde se cometem mais erros, os quais frequentemente limitam a exatidão que pode ser alcançada em uma análise (KRUG; NÓBREGA, 2010).

Em geral, a etapa de preparo da amostra consiste na conversão da mesma em uma forma adequada para que a espécie química de interesse possa ser determinada. Somente na mais simples das situações a amostra poderá ser

analisada sem qualquer tipo de pré-tratamento, que pode incluir ou não alguma forma de separação (KRUG; NÓBREGA, 2010).

A determinação de elementos em amostras de natureza orgânica, normalmente exige a transformação dos analitos, presentes na matriz orgânica, em uma forma inorgânica simples. Geralmente, a amostra original não é adequada para análise direta devido a alguns fatores, como por exemplo, a cor da amostra interferir na determinação, o analito não se encontrar no estado dissolvido, a heterogeneidade dos materiais biológicos, entre outros (MAGALHÃES *et al.*, 2010). Todavia, de maneira geral não existe um procedimento de preparo de amostras único que possa ser utilizado para diferentes tipos de matrizes. A escolha do procedimento está relacionada com o tipo de analito, bem como com a técnica de determinação a ser utilizada.

### **2.3.1 Preparo de amostras para a posterior determinação de Br e I**

O preparo de amostras para a determinação de halogênios sempre foi considerado um desafio, principalmente devido à elevada volatilidade destes elementos e da possibilidade de contaminação proveniente dos reagentes utilizados. Quando a decomposição da amostra é feita com ácidos minerais, procedimento mais comumente empregado, estes elementos formam compostos voláteis, podendo levar a perdas dos analitos (ANTES *et al.*, 2010). Além disso, segundo Flores *et al.* (2004) a utilização de ácidos minerais concentrados para a decomposição de amostras pode aumentar o valor da prova em branco devido a presença de elementos presentes como contaminantes. Um outro fator limitante ao uso de ácidos na etapa de decomposição das amostras é que a presença destes em altas concentrações pode não ser suportada por algumas técnicas de análise, sendo necessária uma etapa de diluição, a fim de reduzir a concentração ácida do meio (FLORES *et al.*, 2004).

Dentre os halogênios, um exemplo conhecido da necessidade de cuidados especiais na etapa de decomposição da amostra é o iodo. Devido a sua alta volatilidade, o iodo tem que ser transformado em uma forma química não-volátil (iodeto -  $I^-$ , ou iodato -  $IO_3^-$ ) para evitar perdas durante a etapa de digestão. Métodos de digestão usando ácidos concentrados não são amplamente aplicáveis nas

decomposições de amostras para a determinação de iodo, devido as possíveis perdas deste elemento como HI ou I<sub>2</sub>, resultando em recuperação não quantitativa. Entretanto, boas recuperações foram relatadas com o uso de mistura de HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub> em procedimento assistido por micro-ondas (KNAPP *et al.*, 1998).

A imensa maioria dos procedimentos de preparo de amostras ainda baseia-se no uso de ácidos concentrados para a promoção de ataques agressivos à amostra, especialmente sob altas temperaturas e pressões. Entretanto, o uso de reagentes fortemente alcalinos na preparação de amostras tem sido recomendado para promover a digestão e extração de diversos analitos em amostras variadas (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Segundo Nóbrega *et al.* (2006) os meios alcalinos oferecem uma boa alternativa para a preparação das amostras envolvendo um grupo apreciável de analitos em diferentes matrizes, seja por meio de procedimentos de preparo que envolvam digestões, extrações, ou dissoluções prévias às determinações usando técnicas espectroanalíticas. Os meios alcalinos mais estudados na área do preparo de amostras compreendem a utilização de soluções de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), aminas terciárias solúveis em água (CFA-C), e bases fortes.

Outra alternativa para a decomposição de amostras visando a determinação de halogênios são os procedimentos que se baseiam na combustão das amostras, os quais permitem a conversão de carbono e hidrogênio em seus respectivos produtos de oxidação. A elevada temperatura atingida nestes processos possibilita a decomposição de praticamente todas as matrizes orgânicas, minimizando assim os problemas de interferências durante as subseqüentes determinações dos analitos (BARIN; FLORES; KNAPP, 2006; FLORES *et al.*, 2007).

Os procedimentos de combustão podem ser classificados em sistema aberto, fechado ou dinâmico (KNAPP, 1991), sendo que nos preparos de amostra para a determinação de não-metals, bem como na decomposição de alguns materiais, os métodos de combustão em recipientes fechados como a bomba de combustão, o frasco de Schöniger ou a combustão iniciada por micro-ondas são mais apropriados, possibilitando a obtenção de teores de carbono residual (RCCs) mais baixos em um tempo relativamente curto (FLORES *et al.*, 2007).

Assim, tendo em vista a ampla utilização dos procedimentos de extração alcalina e das técnicas de combustão no preparo de amostras, será apresentada uma revisão mais detalhada nos itens a seguir.

### 2.3.2 Extração alcalina

Como já foi discutido no item anterior (2.3 - *Revisão Bibliográfica*), o uso de soluções alcalinas no preparo de amostras para a determinação de halogênios se justifica por se tratar de uma alternativa às decomposições ácidas capaz de promover recuperações quantitativas, sobretudo nos casos de determinações de elementos voláteis.

Um dos reagentes amplamente utilizados nos procedimentos de extração alcalina é o hidróxido de tetrametilamônio, que apresenta-se como um líquido incolor com forte odor de amina, totalmente solúvel em água, e comercializado na forma de solução com pH fortemente alcalino (13,4 a 14,7), sendo disponível nas concentrações de 25% (m/v) em água ou metanol, e 10% (m/v) em água. Este reagente pode apresentar possibilidade de contaminação, acarretando em altos níveis de branco e dificultando as análises de ultra-traços (NÓBREGA *et al.*, 2006). Entretanto, existe a possibilidade da utilização de TMAH ultra-puro, que embora apresente custo mais elevado, pode ser uma alternativa, tendo em vista que a purificação deste reagente é difícil de ser executada (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1998).

Pozebon, Dressler e Curtius (1998) descrevem que a solubilização de materiais biológicos contendo gorduras pode ser realizada com solução de TMAH previamente à determinação de diferentes analitos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS). Estes autores recomendaram a digestão de materiais biológicos com TMAH para a determinação de elementos voláteis, tais como I, Br, As, Cd e Sb, por ICP-MS.

A utilização de TMAH é uma alternativa à digestão ácida, particularmente quando o analito está presente em baixos níveis de concentração ou quando o ácido

não é compatível com os elementos a serem determinados, como por exemplo o que ocorre entre o ácido nítrico e os elementos Sn e Sb, que não são solúveis neste meio (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998).

Nóbrega *et al.* (1998) argumenta que, além de o meio alcalino oferecer uma alternativa vantajosa para o preparo de amostras biológicas, com satisfatória precisão, também é evidente que seu uso pode melhorar o desempenho de técnicas como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Isto foi comprovado por Pozebon, Dressler e Curtius (1998), quando descreveram efeitos de memória inferiores, e menos interferências poliatômicas nas determinações de Cu e I em amostras de tecido biológico por ICP-MS, utilizando TMAH em lugar de ácido nítrico na etapa de preparo de amostra. Todavia, há de se mencionar que após o preparo de amostras orgânicas com TMAH o resíduo apresenta uma alta concentração de compostos orgânicos, o que pode causar erros sistemáticos nas determinações por ICP OES e ICP-MS (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Estratégias alternativas, envolvendo a utilização de meio alcalino em combinação com procedimentos de extração ou digestão assistidos por micro-ondas vem sendo usadas com sucesso. Esta abordagem pode promover a decomposição de materiais que contenham óxidos sem que o tempo de digestão total da amostra seja aumentado (NÓBREGA *et al.*, 2006).

A eficiência de extrações assistidas por micro-ondas utilizando um reagente alcalino pode ser caracterizada por vários aspectos, dentre eles o alcance de altas temperaturas, mesmo em baixas pressões, ainda que o ponto de ebulição seja dependente da base utilizada. Contudo, um precipitado pode ser observado com o resfriamento da amostra, após completar o processo de extração (NÓBREGA *et al.*, 2006).

As principais vantagens da utilização de um meio alcalino durante os procedimentos de extração, segundo Nóbrega *et al.* (2006) estão relacionados à não modificação do estado de oxidação do analito, à possibilidade de utilização para vários elementos e compostos, ao fornecimento de um método de preparo de amostras relativamente simples, e à possibilidade da aplicação de radiação micro-ondas.

Nóbrega *et al.* (2006) descreve ainda que os procedimentos de extração ou digestão alcalina podem ser adequadamente empregados em processos adaptados

para a determinação de um grande número de analitos em uma ampla variedade de amostras.

Martins *et al.* (2002) determinou elementos-traço em materiais biológicos após extração com TMAH em banho-maria. Os autores descrevem como vantagens do procedimento a simplicidade e relativa rapidez do processo, que exigiu apenas pequenas quantidades de reagentes e vidrarias. Extração semelhante, utilizando TMAH e sem o emprego de radiação micro-ondas, foi proposta por Rädlinger e Heumann (1998).

Segundo Wu, Feng e Wittmeier (1997), para evitar a contaminação e aumentar a taxa de recuperação dos analitos, é recomendado que a digestão das amostras sempre ocorra em recipientes fechados. Além disso, estes mesmos autores recomendam que o aquecimento seja assistido por radiação micro-ondas.

As extrações utilizando radiação micro-ondas são reconhecidas como formas eficientes e adequadas para a extração de componentes de diversas matrizes (MESKO *et al.*, 2011). A utilização de radiação micro-ondas em um processo de extração alcalina foi descrito por Chen, Wang e Jiang (2007), quando trataram espécies de folha de tomate e algas com solução de TMAH, sob aquecimento por radiação micro-ondas a 90 °C. Estes autores consideraram o procedimento de extração rápido, fácil e adequado para a determinação de Br e I, pois a eficiência de extração foi superior a 83%, para ambos os elementos, determinados por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (CE-ICP-MS).

Além disso, soluções de amônia também tem sido utilizadas. Vanhoe *et al.* (1993) utilizou esta solução alcalina em um procedimento de extração assistida por micro-ondas em amostras de leite em pó e soro humano, para subsequente determinação da concentração de iodo por ICP-MS. Os autores verificaram que a utilização desta solução alcalina foi satisfatória à determinação do analito, cuja recuperação seria comprometida mediante uso de solução ácida. Além disso, com o uso da solução alcalina, foram minimizados os problemas relativos a efeitos de memória na determinação por ICP-MS.

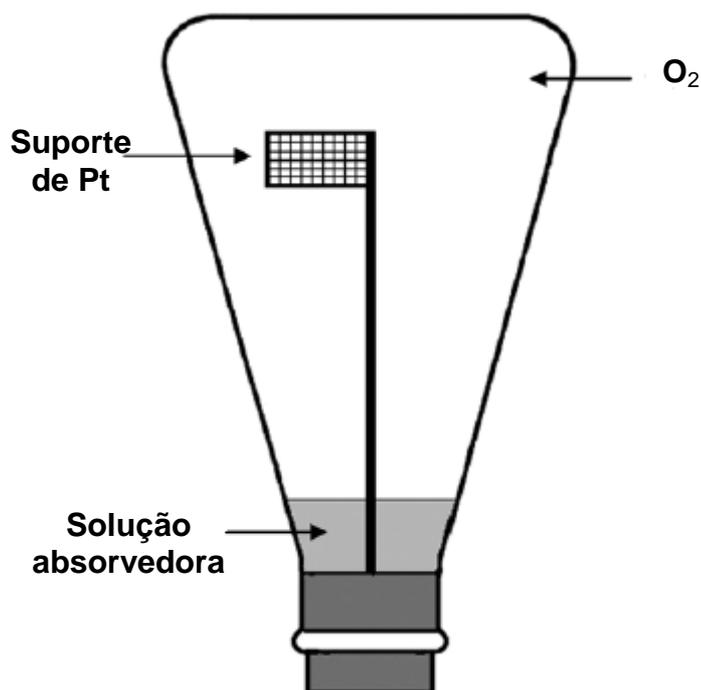
Os procedimentos de preparo de amostras baseados na extração alcalina podem ser realizados em sistemas abertos ou fechados, e empregar aquecimento convencional em bloco digestor ou banho-maria, ou ainda utilizar aquecimento por

radiação micro-ondas. Segundo Nogueira *et al.* (2010), o tratamento de amostras para a decomposição mediante aquecimento com radiação micro-ondas tem demonstrado ser um processo mais rápido, eficiente e seguro em comparação ao aquecimento convencional, fatores estes que tem contribuído para o aumento do número de aplicações de radiação micro-ondas no preparo de amostras em geral.

### **2.3.3 Frasco de combustão de Schöniger**

O frasco de combustão de Schöniger, conhecido como o advento do método do frasco de combustão com oxigênio, foi desenvolvido para a decomposição de amostras orgânicas e biológicas, de maneira relativamente fácil de conduzir, sem envolver aparelhagem complexa, promovendo a oxidação completa da matriz da amostra e possibilitando a recuperação quantitativa dos analitos (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Basicamente, o método consiste em envolver a amostra em um papel-filtro com baixo teor de cinzas, o qual fica suspenso em uma cesta de platina, dentro de um frasco fechado com atmosfera de oxigênio, na presença de solução absorvedora adequada para o elemento que se queira determinar. A ignição é feita manualmente, eletricamente, ou por meio de lâmpada infravermelha e auxílio de lente. A combustão é geralmente rápida e se completa entre 5 e 15 s, e a massa de amostra depende do volume do frasco e do tipo de amostra a ser utilizado. A Fig. 1 representa o frasco de Schöniger com seus respectivos componentes (MAGALHÃES *et al.*, 2010).



**Figura 1** – Frasco de combustão de Schöniger (adaptado de Flores *et al.*, 2007).

As vantagens da utilização da combustão em frasco de Schöniger compreendem a velocidade de decomposição das amostras, possibilidade de efetiva oxidação da matéria orgânica utilizando materiais de vidro, relativamente simples e baratos, e um baixo risco de perdas (MESKO, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2010). Entretanto, o procedimento apresenta algumas desvantagens, como por exemplo a utilização de massa de amostra relativamente pequena, podendo ocasionar problemas para as determinações de analitos presentes em baixas concentrações, decomposição de uma única amostra por vez, possibilidade de contaminação associada ao tipo de papel utilizado para envolver a amostra, além da necessidade de atenção contínua do operador (MESKO, 2008; KNAPP *et al.*, 1998). Magalhães *et al.* (2010) descreve ainda como limitações deste método de combustão a possibilidade de oxidação incompleta da amostra e a evaporação de compostos voláteis antes da queima.

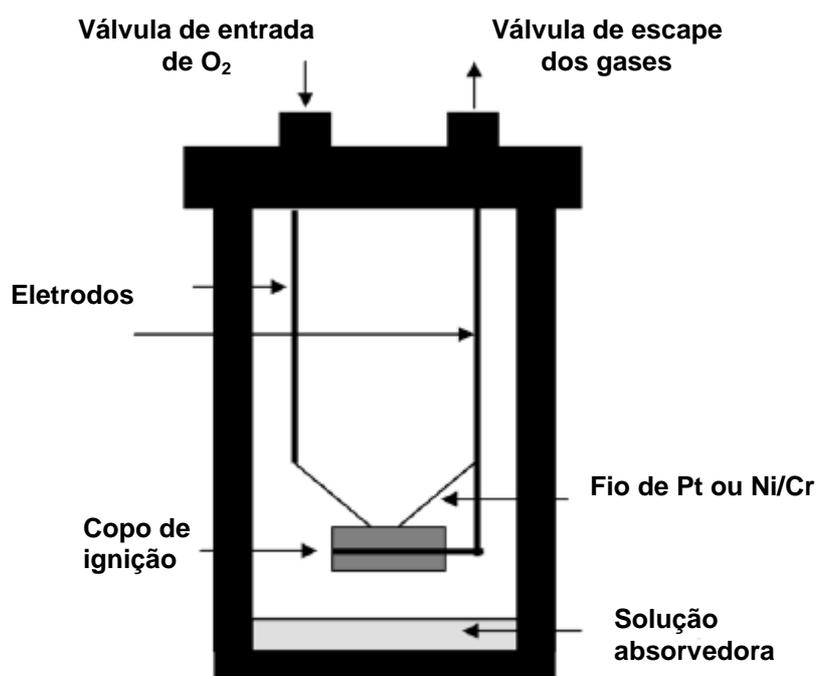
O método de combustão em frasco de Schöniger tem aplicação para a decomposição de diferentes tipos de amostras, onde muitas das utilizações tem sido para a subsequente determinação de não-metals, principalmente halogênios. Os

trabalhos realizados por Knapp *et al.* (1998) e Schramel e Hasse (1994) são exemplos da utilização deste método de combustão na decomposição de amostras biológicas para a posterior determinação de iodo.

Schramel e Hasse (1994) decompueram cerca de 20 a 25 mg de amostras de leite em pó, plantas e tecidos em frasco de Schöniger com capacidade de 500 ml, utilizando como solução absorvedora NaOH 0,1 mol l<sup>-1</sup>, sendo a determinação de iodo realizada em ICP-MS. Estes autores obtiveram concordância com valores certificados superiores a 82%. O mesmo procedimento foi realizado por Knapp *et al.* (1998) variando apenas a solução absorvedora utilizada, que foi de TMAH 0,5%, tendo os autores obtido concordância superior a 93% com valores certificados.

### 2.3.4 Bomba de combustão

Neste sistema de combustão as amostras são decompostas dentro de uma bomba de aço, na presença de excesso de oxigênio, sendo os produtos gasosos gerados absorvidos em solução adequada (MESKO, 2008). As principais partes que constituem a bomba de combustão são mostradas na Fig. 2.



**Figura 2** – Esquema de uma bomba de combustão (adaptado de Flores *et al.*, 2007)

Neste sistema, as amostras são preparadas na forma de comprimidos e posicionadas no copo de ignição, estando em contato com dois eletrodos. A bomba fechada é preenchida com oxigênio, a ignição é feita através do contato elétrico dos eletrodos com a amostra e a combustão ocorre de maneira efetiva, e em poucos segundos (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Mesko (2008) relata como vantagem deste procedimento de combustão os valores extremamente baixos de carbono residual, quando comparados aos sistemas de decomposição por via úmida. Uma outra vantagem relatada por Knapp *et al.* (1998) é a possibilidade de combustão de maior massa de amostra em relação ao frasco de Schöniger. Entretanto, Mesko (2008), também descreve em seu trabalho desvantagens deste método de combustão relatadas por outros autores. Estas desvantagens incluem problemas de contaminação durante a decomposição visando a determinação de elementos-traço metálicos, baixa eficiência de limpeza e baixa frequência de análise.

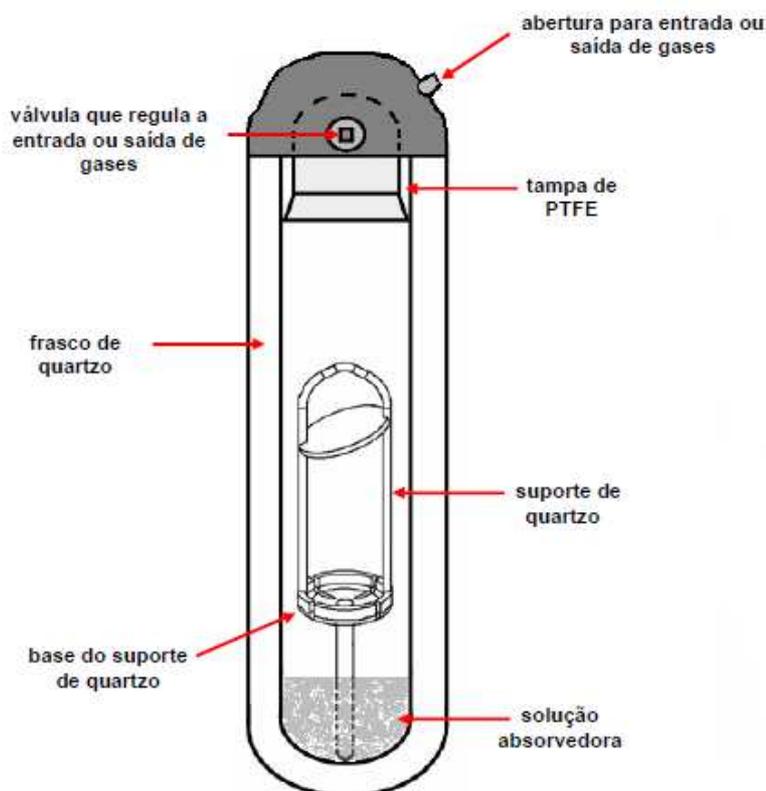
Muitas aplicações deste procedimento de combustão estão relacionadas com a subsequente determinação de não-metals, em particular os halogênios, como por exemplo os trabalhos desenvolvidos por Fung e Dao (1995; 1996). Estes autores utilizaram massas de amostra de combustíveis e resíduos orgânicos inferiores a 1 g, em sistema pressurizado com oxigênio a 25 atm. As determinações de flúor, fósforo, cloro, bromo, iodo e enxofre, foram realizadas por cromatografia de íons. A solução absorvedora utilizada foi  $K_2CO_3$  ( $25\text{ g l}^{-1}$ ), adicionada de 5 gotas de  $H_2O_2$  30%, com recuperações dos analitos superiores a 95%.

### **2.3.5 Combustão Iniciada por Micro-ondas (MIC)**

A radiação micro-ondas tem sido utilizada nos últimos anos devido à sua alta eficiência para transferência de calor, acelerando a etapa de digestão da amostra (LUQUE-GARCIA; CASTRO, 2003). Aliado a isto, os procedimentos de combustão tem sido estudados por permitirem a conversão de carbono e hidrogênio nos seus respectivos produtos oxidados, sob altas temperaturas, decompondo praticamente toda a matriz orgânica, e minimizando a possibilidade de interferências nas determinações analíticas (FLORES *et al.*, 2007).

Neste sentido, a combustão iniciada por micro-ondas foi proposta por Flores *et al.* (2004) com o objetivo de associar as vantagens da decomposição por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas e da combustão em sistemas fechados. Estas vantagens compreendem baixos valores de branco, redução de tempo, utilização de materiais inertes, uso de frascos de alta pressão, baixos valores de carbono residual, elevada massa de amostra, adequabilidade à determinação de não metais, e uso de volume mínimo de reagentes (MESKO, 2008). Assim, a combustão iniciada por micro-ondas tem sido proposta nos últimos anos, por permitir a digestão de amostras de difícil dissolução, com recuperação quantitativa dos analitos (FLORES *et al.*, 2007).

Neste procedimento, as amostras são decompostas em frascos fechados pressurizados com oxigênio, sendo a etapa de ignição promovida a partir do uso de radiação micro-ondas. Após a combustão, os analitos são absorvidos em uma solução apropriada e uma etapa de refluxo pode ser aplicada para auxiliar na recuperação quantitativa dos analitos. Este método foi adaptado para um forno de micro-ondas originalmente desenvolvido para decomposição por via úmida em sistema fechado (FLORES *et al.*, 2004). Para o procedimento de combustão, um dispositivo de quartzo, que serve como suporte para a amostra, é inserido no frasco de decomposição, de acordo com a Fig. 3. Atualmente um fabricante de fornos micro-ondas comercializa este suporte para combustão iniciada por micro-ondas, como peça acessória ao equipamento.



**Figura 3** - Frasco de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas (adaptado de MESKO, 2008).

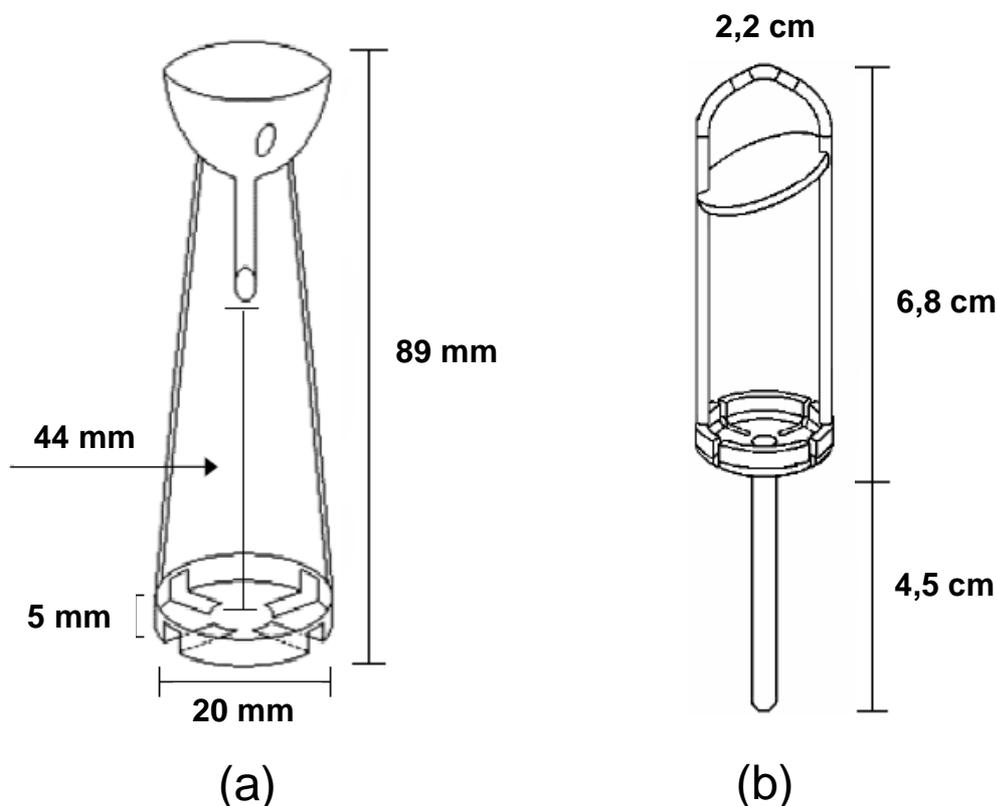
As amostras a serem decompostas por MIC devem ser preparadas na forma de comprimidos, os quais são colocados sobre um pedaço de papel filtro contendo baixo teor de cinzas, previamente posicionado sobre o suporte de quartzo, e contendo 50  $\mu\text{l}$  de solução de nitrato de amônio  $6 \text{ mol l}^{-1}$ , que funciona como iniciador de combustão. Os frascos são então fechados e pressurizados com oxigênio, e o rotor é levado ao forno micro-ondas. Radiação micro-ondas é aplicada para dar início ao processo de combustão. Após a etapa de ignição, o processo atinge elevada temperatura, geralmente superior a  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$ , oxidando completamente a matéria orgânica da amostra. A solução absorvedora praticamente não é aquecida durante o processo (FLORES *et al.*, 2004).

Após a decomposição por MIC, são observados baixos teores de carbono residual os quais chegam a até 0,4% do carbono original correspondente (FLORES *et al.*, 2004), o que é desejável, pois a presença de altos RCCs pode interferir significativamente em análises realizadas por diferentes técnicas, incluindo a

espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Uma das principais vantagens do sistema empregando MIC é a possibilidade de aplicação de etapa de refluxo após a combustão, o que é conseguido com a continuação do programa de irradiação de micro-ondas após a ignição. Nesta etapa ocorrem lavagens efetivas das paredes internas do frasco de decomposição, assim como do suporte para a amostra (MESKO, 2008). Esta etapa de refluxo garante menores desvios-padrão relativos e, em alguns casos, baixos RCCs, obtidos após decomposições por MIC (FLORES *et al.*, 2004).

Com relação ao suporte em quartzo, segundo Mesko (2008), os modelos mais adequados ao processo de combustão são os que ficam suspensos na parte superior do frasco de decomposição e possuem um funil que permite a lavagem efetiva da base onde a amostra sofreu a combustão. Durante a etapa de refluxo da solução absorvedora, a solução goteja no centro da base do suporte, auxiliando na limpeza e na transferência dos analitos para a solução. Ainda, o funil superior protege a tampa de PTFE do frasco de decomposição, evitando que a chama gerada durante a combustão atinja a tampa, causando deformações em sua estrutura. Ainda as ranhuras existentes na base deste modelo de suporte facilitam o contato do oxigênio presente no interior do frasco com a amostra, contribuindo para o processo de combustão (MESKO, 2008). Na Fig. 4 (a) e (b) são demonstrados dois tipos de suporte de quartzo utilizados nos procedimentos por MIC, sendo que um deles fica suspenso na parte superior do frasco (a), enquanto o outro é sustentado por uma base de apoio na parte inferior do frasco (b).



**Figura 4** - Suportes de quartzo utilizados no procedimento de decomposição por MIC, adaptado de Mesko, 2004 (a) e Mesko, 2008 (b).

Este procedimento de preparo de amostras é adequado para posterior determinação de metais e não-metals em materiais orgânicos (FLORES *et al.*, 2007), e foi empregado para digestão de amostras biológicas (MESKO *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2009), nanotubos de carbono (PEREIRA *et al.*, 2010), combustíveis fósseis, tais como carvão (FLORES *et al.*, 2008), coque de petróleo (MELLO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2008), óleo bruto extra-pesado (PEREIRA *et al.*, 2009) e resíduos de destilação de petróleo (MELLO *et al.*, 2009).

Um aspecto importante das técnicas de combustão está relacionado a solução absorvedora, responsável por reter quantitativamente os analitos antes da determinação. A seleção da solução absorvedora a ser utilizada depende principalmente do tipo de analito e da técnica de determinação utilizada (FLORES *et al.*, 2007).

No caso de quantificação de halogênios, há a vantagem da possibilidade da utilização de água ou soluções alcalinas para absorver os analitos (FLORES *et al.*, 2007), as quais são recomendadas para estes elementos devido a possibilidade de formação de compostos voláteis (ANTES *et al.*, 2010).

O procedimento de preparo de amostras por MIC foi empregado para a subsequente determinação de halogênios em amostras de carvão (FLORES *et al.*, 2007), óleo bruto extra-pesado (PEREIRA *et al.*, 2009), coque de petróleo (PEREIRA *et al.*, 2008), leite em pó, fígado bovino, farinha de trigo, amido de milho (MESKO *et al.*, 2010), e nanotubos de carbono (PEREIRA, 2010).

No trabalho de Mesko *et al.* (2010) massas de amostra de até 500 mg de fígado bovino, leite em pó, farinha de trigo e amido de milho foram queimadas completamente usando o procedimento por MIC para posterior determinação de iodo por ICP-MS. Recuperações de iodo superiores a 99% foram obtidas quando se utilizou  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  na concentração de 50 mmol l<sup>-1</sup> ou TMAH na concentração de 56 mmol l<sup>-1</sup> como solução absorvedora, empregando-se 5 min de etapa de refluxo.

Halogênios também foram determinados por IC e ICP-MS em amostras de nanotubos de carbono decompostas por MIC em um trabalho de Pereira *et al.* (2010). Neste trabalho foram avaliadas soluções absorvedoras de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , TMAH e CFA-C. Solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  foi considerada satisfatória para a absorção dos analitos por promover baixos valores de brancos e recuperações superiores a 97%.

#### **2.4 Determinação de Br e I por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**

A determinação de halogênios inclui métodos clássicos ou técnicas instrumentais. Entretanto, alguns destes métodos de determinação são morosos e inadequados para análise de rotina dos laboratórios, além de não apresentarem a sensibilidade e seletividade adequada para a determinação destes elementos em baixas concentrações (MESKO, 2008). Desta forma, como as concentrações de bromo e iodo na maioria dos alimentos são baixas, a determinação exata destes

analitos requer um método analítico que permita a determinação com rapidez, exatidão e em baixas concentrações.

Muitos métodos vêm sendo aplicados na determinação de halogênios em amostras biológicas, incluindo a voltametria de redissolução catódica (CSV), espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), cromatografia de íons (IC), eletrodos de íons seletivos (ISE), análise por ativação neutrônica (NAA) e espectrometria de fluorescência de dispersão de raios-X (EDXRF) (VARGA, 2007; KNAPP, 1998). Entretanto, algumas destas técnicas não apresentam limites de detecção suficientes para serem aplicadas na determinação de halogênios em baixas concentrações (KNAPP, 1998).

A técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) vem sendo amplamente empregada na determinação de halogênios devido às suas características de seletividade e baixos limites de detecção (SCHRAMEL, HASSE, 1994; KNAPP *et al.*, 1998). Esta pode ser considerada uma das mais importantes técnicas analíticas para a análise de elementos com concentrações ao nível de traço e ultra traço, caracterização de superfícies e para a análise estrutural de compostos bioinorgânicos (BECKER *et al.*, 2010).

Particularmente no caso das determinações por ICP-MS, o preparo de amostras é justificado pela necessidade de a amostra estar muito bem decomposta em meio adequado, pois a introdução de suspensões em ICP-MS, usando nebulização pneumática convencional pode obstruir os orifícios dos cones além de formar depósitos do material em outras partes do instrumento (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998).

Uma limitação ao uso da técnica de ICP-MS na determinação de halogênios, mais precisamente de iodo, está relacionada à ocorrência de efeitos de memória no sistema de introdução da amostra no equipamento, exigindo que a mesma seja tratada com vistas a eliminar este tipo de interferência. Usualmente, este preparo de amostras envolve a utilização de soluções alcalinas, o que além de prevenir os possíveis efeitos de memória, evita as perdas de analitos, responsáveis por recuperações não-quantitativas dos mesmos (VANHOE *et al.*, 1993; GÉLINAS, KRUSHEVSKA, BARNES, 1998; NÓBREGA *et al.*, 2006). Knapp *et al.* (1998)

aborda este assunto relatando estratégias de preparo de amostra que utilizam diluições ou dispersões em soluções alcalinas como a amônia, hidróxido de sódio, TMAH e CFAC, a fim de eliminar os efeitos de memória no ICP-MS.

Segundo Al-ammar, Reitznerová, Barnes (2001), os efeitos de memória de iodo ocorrem pela adsorção de seus compostos nas superfícies do tubo nebulizador e nas paredes da câmara de nebulização. Entretanto, a introdução direta de soluções de TMAH no plasma não é recomendada, pois podem ocorrer acúmulos ou depósitos na interface do espectrômetro, além de promover o carregamento do plasma. Conseqüentemente, a nebulização convencional das amostras contendo TMAH para introdução no plasma pode ser considerada uma ação difícil (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

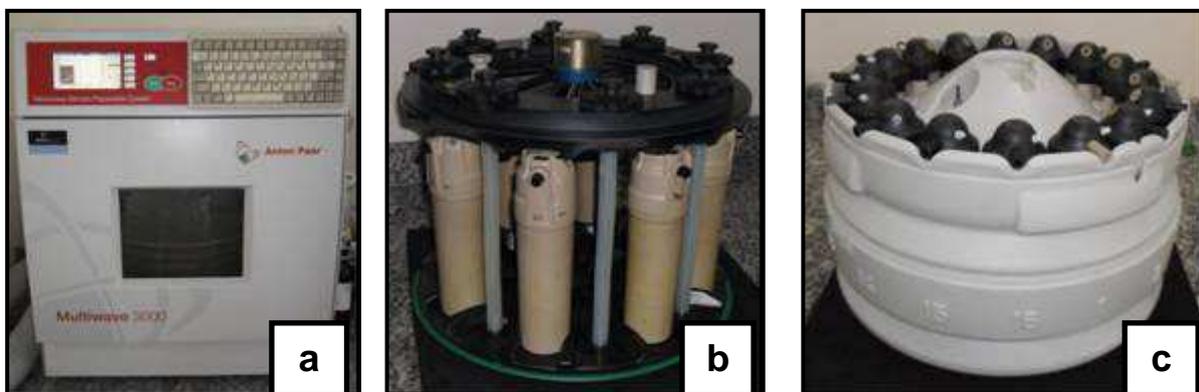
*Neste capítulo são descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho, bem como os procedimentos empregados para o preparo e análise das amostras.*

*Previamente a determinação dos analitos por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), foram avaliados diferentes procedimentos de preparo de amostra, como a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), extração alcalina com aquecimento em banho-maria e extração alcalina assistida por radiação micro-ondas. No procedimento de decomposição por MIC, foram avaliadas diferentes concentrações da solução absorvedora, com o intuito de selecionar a concentração mais adequada para absorver os analitos, enquanto que no procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas, foram estudadas diferentes soluções extratoras.*

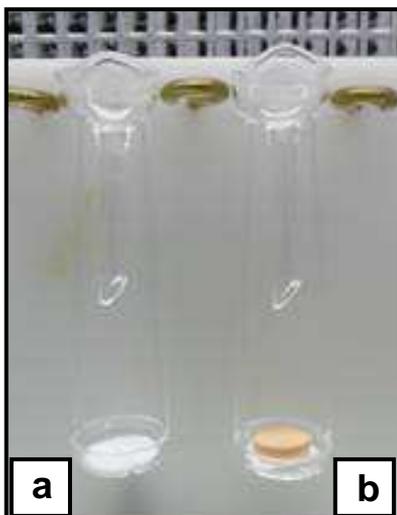
*Cabe ressaltar que parte destes procedimentos foram realizados no Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais da Universidade Federal de Santa Maria, com o apoio do grupo coordenado pelo Prof. Dr. Érico M. M. Flores.*

### 3.1 Instrumentação

Um sistema pressurizado com aquecimento por radiação micro-ondas *Multiwave 3000*<sup>®</sup> (Anton Paar) foi utilizado para a decomposição das amostras por MIC, bem como para os procedimentos de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas (Fig. 5). Para o procedimento de extração foi utilizado um sistema equipado com 16 frascos de PTFE, com volume interno de 100 ml, enquanto que para o procedimento de combustão, foi utilizado um sistema equipado com oito frascos de quartzo, com volume interno de 80 ml, contendo um dispositivo de quartzo inserido dentro do frasco de decomposição (Fig. 6), que serve como suporte para as amostras, conforme proposto por Flores *et al.* (2004). As condições máximas de temperatura, pressão e potência de operação são, respectivamente, 280 °C, 80 bar e 1400 W, para o procedimento de combustão e 90 °C, 40 bar e 1400 W, para o procedimento de extração.



**Figura 5** - Forno de micro-ondas comercial *Multiwave 3000*<sup>®</sup> (a), rotor equipado com 8 frascos de quartzo (b) e rotor equipado com 16 frascos de PTFE (c).



**Figura 6** - Suporte contendo papel-filtro (a), e suporte contendo papel-filtro e comprimido de amostra (b).

As extrações alcalinas foram feitas com auxílio de banho-maria (Thermomix<sup>®</sup>, Modelo 18 BU, B. Braun Biotech International). As amostras utilizadas nos procedimentos de extração alcalina foram centrifugadas em centrífuga para 8 tubos (International Equipment Co<sup>®</sup>).

Previamente aos procedimentos de decomposição, as amostras foram inicialmente trituradas em processador doméstico (Mondial<sup>®</sup>, modelo Premium) e, com exceção daquelas destinadas ao procedimento de extração alcalina com aquecimento em banho-maria, as quais foram mantidas *in natura*, as demais foram posteriormente cominuídas em moinho criogênico (modelo 6750, Spex CertiPrep), e secas em estufa convencional com circulação de ar DeLeo (modelo 400/2ND). As amostras destinadas ao procedimento de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas foram ainda prensadas em prensa hidráulica Specac (modelo Manual Hydraulic Press, 15 ton).

Cápsulas de policarbonato com massa em torno de 35 mg e medidas externas aproximadas de 1,3 x 0,5 cm foram utilizadas como invólucros das amostras, quando, devido a granulometria da amostra, não foi possível a prensagem.

Todos os procedimentos de pesagem efetuados durante este trabalho foram feitos em balança analítica Shimadzu (modelo AY220, Shimadzu do Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

Um banho de ultrassom Odontobrás (modelo Ultrasonic Cleaner 1440D Série Evolution) foi utilizado para a descontaminação do papel filtro usado como auxiliar no processo de combustão.

Bromo ( $m/z = 79$ ) e Iodo ( $m/z = 127$ ) foram determinados por ICP-MS (Elan DRC II, PerkinElmer SCIEX). O espectrômetro foi equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates), uma câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion, Inc.) e com uma tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc.) com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.). A otimização dos parâmetros instrumentais utilizados para as determinações, incluindo vazão do gás de nebulização, voltagem da lente iônica e alinhamento da tocha, foi feita de acordo com as recomendações do fabricante (PERKINELMER-SCIEX, 2003).

### 3.2 Reagentes

Hidróxido de amônio p.a. (Merck) foi utilizado para o preparo de solução extratora avaliada no sistema de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas, e também de solução absorvedora empregada na decomposição por MIC. Também para a decomposição por MIC, foi utilizada uma solução de nitrato de amônio ( $6 \text{ mol l}^{-1}$ ) como iniciador de combustão. Esta solução foi preparada a partir da dissolução de  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$  p.a. (Merck) em água.

Uma solução de hidróxido de tetrametilamônio 25% (m/v) (Sigma-Aldrich) foi utilizada nos procedimentos de extração alcalina com aquecimento em banho-maria ou assistida por radiação micro-ondas.

As soluções de calibração de Br e I foram preparadas a partir da dissolução em série de soluções de referência contendo sais de brometo e iodeto de potássio (Merck) em hidróxido de amônio  $5 \text{ mmol l}^{-1}$ .

Oxigênio (White Martins), com pureza de 99,999% foi utilizado para a pressurização dos frascos de decomposição por MIC.

Nas determinações por ICP-MS, o plasma foi gerado a partir de argônio de alta pureza (99,998%, White Martins).

Ácido nítrico p.a. (Merck) foi utilizado para a descontaminação dos materiais utilizados neste trabalho.

Celulose cristalina de grau farmacêutico foi utilizada para a confecção de comprimidos de amostras contendo fração inorgânica relativamente elevada, para a decomposição por MIC.

A água de alta pureza utilizada nos procedimentos foi destilada, deionizada em coluna de troca iônica e, adicionalmente, purificada em um sistema de Milli-Q® (Millipore), com resistividade final de 18,2 MΩ cm.

### **3.3 Materiais diversos**

A vidraria utilizada e outros materiais comuns de laboratório foram descontaminados por imersão em ácido nítrico 10% (v/v) por, pelo menos, 24 horas e, posteriormente, lavados com água purificada.

Os papéis filtro (Black Ribbon Ashless, Schleicher & Schüll GmbH, Alemanha) foram descontaminados através de imersão em álcool etílico 20% (v/v) por 20 min em banho de ultrassom e, posteriormente, lavados com água e secos em capela de fluxo laminar por 2 h.

Os frascos de quartzo e de PTFE do forno de micro-ondas e os suportes para as amostras usados no sistema de combustão foram descontaminados com ácido nítrico concentrado e aquecimento em forno de micro-ondas usando o seguinte programa de aquecimento: *i*) 1400 W por 10 min e *ii*) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Os mesmos procedimentos de descontaminação foram repetidos duas vezes com água purificada, antes de proceder as decomposições das amostras.

### **3.4 Amostras**

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de camarão com e sem casca obtidas no comércio local. Segundo informações do comerciante tratam-se de

camarões da espécie conhecida como “camarão cinza” (*Litopenaeus vannamei*), cultivada em cativeiro na Laguna dos Patos, na região de Pelotas/RS. Estudos de determinação da espécie não foram realizados.

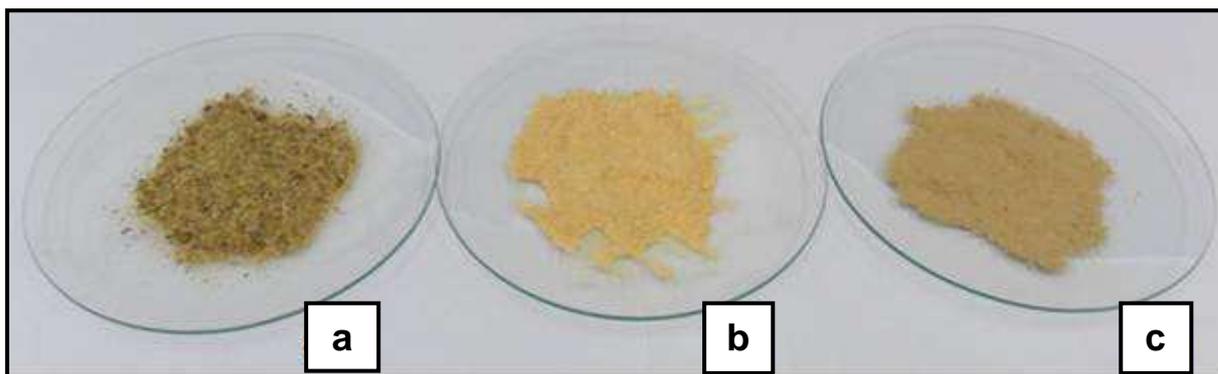
Serão denominados camarões com casca os camarões comercializados inteiros, com casca e cabeça; e camarões sem casca aqueles cujos resíduos (casca e cabeça) já foram removidos (Fig. 7).



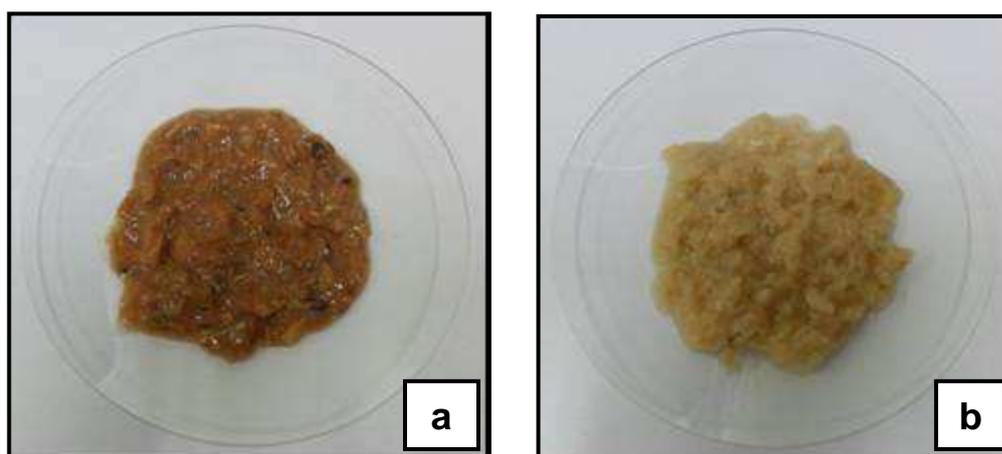
**Figura 7** - Amostras de camarão com casca (a) e camarão sem casca (b), obtidas no comércio local (Pelotas/RS).

Uma parte das amostras de camarão com casca foram separadas e delas foram removidos os resíduos (casca e cabeça). Logo, os resíduos foram submetidos ao mesmo tratamento do restante das amostras.

As amostras foram lavadas com água purificada, trituradas em processador doméstico, secas em estufa a 85 °C por 24 h (Fig. 8), segundo procedimento descrito por Eckhoff e Maage (1997) e cominuídas em moinho criogênico até tamanho de partícula inferior a 120 µm. Uma exceção a este procedimento foram as amostras destinadas ao preparo por extração alcalina com aquecimento em banho-maria, as quais foram mantidas *in natura*, sendo apenas lavadas com água purificada e trituradas em processador doméstico, de acordo com trabalhos propostos por Damin *et al.* (2007) e Damin (2009) (Fig. 9).

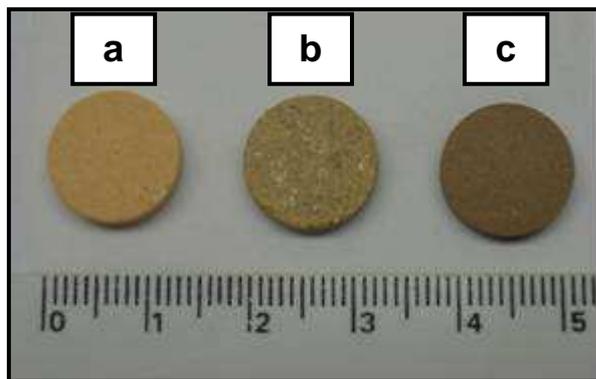


**Figura 8** - Amostras de camarão com casca (a), camarão sem casca (b) e resíduos de casca e cabeça de camarão (c), secas em estufa e moídas em processador doméstico.



**Figura 9** - Amostras de camarão com casca (a) e camarão sem casca (b) trituradas em processador doméstico.

Todas as amostras e o CRM submetido à decomposição por MIC foram prensadas (8 ton) na forma de comprimidos com 13 mm de diâmetro por 1 min (Fig. 10).



**Figura 10** - Comprimidos preparados com: camarão sem casca (a), camarão com casca (b) e resíduos de casca e cabeça de camarão (c).

Além disso, comprimidos de resíduos de casca e cabeça de camarão foram também preparados acrescidos de parcela significativa (50%) de celulose microcristalina, com o intuito de promover a evaporação dos analitos desta amostra com teor de materiais inorgânicos relativamente elevados, garantindo a recuperação quantitativa dos analitos, de acordo com Han, Kaiser e Tölg (1982) e Geng *et al.* (2008).

Para a validação do procedimento proposto por MIC foi utilizado o material de referência certificado (CRM): NIST Canadá RM 8414 (*Bovine Muscle*).

### **3.5 Determinação de umidade, peso médio e relação massa corpórea/casca, nas amostras de camarão**

O teor de umidade das amostras de camarão *in natura*, com e sem casca, foi determinada submetendo-se cerca de 3 g de amostra à temperatura de 85 °C, em estufa, até peso constante.

O peso médio das amostras de camarão e a relação camarão/casca foram obtidos a partir da média da pesagem de 20 amostras individuais de camarões inteiros, seguida da pesagem da massa corpórea referente a cada um destes organismos, segundo adaptações de determinações de peso médio descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005) e pela Farmacopéia Brasileira (2010).

### 3.6 Procedimento de decomposição por MIC

O procedimento de decomposição por MIC consistiu, basicamente, em pesar cerca de 500 mg da amostra na forma de comprimido, o qual é colocado na base do suporte de quartzo contendo um disco de papel filtro (15 mm de diâmetro, 12 mg) umedecido com 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6  $\text{mol l}^{-1}$ . Utiliza-se ainda, no interior do frasco de decomposição, 6 ml de solução absorvedora adequada aos analitos. Este procedimento foi baseado em trabalhos prévios (FLORES *et al.*, 2004; MESKO *et al.*, 2006).

Foram realizados neste procedimento ensaios de recuperação, pela adição de concentrações conhecidas de solução contendo os analitos nos comprimidos de amostra, antes do procedimento de decomposição, avaliando diferentes concentrações de duas soluções absorvedoras:  $\text{NH}_4\text{OH}$  nas concentrações 25, 50, 75 e 100  $\text{mmol l}^{-1}$ ; e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  nas concentrações 50 e 100  $\text{mmol l}^{-1}$ .

Além disso, nas melhores condições, foi avaliado o CRM NIST Canadá RM 8414, contendo valores de bromo e iodo certificados, a fim de comprovar a exatidão do procedimento proposto.

Amostras de camarão com casca, camarão sem casca e resíduos de casca e cabeça de camarão, foram então decompostas por MIC, utilizando solução absorvedora na melhor concentração observada após os ensaios de recuperação, e decomposição de CRM.

Adicionalmente, para a decomposição dos resíduos de casca e cabeça de camarão, foi avaliada a adição de celulose nos comprimidos de amostra. Cada comprimido de 500 mg foi composto por frações de amostra e celulose com massa aproximada de 250 mg cada.

Em todos os procedimentos por MIC, o sistema de decomposição foi pressurizado com 20 bar de oxigênio e submetido ao seguinte programa de irradiação com micro-ondas: *i)* 1400 W por 5 min para a etapa de combustão seguida de refluxo e, *ii)* 0 W por 20 min, para a etapa de resfriamento. Após o resfriamento, as amostras foram aferidas a 25 ml e as determinações de bromo e iodo foram conduzidas por ICP-MS.

### 3.7 Extração alcalina com aquecimento em banho-maria

Extrações das amostras em solução alcalina foram realizadas com aquecimento em banho-maria, utilizando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25% (m/v), segundo adaptações dos procedimentos descritos por Martins *et al.* (2002) e Rädlinger e Heumann (1998).

Foram pesados cerca de 1 g de amostra *in natura* (apenas lavada com água ultrapura e triturada em processador doméstico) e foram avaliados diferentes volumes (0,5 ou 1 ml) de TMAH, aquecidos a temperaturas de 60 e 90 °C, em tempos de 30 min, 1 h e 2 h. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 min, e diluídas a 10 ml. Posteriormente, as determinações de Br e I nas amostras foram feitas por ICP-MS.

### 3.8 Procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado

O procedimento de extração alcalina assistida por micro-ondas foi adaptado de procedimentos descritos por Knapp *et al.* (1998) e Tagami *et al.* (2006).

Assim, foram transferidos uma massa de cerca de 500 mg de amostra para os frascos de PTFE, onde adicionou-se 6 ml de solução (TMAH 0,11 mol l<sup>-1</sup>, ou NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup>). A seguir, os frascos foram fechados e submetidos ao programa de irradiação com micro-ondas. O programa foi feito utilizando uma rampa de 10 min a 1400 W, tempo de permanência de 50 min a 1400 W e 20 min a 0 W (etapa de resfriamento).

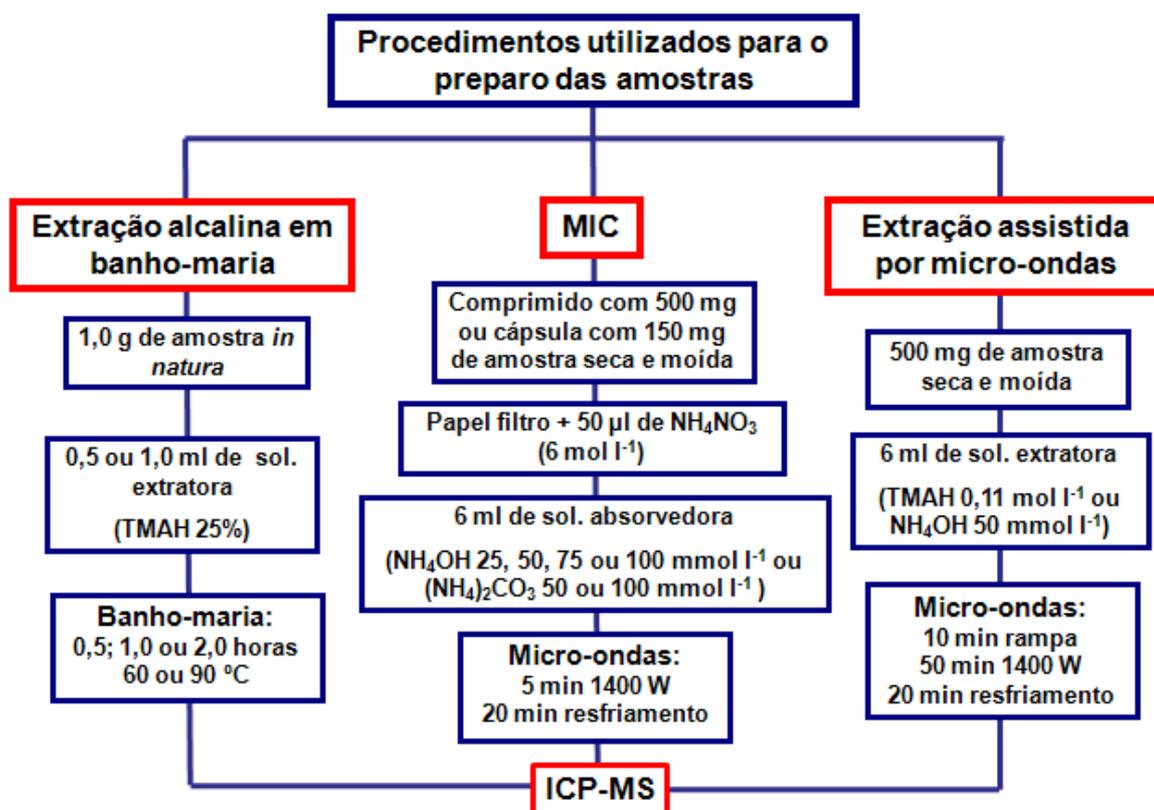
A temperatura máxima da extração foi limitada em 90 °C, para evitar riscos de degradação do reagente TMAH (KNAPP *et al.*, 1998; TAGAMI *et al.*, 2006).

Após o término do programa, a solução resultante foi transferida para um frasco de polipropileno e feita a aferição para 25 ml com água purificada. Posteriormente, as determinações dos analitos nas amostras foram feitas por ICP-MS.

Na Fig. 11 é mostrado um fluxograma com todos os procedimentos de preparo das amostras utilizados neste trabalho para amostras de camarão com e

sem casca, e em resíduos de casca e cabeça de camarão, para posterior determinação de Br e I.

Cabe ressaltar que, embora não se tenha conhecimento de que realmente ocorra a extração dos analitos da amostra, ou apenas a dissolução da mesma, optou-se por utilizar o termo “extração” para nomear os procedimentos que envolvem o emprego de soluções alcalinas.



**Figura 11** - Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo das amostras de camarão com e sem casca e de resíduos de casca e cabeça de camarão para posterior determinação de bromo e iodo, por ICP-MS.

### 3.9 Determinação dos analitos por ICP-MS

Depois de submetidas aos diferentes procedimentos de preparo de amostra, as soluções obtidas foram levadas ao ICP-MS para a determinação de Br e I. As determinações foram feitas utilizando-se as condições apresentadas na Tab. 1.

**Tabela 1** - Parâmetros operacionais para a determinação de Br e I por ICP-MS.

Parâmetros	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400
Vazão principal de argônio (l min <sup>-1</sup> )	15,0
Vazão auxiliar de argônio (l min <sup>-1</sup> )	1,2
Vazão de argônio do nebulizador (l min <sup>-1</sup> )	1,15
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Cones de amostragem ( <i>sampler e skimmer</i> )	Pt
Lente iônica	<i>Auto lens on</i>
Tempo de permanência no detector (ms)	50
Isótopos (m/z)	<sup>79</sup> Br, <sup>127</sup> I

A calibração do instrumento se deu por utilização de soluções preparadas a partir de soluções padrão estoques contendo 10000 ppm dos analitos, perfazendo uma curva com concentrações de 0,1 a 1 ppb de I, e 1 a 10 ppb de Br.

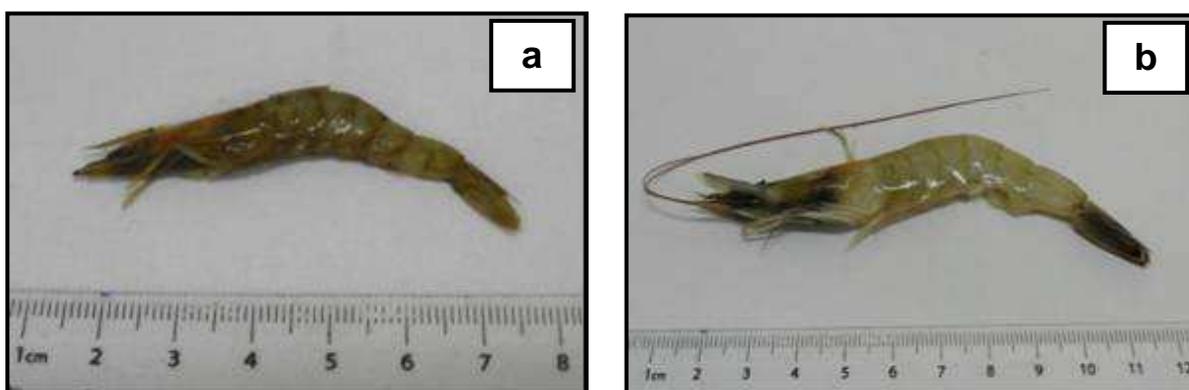
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas análises descritas no capítulo 3 (Materiais e Métodos). Estes resultados possibilitaram a avaliação de diferentes procedimentos de preparo de amostra e soluções adequadas a estes procedimentos.*

*A discussão dos resultados foi subdividida de acordo com os diferentes procedimentos executados. Na primeira parte, são discutidos os aspectos relacionados às caracterizações físicas das amostras. Nas três partes seguintes são apresentados os resultados obtidos para a determinação de bromo e iodo por ICP-MS após os diferentes procedimentos avaliados. Na quinta e última parte, é feita uma discussão comparando as vantagens e desvantagens dos métodos de preparo de amostras utilizados.*

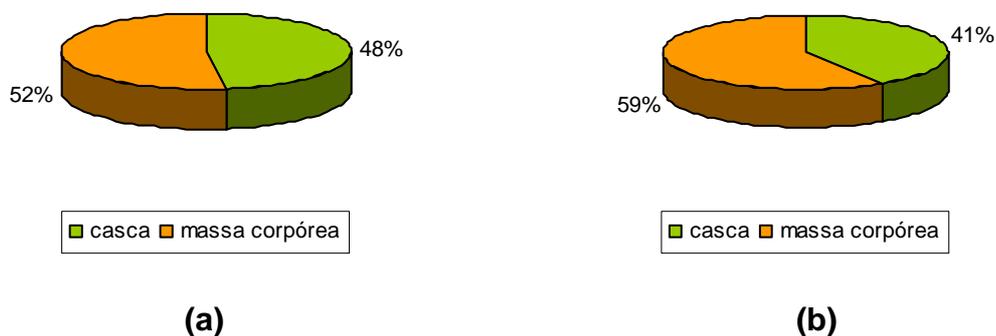
#### 4.1 Determinação de umidade, peso médio e relação massa corpórea/casca, nas amostras de camarão

Buscando a caracterização física das amostras utilizadas, foram determinados o peso médio e a relação massa corpórea/casca de camarões comercializados, e usualmente denominados como “graúdo” e “miúdo”, de acordo com o tamanho dos organismos. Os camarões “graúdos” tem comprimento médio de 10 cm, enquanto que os camarões “miúdos” medem, em média, 6 cm de comprimento.



**Figura 12** - Camarões comercializados como “miúdos” (a) e “graúdos” (b).

Os resultados encontrados na determinação do peso médio dos camarões, e relação massa corpórea/casca, cujas determinações foram realizadas de acordo com o descrito no item 3.5 (*Materiais e Métodos*), mostraram que os organismos submetidos às análises têm massa média de  $9,9 \pm 0,7$  g, sendo que a casca representa  $40,8 \pm 2,1\%$  da massa total, para os camarões “graúdos”; e massa média de  $2,0 \pm 0,2$  g, sendo que a casca representa  $47,9 \pm 3,3\%$  da massa total, para os camarões “miúdos”. A Fig. 13 ilustra a relação massa corpórea/casca nos dois tipos de camarões, e permite observar de maneira clara que o percentual de massa corpórea aumenta com o aumento da massa do camarão inteiro. A partir destes resultados, pode-se estimar que em amostras com tamanhos mistos de camarão, o percentual de casca fique em torno de 45% da massa de um camarão inteiro. Cabe ressaltar que os resíduos de “cabeça” e “patas” do camarão são considerados nesta ilustração juntamente com a massa correspondente à casca, pois é desta forma que é comercializado e consumido.



**Figura 13** - Relação massa corpórea/casca de camarões comercializados como “miúdos” (a) e “graúdos” (b).

Amostras com tamanhos mistos de camarão com e sem casca foram submetidas a determinação de umidade, também segundo descrito no item 3.5 (*Materiais e Métodos*). Os teores de umidade encontrados são apresentados na Tab. 2, e demonstram ser maiores nas amostras de camarão sem casca. Desta forma, pode-se comprovar que os maiores teores de umidade se encontram na massa corpórea do camarão. Os dados encontrados são coerentes com as informações veiculadas sobre o teor esperado de umidade em camarões comercializados frescos, visto que se trata de um organismo com a peculiar característica de, uma vez pescado e morto, absorver água rapidamente aumentando muito o seu peso. Para que isto não ocorra é necessário o seu congelamento o mais rápido possível, o que nem sempre é viável nas embarcações de captura. O alto teor de umidade é responsável pela deterioração de forma mais rápida observada nos camarões comercializados frescos, se comparados aos congelados (Manual do Camarão, 2007).

**Tabela 2** - Teor de umidade em amostras de camarão com e sem casca (n=3).

Amostra	Umidade (%)
Camarão com casca	80,2 ± 0,3
Camarão sem casca	85,3 ± 0,4

Assim, tomando por base que o percentual de casca em um camarão inteiro fica em torno de 45% de sua massa total, enquanto sua massa corpórea compreende os 55% restantes da massa total, e conhecendo-se os teores de umidade de camarões com e sem casca, pode-se estimar que a massa corpórea, em base seca, de um camarão inteiro é em torno de 8% de seu peso total, enquanto que sua casca, também em base seca, representa cerca de 12% do camarão inteiro. O teor de umidade de um camarão inteiro fica distribuído nas seguintes frações aproximadas: 47% na massa corpórea, e 33% na casca.

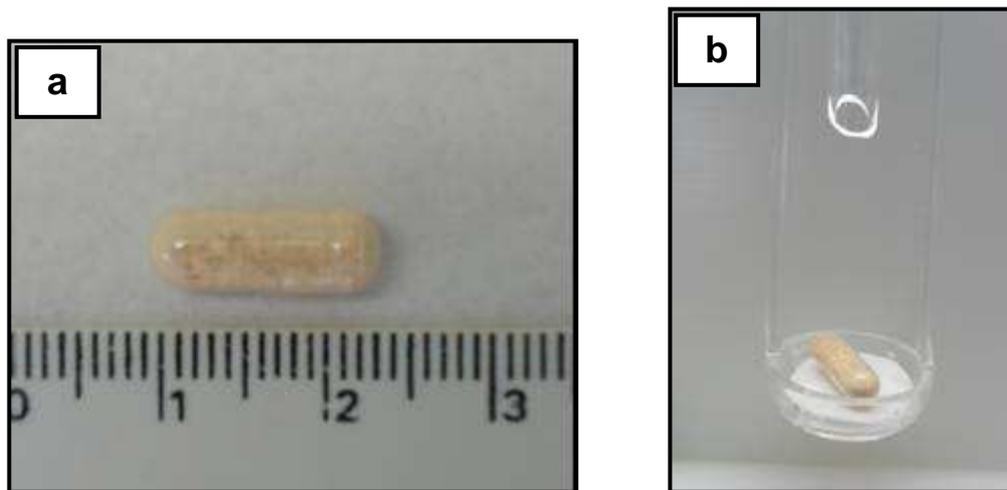
Cabe destacar que este estudo foi feito, no intuito de relacionar os resultados obtidos para as determinações de Br e I nas diferentes partes dos camarões, conforme será apresentado nos itens a seguir.

#### **4.2 Procedimento por MIC para a decomposição das amostras e subsequente determinação de bromo e iodo por ICP-MS**

As decomposições por MIC foram realizadas de acordo com trabalhos feitos anteriormente usando o sistema, conforme descrito no item 2.3.3 (*Revisão Bibliográfica*) (FLORES *et al.*, 2004; MESKO *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2007).

Inicialmente, por desconhecer os prováveis teores dos analitos nas amostras de camarão estudadas, foi realizada uma primeira decomposição de camarão sem casca, utilizando solução de carbonato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) na concentração de 50 mmol l<sup>-1</sup>. Esta solução foi escolhida devido relatos da literatura apresentarem recuperações acima de 95% para halogênios em amostras de carvão (FLORES *et al.*, 2008) e iodo em alimentos (MESKO *et al.*, 2010). As amostras de camarão sem casca utilizadas neste procedimento foram previamente trituradas em processador doméstico, e secas a 85 °C. Entretanto, não foi possível a prensagem das mesmas, provavelmente pela granulometria elevada obtida por este tipo de moagem. Assim, a queima só foi possível de ser realizada quando as amostras foram colocadas dentro de cápsulas de policarbonato. A utilização deste tipo de invólucro para a amostra foi baseada em trabalhos da literatura que utilizam cápsulas para acondicionamento das amostras (FARROHA; HABBOUSH, 1990; MACDONALD, 1965). Assim, cerca de 150 mg de amostra de camarão sem casca foram pesadas diretamente na cápsula e dispostas no suporte de quartzo, conforme mostrado nas Figs. 14 (a) e (b).

Cabe destacar que foram utilizadas etapas de refluxo de 5 minutos após a etapa de combustão para todos os procedimentos por MIC. Esta condição foi escolhida de acordo com relatos da literatura onde foram observadas recuperações quantitativas e menores desvios padrões relativos (RSDs), quando a etapa de refluxo foi aplicada (FLORES *et al.*, 2004; MESKO *et al.*, 2010).



**Figura 14** - Cápsula de policarbonato contendo a amostra (a) e cápsula disposta no suporte (b).

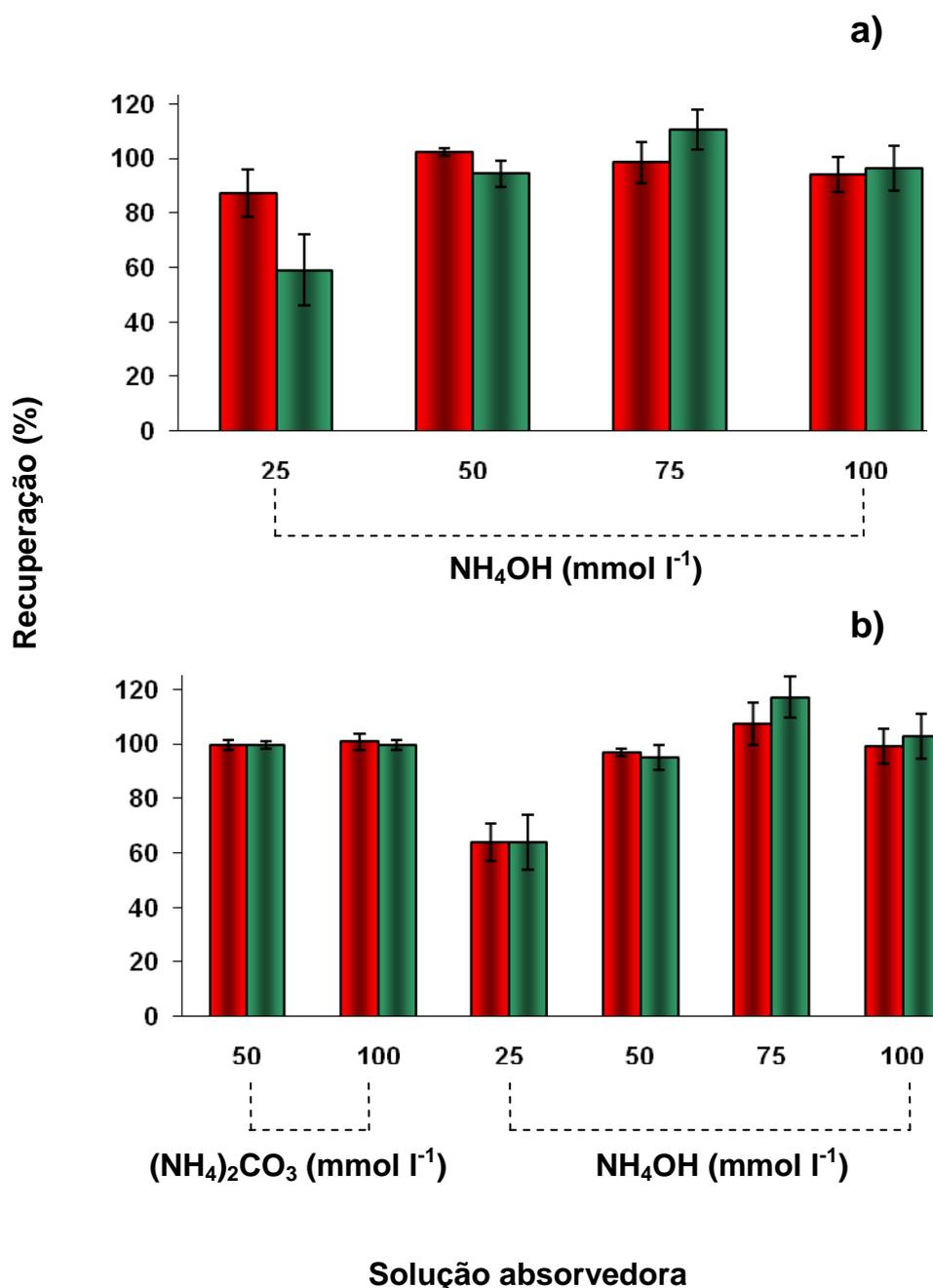
Os resultados encontrados para iodo em amostras de camarão sem casca após a decomposição utilizando cápsulas de policarbonato foram de  $508,8 \pm 16,1 \text{ ng g}^{-1}$ . Entretanto, mesmo a cápsula de policarbonato permitindo uma queima satisfatória, e brancos relativamente baixos, a quantidade de amostra é limitada, devido ao seu pequeno porte. No caso do camarão sem casca, foi possível utilizar, no máximo, 150 mg de amostra. Esta informação, somada ao agravante de os teores dos analitos serem relativamente baixos em amostras de camarão sem casca, dificulta a utilização deste tipo de cápsula para a amostra analisada, visto que a concentração do analito nesta solução se aproxima do limite de detecção da técnica de ICP-MS. Além disso, a pesagem da amostra na cápsula é bastante trabalhosa e exige habilidade do analista.

Assim, tendo em vista algumas limitações apresentadas quanto ao uso das cápsulas de policarbonato, foi avaliada outra forma de moagem das amostras, visto que a granulometria das partículas de amostra pode interferir na prensagem das

mesmas. Para tanto, foi utilizado um moinho criogênico, onde a granulometria obtida é, geralmente, inferior a 120  $\mu\text{m}$ . Com esta granulometria foi possível prensar as amostras e preparar comprimidos com massa de até 500 mg.

Posteriormente, com a finalidade de continuar o estudo, foram adquiridas novas amostras de camarão, sendo realizada uma avaliação da solução mais apropriada para absorver Br e I, onde foram estudadas diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Estas soluções foram escolhidas de acordo com dados publicados em trabalhos anteriores (MESKO, 2008; PEREIRA *et al*, 2010).

Desta forma, ensaios de recuperação foram realizados para avaliar a solução absorvedora mais apropriada para Br e I. Foram avaliadas diferentes concentrações da solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25, 50, 75 e 100  $\text{mmol l}^{-1}$ ) em amostras de camarão com e sem casca, e concentrações de 50 e 100  $\text{mmol l}^{-1}$  de solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  em amostras de camarão com casca. É importante enfatizar que foram avaliadas somente as concentrações de 50 e 100  $\text{mmol l}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , pois de acordo com relatos na literatura estas soluções foram apropriadas para a absorção de iodo em amostras biológicas (MESKO, 2008). Os ensaios foram realizados pela adição de concentrações conhecidas de soluções padrão dos analitos nos comprimidos de amostra, antes de proceder a combustão. Nas Fig. 15 (a) e (b) são apresentadas as recuperações obtidas para Br e I nas amostras de camarão com e sem casca, após decomposição por MIC e subsequente determinação por ICP-MS.



**Figura 15** - Influência da solução absorvedora para a determinação de ■ Br e ■ I em camarão sem casca (a) e camarão com casca (b) usando o procedimento por MIC com 5 min de refluxo e determinação por ICP-MS (massa de amostra = 500 mg, n=3)

Como pode ser observado na Fig. 15 (a) e (b), as máximas recuperações para Br e I quando solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  na concentração de 25 mmol l<sup>-1</sup> foi utilizada

como solução absorvedora, foram de 87 e 59%, respectivamente. Desvios padrões relativos entre 6,9 e 12,9% foram observados com esta solução. Contudo, quando a concentração da solução absorvedora foi aumentada para 50 mmol l<sup>-1</sup>, as recuperações variaram de 95 a 102 % para bromo e de 94 a 97% para iodo nos dois tipos de amostra. Quando a concentração de NH<sub>4</sub>OH foi de 75 e 100 mmol l<sup>-1</sup>, a recuperação dos halogênios praticamente não foi alterada, ficando entre 94 e 107% para bromo e entre 95 e 117% para iodo. Todavia, com o uso das concentrações 50, 75 ou 100 mmol l<sup>-1</sup> de hidróxido de amônio, como solução absorvedora, os RSDs foram inferiores a 8,33%. Desta forma, quaisquer das três concentrações (50, 75 ou 100 mmol l<sup>-1</sup>) da solução absorvedora de NH<sub>4</sub>OH podem ser consideradas adequadas para a absorção dos analitos, bromo e iodo, nas amostras analisadas.

Comportamento semelhante foi observado para as concentrações avaliadas de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, onde com concentração de 50 mmol l<sup>-1</sup> foram obtidas recuperações acima de 99% para ambos os analitos e, quando a concentração foi aumentada para 100 mmol l<sup>-1</sup>, as recuperações praticamente não se alteraram. Cabe ressaltar que as recuperações obtidas com esta solução estão concordantes com relatos da literatura para estes analitos em outros tipos de matrizes orgânicas (MESKO *et al.*, 2010). Todavia, quando a solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> é utilizada para absorver Br e I, alguns problemas podem ser observados durante a determinação por ICP-MS, pois podem ocorrer depósitos de carbono na interface do ICP-MS (cones e lente iônica), bem como a necessidade de mais tempo de lavagem entre uma amostra e outra, devido a problemas de efeito de memória para estes analitos, que podem ficar mais pronunciadas com a presença de carbono na solução. Assim, com o objetivo de reduzir algumas dificuldades durante a etapa de determinação de Br e I com o uso da solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por ICP-MS, optou-se por utilizar solução de NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora.

Desta forma, para avaliar a exatidão do procedimento de decomposição por MIC utilizando NH<sub>4</sub>OH como solução absorvedora, foi decomposto cerca de 500 mg do CRM NIST RM 8414 (*Bovine Muscle*), conforme descrito no item 3.5 (*Materiais e Métodos*), avaliando duas concentrações da solução absorvedora, 50 e 100 mmol l<sup>-1</sup>.

Os resultados apresentados na Tab. 3, referentes à determinação dos analitos no CRM por ICP-MS, após decomposição por MIC, mostram concordâncias superiores a 99% para ambos os analitos nas duas concentrações de solução

absorvedora avaliadas. Utilizando o teste *t* de Student é possível observar que ambas as concentrações de  $\text{NH}_4\text{OH}$  não fornecem diferenças significativas com o valor certificado para Br e I, ao nível de 95% de confiança. Desta forma, tanto a concentração de  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  quanto a concentração de  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  da solução absorvedora são satisfatórias para a absorção dos analitos. Entretanto, é sempre desejável a utilização de soluções absorvedoras mais diluídas, nas determinações por ICP-MS. Assim, a partir das informações obtidas com a decomposição do CRM e com os ensaios de recuperação, onde foram avaliadas diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{OH}$  como solução absorvedora, foi escolhida a concentração de  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  da solução como adequada para absorver os analitos nas decomposições posteriores. Esta escolha foi feita devido aos baixos valores de desvio padrão, boa concordância com os valores certificados e, principalmente pelo uso de solução com a menor concentração possível para minimizar diluições excessivas e facilitar as determinações por ICP-MS.

**Tabela 3** - Determinação de Br e I em material de referência certificado (NIST RM 8414), por ICP-MS, após decomposição por MIC, utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 50 e  $100 \text{ mmol l}^{-1}$ , como solução absorvedora (n=3).

Solução absorvedora	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	Bromo	Iodo
$\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$	$1,2 \pm 0,1$	$0,041 \pm 0,003$
$\text{NH}_4\text{OH } 100 \text{ mmol l}^{-1}$	$1,1 \pm 0,1$	$0,036 \pm 0,003$

Valor certificado para Br:  $1,1 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ , e para I:  $0,035 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Cabe ressaltar que durante as determinações por ICP-MS, o sistema de nebulização foi lavado constantemente com uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$ , conforme recomendado por outros autores (VANHOE *et al.*, 1993; SCHRAMEL; HASSE, 1994), a fim de evitar problemas de efeito de memória para iodo. As amostras e as soluções de referência para a calibração do equipamento foram preparadas também nesta solução. Além disso, as curvas de calibração foram sempre preparadas previamente as determinações utilizando o mesmo meio em que as amostras foram absorvidas, considerando a concentração final da solução

absorvedora. Desta forma, para a solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$ , as curvas de calibração foram preparadas em  $\text{NH}_4\text{OH}$   $10 \text{ mmol l}^{-1}$ .

Após a escolha da solução absorvedora mais apropriada para Br e I, amostras de camarão com e sem casca foram submetidas ao procedimento de decomposição por MIC utilizando como solução absorvedora  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$ , e os resultados obtidos após determinação por ICP-MS estão apresentados na Tab. 4. Os RSDs encontrados nas determinações de Br nos dois tipos de amostra foram inferiores a 2,5%, enquanto que para I o RSD máximo verificado foi de 8,4%, para as amostras de camarão com casca.

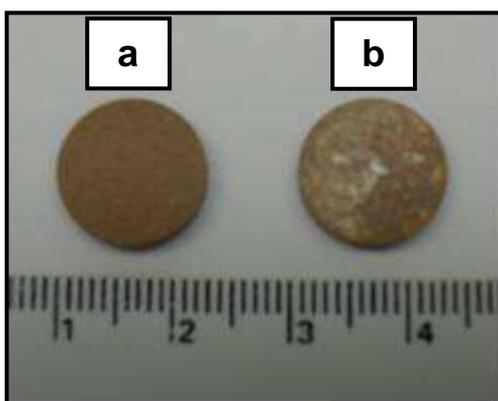
**Tabela 4** - Determinação de Br e I em amostras de camarão com e sem casca, por ICP-MS, após decomposição por MIC (n=3).

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	Bromo	Iodo
Camarão com casca	$182,4 \pm 4,2$	$11,3 \pm 1,0$
Camarão sem casca	$17,6 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,01$

Com base nos valores apresentados na Tab. 4, foi possível observar resultados bastante superiores tanto para Br quanto para I, nas amostras de camarão com casca, se comparado aos resultados obtidos para as amostras de camarão sem casca. Assim, foram avaliadas as concentrações dos analitos nos resíduos de cabeça e cabeça dos camarões. Entretanto, foi necessário a aquisição de um novo lote de amostra, onde massa corpórea e resíduos foram submetidos separadamente à decomposição por MIC. Contudo, devido as características do resíduo serem diferenciadas, principalmente em relação aos teores de materiais inorgânicos, como por exemplo, carbonato de cálcio (ASSIS, STAMFORD, STAMFORD, 2008; MATHUR, NARANG, 1990) e, assim, possivelmente apresentar menor teor de matéria orgânica, avaliou-se a adição de celulose microcristalina aos resíduos de casca e cabeça de camarão. Este procedimento foi adotado com o intuito de aumentar a fração orgânica da amostra, garantindo a combustão, e maior facilidade de volatilização do analito da matriz, devido a elevada temperatura atingida no sistema. A celulose microcristalina age como agente auxiliar de

combustão em amostras de natureza inorgânica, ou com alto teor de compostos inorgânicos, os quais não reagem com o O<sub>2</sub>, promovendo a volatilização dos analitos da matriz (HAN; KAISER; TÖLG, 1982; GENG *et al.*, 2008).

A quantidade de celulose adicionada à amostra não foi avaliada, pois optou-se por utilizar uma quantidade baseada no trabalho de Picoloto (2011). Assim, utilizou-se 250 mg de celulose juntamente com 250 mg de amostra (Fig. 16).



**Figura 16** - Comprimidos de resíduos (casca e cabeça) de camarão sem adição de celulose (a) e com adição de celulose (b).

Os resultados para bromo e iodo obtidos após a decomposição de comprimidos contendo somente casca e cabeça de camarão, ou casca e cabeça de camarão com adição de celulose, encontram-se apresentados na Tab. 5.

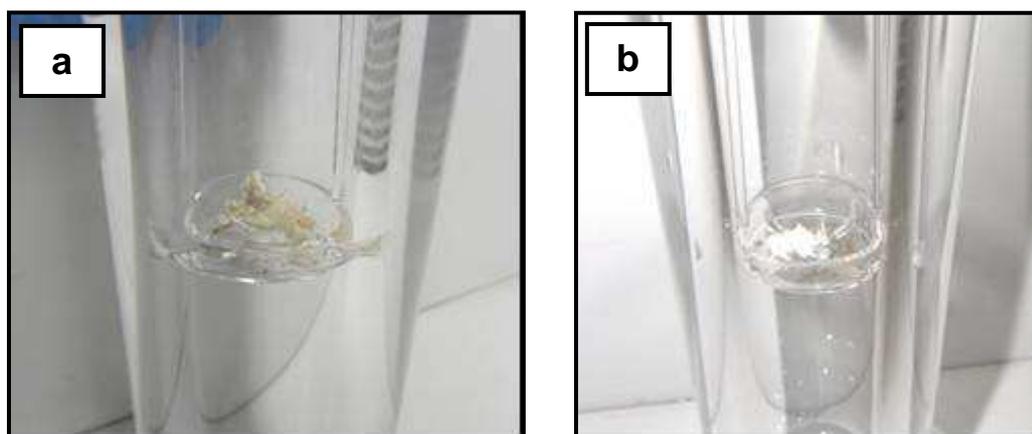
**Tabela 5** - Determinação de Br e I em amostras de casca de camarão e casca de camarão com celulose, por ICP-MS, após decomposição por MIC.

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	Bromo	Iodo
Casca de camarão	385,9 $\pm$ 3,5	11,7 $\pm$ 0,1
Casca de camarão + celulose	359,0 $\pm$ 13,7	10,2 $\pm$ 0,4

Cabe destacar que os resultados para Br e I obtidos nas amostras com e sem adição de celulose foram bastante semelhantes, apresentando, no entanto, maiores desvios para ambos os analitos quando houve a adição de celulose. Assim, pode-se

considerar que nas decomposições de casca de camarão, não há a necessidade de se acrescentar parcelas de celulose aos comprimidos de amostra, visto que foram obtidos resultados com baixos desvios na ausência desta.

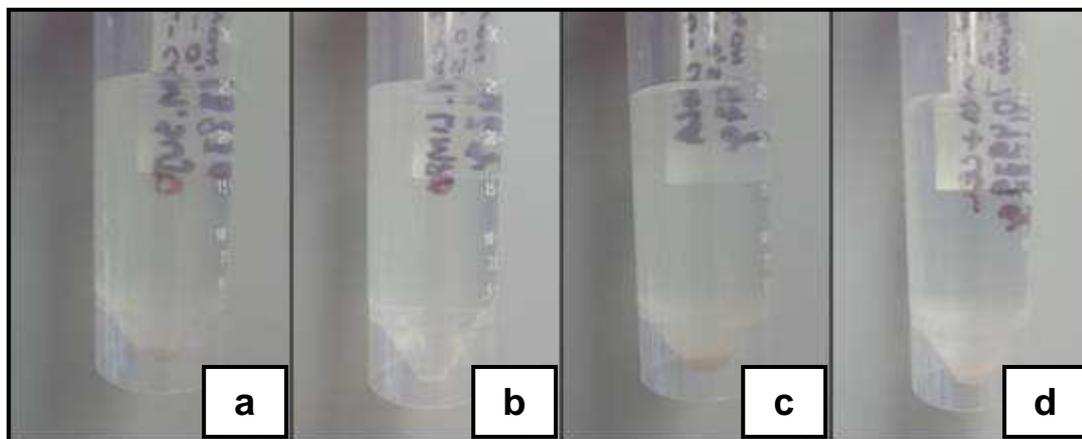
Como pode ser observado na Fig. 17 (a) e (b), após a decomposição por MIC, uma parcela da amostra não queima, deixando uma pequena massa de resíduo (aproximadamente 25% da massa do comprimido) no suporte. Contudo, embora o aspecto do resíduo seja ligeiramente alterado quando celulose foi adicionada à amostra, apresentando coloração mais esbranquiçada, os valores encontrados para Br e I foram concordantes com aqueles determinados nos comprimidos contendo somente amostra. Provavelmente, o resíduo seja constituído por componentes da casca, como carbonato de cálcio (GHINI; DOMINGUES; BETTIOL, 2006; ASSIS; STAMFORD; STAMFORD, 2008; MATHUR; NARANG, 1990) e/ou silicatos, que possivelmente se encontravam aderidos à casca.



**Figura 17** - Suporte contendo resíduo após a combustão de comprimido com somente casca de camarão (a) e de comprimido preparado com casca de camarão e celulose (b).

Na Fig. 18 são apresentadas as soluções obtidas das diferentes amostras, após a decomposição por MIC, utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  como solução absorvedora. Todas as soluções possuem aspecto límpido e não apresentam coloração. Apenas nas soluções obtidas com a decomposição dos resíduos de casca e cabeça de camarão, com ou sem a adição de celulose, é verificada a presença de resíduo pós-queima depositado no fundo do frasco de polipropileno. Este resíduo é o mesmo mostrado

na Fig. 17, quando se encontra ainda no suporte. Contudo, este resíduo pode ser separado previamente a etapa de determinação, não interferindo na mesma.



**Figura 18** – Soluções obtidas após decomposição por MIC utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$  como solução absorvedora: camarão com casca (a), camarão sem casca (b), casca de camarão (c) e casca de camarão com parcela de celulose (d).

Além disso, cabe destacar que analisando este novo lote as concentrações de Br ( $24,50 \pm 1,78 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e I ( $0,63 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ ), para a amostra de camarão sem casca, foram superiores às encontradas no lote anteriormente avaliado (Br =  $17,55 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ , e I =  $0,28 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Isto evidencia que existem diferenças com relação aos teores destes elementos, provavelmente relacionadas ao período em que as amostras foram adquiridas, e aos locais de cultivo. Tendo em vista esta constatação, provavelmente os teores de Br e I nos resíduos de casca e cabeça de camarão, referentes as amostras do lote anterior, teriam concentrações mais baixas do que as determinadas neste novo lote.

#### 4.3 Procedimento de extração alcalina com aquecimento em banho-maria

Além de avaliar a aplicabilidade da MIC para a decomposição de amostras de camarão visando a posterior determinação de Br e I por ICP-MS, procedimentos utilizando soluções alcalinas como meio extrator desses analitos também foram avaliadas.

Amostras de camarão com casca mantidas *in natura*, sendo apenas lavadas com água purificada e trituradas em processador doméstico, foram submetidas a procedimento de dissolução alcalina, segundo adaptações dos procedimentos descritos por Martins *et al.* (2002) e Rädlinger e Heumann (1998) (*vide item 3.7 – Materiais e Métodos*).

Os resultados obtidos na determinação dos analitos por ICP-MS, após os procedimentos de dissolução de cerca de 1 g de amostra com 0,5 e 1 ml de TMAH 25% (m/v), em temperaturas de 60 e 90 °C encontram-se dispostos na Tab. 6. Cabe destacar que estes resultados foram calculados de acordo com os teores de umidade determinados para a amostra de camarão com casca, de modo que estão expressos em base seca.

Como pode ser observado na Tab. 6, as concentrações de iodo utilizando a proporção 1 g de amostra e 1 ml de TMAH com aquecimento a 90 °C, por 30 min, foram concordantes em 97% para Br e 110% para I, com as concentrações obtidas por MIC. O RSD das medidas de iodo foi de 5,18%, inferior ao observado por MIC (8,40%). Contudo, para o analito Br, nas mesmas condições, o RSD da extração alcalina com aquecimento em banho-maria foi de 10,08%, sendo aproximadamente 5 vezes superior ao encontrado nas determinações por MIC (2,5%).

**Tabela 6** - Determinação de Br e I por ICP-MS, após extração alcalina em diferentes temperaturas, utilizando 1 g de camarão com casca (n=3).

Condições de preparo da amostra			Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (h)	Volume de TMAH (ml)	Bromo	Iodo
60	0,5	0,5	$74,1 \pm 6,0$	$5,6 \pm 0,4$
		1,0	$104,0 \pm 16,1$	$8,1 \pm 1,6$
	1,0	0,5	$83,3 \pm 6,8$	$5,8 \pm 0,5$
		1,0	$100,2 \pm 8,3$	$7,2 \pm 0,8$
	2,0	0,5	$83,5 \pm 7,0$	$5,8 \pm 0,6$
		1,0	$113,2 \pm 10,2$	$9,2 \pm 1,3$
90	0,5	0,5	$146,2 \pm 11,8$	$12,0 \pm 1,0$
		1,0	$176,1 \pm 17,8$	$12,3 \pm 0,7$
	1,0	0,5	$207,7 \pm 16,5$	$13,5 \pm 1,2$
		1,0	$217,9 \pm 18,0$	$14,1 \pm 1,5$
	2,0	0,5	$193,7 \pm 15,7$	$14,3 \pm 1,5$
		1,0	$182,3 \pm 14,7$	$14,1 \pm 1,2$

\*Valores obtidos por MIC para Br:  $182,4 \pm 4,2 \mu\text{g g}^{-1}$ , e I:  $11,3 \pm 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ .

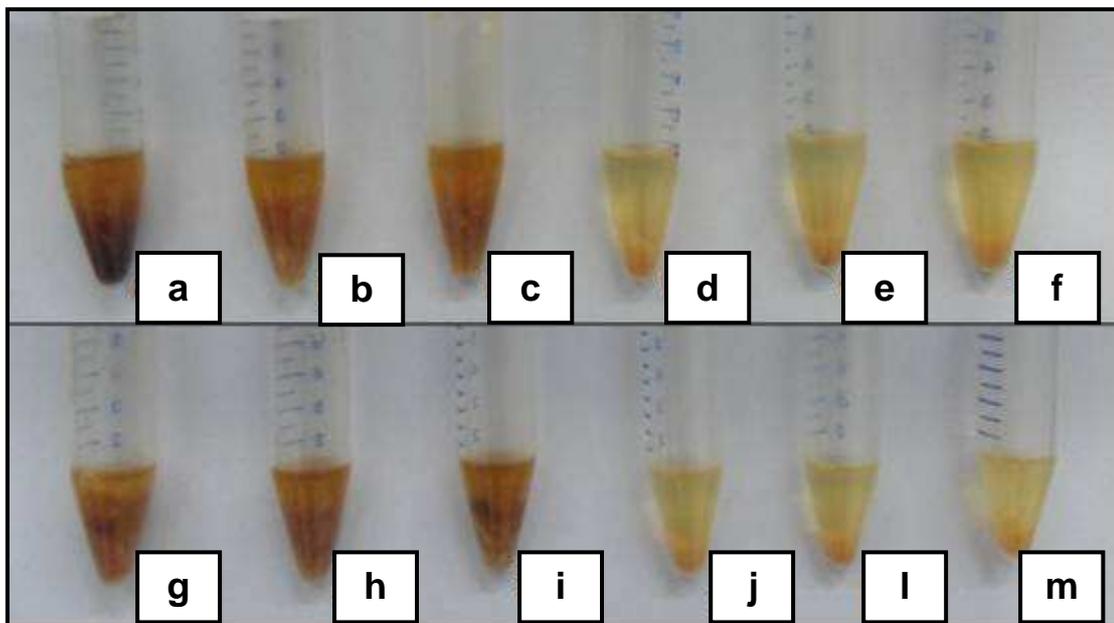
Concordâncias satisfatórias com os resultados obtidos pelos procedimentos por MIC também foram obtidas de formas individuais com outras condições de extração. Na proporção de 1 g de amostra e 0,5 ml de TMAH com aquecimento a 90  $^{\circ}\text{C}$ , por 30 min, foi obtida concordância de 105,7% para iodo, enquanto que na proporção de 1 g de amostra e 1 ml de TMAH com aquecimento a 90  $^{\circ}\text{C}$ , por 2 h, a concordância obtida para bromo foi de aproximadamente 100%.

As determinações para ambos os analitos, superiores às obtidas por MIC, observadas após alguns procedimentos de dissolução com TMAH, podem ser explicadas pelo excesso de carbono presente nas soluções analisadas. Isto porque, após o preparo de amostras orgânicas com TMAH a solução resultante apresenta uma alta concentração de compostos orgânicos, que podem vir a causar erros

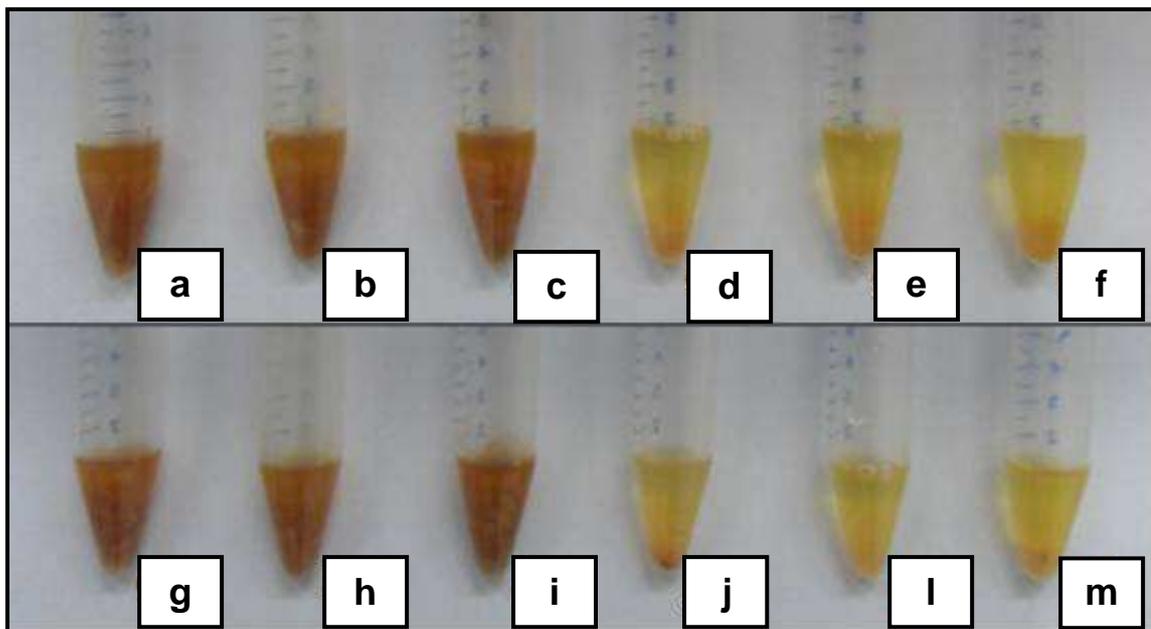
sistemáticos, influenciando na ionização dos analitos no plasma e, aumentando assim, o sinal obtido por ICP-MS (NÓBREGA *et al.*, 2006). Cabe enfatizar que utilizando esses procedimentos, não há decomposição da matriz da amostra, ao contrário do que acontece por MIC, onde praticamente toda a matéria orgânica é transformada em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, obtendo-se teores de carbono residual inferiores a 1% (FLORES *et al.*, 2004).

Além disso, este procedimento de preparo de amostra por extração com TMAH em banho-maria exigiu, além de etapa de centrifugação, sucessivas diluições (até 2000 vezes) a fim de ser analisado por ICP-MS devido à elevada concentração de matéria orgânica, o que acaba por diminuir a simplicidade do procedimento e piorar os LODs, conforme será apresentado a seguir.

Este procedimento foi também realizado para amostras de camarão sem casca. Entretanto, devido aos baixos teores de bromo e iodo nestas amostras, não foi possível a detecção dos analitos após a realização das sucessivas diluições que são necessárias, o que acaba por representar uma limitação do procedimento. As Figs. 19 e 20 apresentam os aspectos das soluções obtidas após os procedimentos de extração alcalina com aquecimento em banho-maria nas duas temperaturas (60 e 90 °C), nas amostras de camarão com e sem casca.



**Figura 19** – Soluções obtidas após extração alcalina com aquecimento em banho-maria a 60 °C, utilizando como solução extratora TMAH 25%. Condições para a proporção 1 g de amostra e 1 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (a), camarão com casca por 1 h (b), camarão com casca por 2 h (c), camarão sem casca por 30 min (d), camarão sem casca por 1 h (e), e camarão sem casca por 2 h (f). Condições para a proporção 1 g de amostra e 0,5 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (g), camarão com casca por 1 h (h), camarão com casca por 2 h (i), camarão sem casca por 30 min (j), camarão sem casca por 1 h (l), e camarão sem casca por 2 h (m).



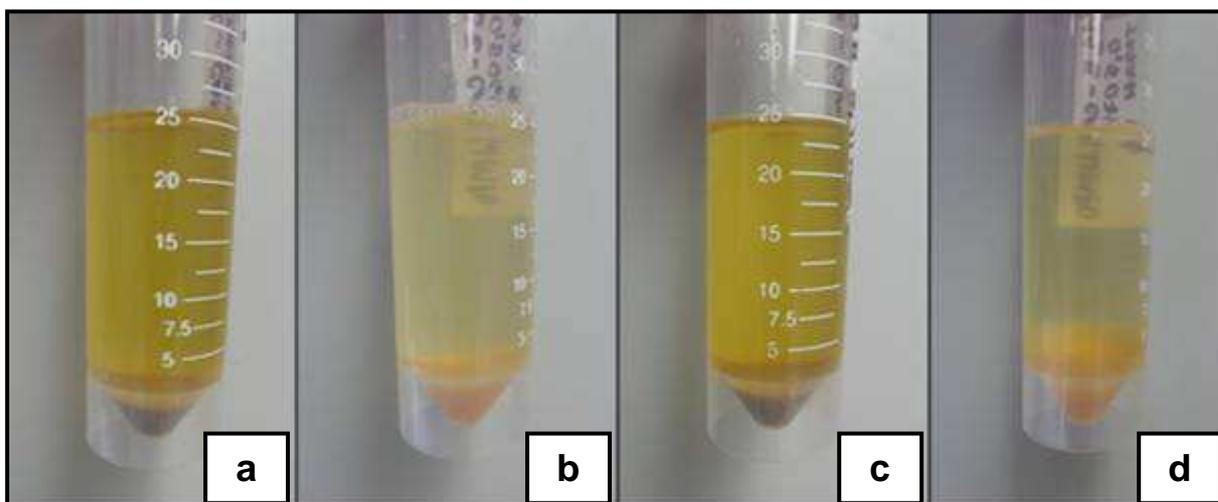
**Figura 20** – Soluções obtidas após extração alcalina com aquecimento em banho-maria a 90 °C, utilizando como solução extratora TMAH 25%. Condições para a proporção 1 g de amostra e 1 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (a), camarão com casca por 1 h (b), camarão com casca por 2 h (c), camarão sem casca por 30 min (d), camarão sem casca por 1 h (e), e camarão sem casca por 2 h (f). Condições para a proporção 1 g de amostra e 0,5 ml de solução extratora: camarão com casca por 30 min (g), camarão com casca por 1 h (h), camarão com casca por 2 h (i), camarão sem casca por 30 min (j), camarão sem casca por 1 h (l), e camarão sem casca por 2 h (m).

Como pode ser observado nas Figs. 19 e 20, as soluções tanto nas temperaturas de 60 e 90 °C apresentaram aspectos semelhantes tanto para camarões sem casca, quanto para camarões com casca.

#### 4.4 Procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas

Após avaliar o procedimento de decomposição de amostras de camarão por MIC e por extração alcalina com aquecimento em banho-maria, um terceiro procedimento de preparo de amostras visando a determinação de Br e I por ICP-MS, foi realizado.

Amostras de camarão com casca, camarão sem casca, e resíduos de casca e cabeça de camarão, foram submetidas à procedimento de extração alcalina, em sistema fechado e assistido por micro-ondas utilizando duas diferentes soluções extratoras: solução de TMAH  $0,11 \text{ mol l}^{-1}$ , cuja escolha se deve a estudos anteriores (MESKO, *et al.*, 2010), e solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$  (concentração escolhida após avaliação no procedimento por MIC). A extração foi realizada de acordo com procedimento descrito no item 3.8 (*Materiais e Métodos*).



**Figura 21** – Soluções obtidas após extração alcalina assistida por radiação micro-ondas, utilizando as soluções extratoras de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$ : camarão com casca (a) e camarão sem casca (b); e solução extratora de TMAH  $0,11 \text{ mol l}^{-1}$ : camarão com casca (c) e camarão sem casca (d).

Os resultados encontrados para bromo e iodo por ICP-MS após extração alcalina assistida por micro-ondas estão apresentados na Tab. 7, onde se pode verificar que os resultados obtidos para os analitos extraídos pelas diferentes

soluções foram bastante semelhantes, exceto nas amostras de casca de camarão, onde os resultados obtidos com a utilização de solução extratora de  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol l}^{-1}$  foram bastante inferiores àqueles obtidos quando se utilizou TMAH 0,11  $\text{mol l}^{-1}$  como solução extratora. Entretanto, se compararmos as determinações dos analitos após extração assistida por micro-ondas com os valores encontrados após decomposição por MIC, verifica-se que, segundo o teste *t* de Student, houve concordância apenas dos resultados obtidos para Br nas amostras de camarão sem casca, e para I nas amostras de camarão com casca.

**Tabela 7** – Determinação de Br e I em amostras de camarão com e sem casca, e em casca de camarão, por ICP-MS, após extração alcalina assistida por micro-ondas (n=3).

Amostra	TMAH 0,11 $\text{mol l}^{-1}$		$\text{NH}_4\text{OH}$ 50 $\text{mmol l}^{-1}$	
	Br ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	I ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Br ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	I ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Camarão com casca	116,2 ± 2,1	10,9 ± 0,2	119,4 ± 1,5	10,2 ± 0,3
Camarão sem casca	17,9 ± 0,5	0,22 ± 0,02	17,8 ± 0,2	0,22 ± 0,02
Casca e cabeça de camarão	259,6 ± 7,3	9,4 ± 0,1	120,3 ± 5,0	4,5 ± 0,54

Nas demais amostras, de camarão com casca e casca de camarão, os resultados encontrados para os analitos após o procedimento de extração mostraram-se inferiores àqueles determinados após a MIC. Este fato foi ainda mais visível nas amostras de casca de camarão, onde os resultados para ambos os analitos apresentam-se até 60% inferiores aos obtidos após a decomposição por MIC. Os resultados inferiores aos obtidos por MIC nas amostras que contém frações, ou são compostas em sua totalidade por casca, podem ser devido à uma extração ineficiente dos analitos neste tipo de material, provavelmente pela presença de materiais inorgânicos, pois ambas as soluções alcalinas empregadas na extração dos analitos, tem forte atuação sobre a fração orgânica dos materiais (NÓBREGA, *et al.*, 2006). Além disso, dentre as duas soluções extradoras utilizadas, o TMAH

mostra-se como um álcali mais forte e, portanto, com maior caráter extrator do que a solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , o que pode explicar os valores bastante inferiores na extração dos analitos das amostras de casca de camarão, quando  $\text{NH}_4\text{OH}$  foi utilizada. Contudo, cabe destacar que não foi feito nenhum estudo adicional com esta solução com o intuito de avaliar se concentrações mais elevadas não poderiam melhorar as recuperações para os analitos de interesse.

Desta forma, as amostras de casca de camarão evidenciaram-se matrizes complexas no que se refere à extração dos analitos, visto que a determinação dos mesmos torna-se mais difícil com o aumento da fração de casca na amostra.

#### **4.5 Comparação entre os diferentes procedimentos de preparo de amostras avaliados**

As amostras de camarão com casca, camarão sem casca e resíduos de casca e cabeça de camarão, quando submetidas a diferentes procedimentos de preparo de amostra, e posterior determinação por ICP-MS, apresentaram alguns resultados que diferem significativamente entre si no que se refere à quantificação de bromo e iodo.

A Tab. 8 compara os diferentes procedimentos de preparo de amostras utilizados a partir dos parâmetros tempo de preparo das amostras, tipo de amostra utilizada, reagentes empregados, e concentração dos analitos. Cabe ressaltar que no parâmetro tempo de preparo das amostras não é considerado o tempo utilizado na descontaminação dos materiais utilizados, limitando-se apenas ao tempo de preparo e resfriamento das amostras.

Como pode ser observado, os procedimentos de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas e extração alcalina sob aquecimento em banho-maria mostraram, na maioria das vezes resultados inferiores aos obtidos por MIC. Assim, estes procedimentos podem ser considerados pouco satisfatórios à determinação destes halogênios, tendo em vista que o procedimento de combustão iniciada por micro-ondas teve sua exatidão avaliada através da boa concordância com CRM e à realização de ensaios de recuperação com resultados bastante satisfatórios. Desta

forma, o procedimento por MIC pode ser considerado uma referência à comparação dos demais procedimentos.

**Tabela 8** – Comparativo entre os diferentes procedimentos de preparo de amostras.

Procedimento de preparo da amostra	Tempo de preparo das amostras (min)	Amostra	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
			Br	I
MIC ( $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$ )	25	Camarão com casca	$182,4 \pm 4,2$	$11,3 \pm 1,0$
		Camarão sem casca	$17,6 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,01$
		Resíduos de casca/cabeça de camarão	$385,9 \pm 3,5$	$11,7 \pm 0,1$
Extração assistida por radiação micro-ondas ( $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$ )	50	Camarão com casca	$119,4 \pm 1,5$	$10,2 \pm 0,3$
		Camarão sem casca	$17,8 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,02$
		Resíduos de casca/cabeça de camarão	$120,3 \pm 5,0$	$4,5 \pm 0,54$
Extração assistida por radiação micro-ondas ( $\text{TMAH } 0,11 \text{ mol l}^{-1}$ )	50	Camarão com casca	$116,2 \pm 2,1$	$10,9 \pm 0,2$
		Camarão sem casca	$17,9 \pm 0,5$	$0,22 \pm 0,02$
		Resíduos de casca/cabeça de camarão	$259,6 \pm 7,3$	$9,4 \pm 0,1$
Extração com aquecimento em banho-maria ( $\text{TMAH } 25\%$ )	50	Camarão com casca	$176,1 \pm 17,8$	$12,3 \pm 0,7$

O procedimento de preparo de amostras por extração alcalina sob aquecimento em banho-maria, apesar de não necessitar de equipamentos sofisticados, apresentou inconvenientes devido principalmente à utilização de solução de TMAH concentrada (25%). Este procedimento exige sucessivas dissoluções da solução da amostra antes de submetê-la à determinação por ICP-MS a fim de reduzir a presença de carbono orgânico no meio (ALLAH, 1991). Este aumento de sinal poderia explicar os resultados superiores àqueles obtidos após a decomposição por MIC, verificados após alguns procedimentos de dissolução com TMAH. Além disso, a necessidade de sucessivas diluições antes da determinação por ICP-MS dificulta a quantificação de elementos em baixas concentrações, o que implica em mais uma limitação a este procedimento de preparo de amostras.

A extração alcalina assistida por radiação micro-ondas apresenta vantagens sobre muitos métodos de preparo de amostras, principalmente pelo emprego de radiação micro-ondas e utilização de sistema fechado, evitando perdas e contaminações, além de possibilitar a extração simultânea de até 16 amostras. Entretanto, se comparada ao procedimento de decomposição por MIC, apresenta como principais desvantagens o emprego de um maior tempo na extração, a necessidade de diluições sucessivas previamente às determinações, e ser menos eficiente na decomposição de matrizes complexas, como no caso dos resíduos de casca e cabeça de camarão.

O procedimento de combustão iniciada por micro-ondas apresenta vantagens relacionadas à rapidez, quando comparado aos demais procedimentos de combustão citados na literatura (*vide itens 2.3.3 e 2.3.4 – Materiais e Métodos*), e eficiência da decomposição das amostras, até mesmo de matrizes complexas. Além disso, possibilita a escolha da solução absorvedora mais adequada aos analitos e à técnica de determinação. Além disso, a determinação dos analitos no CRM decomposto por MIC foi concordante com os valores certificados para Br e I, de forma que este procedimento pode ser considerado o mais adequado entre os avaliados.

#### 4.6 Brancos analíticos e limites de detecção

Uma das dificuldades de se determinar baixas concentrações de diversos elementos está relacionada com os elevados valores encontrados para os brancos, o que está diretamente relacionado com os limites de detecção obtidos pelo método utilizado. No procedimento de extração assistida por radiação micro-ondas utilizando solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , os valores para os brancos de Br e I foram inferiores a 6,0 e 0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente. Quando utilizou-se solução de TMAH os valores máximos de branco foram de 32,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  para Br e 2,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  para I. Os maiores valores encontrados para ambos os analitos nos brancos quando a solução extratora foi TMAH podem ser ocasionados pela presença de contaminantes neste reagente, devido a maior dificuldade de purificação do mesmo (NÓBREGA *et al.*, 2006).

No procedimento de extração alcalina com aquecimento em banho-maria, utilizando solução de TMAH, os valores de branco para Br e I foram inferiores a 64,5 e 0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente, enquanto que no procedimento por MIC foram obtidos os menores valores de branco, cujos valores máximos foram de 0,6  $\mu\text{g l}^{-1}$  para Br e 0,2  $\mu\text{g l}^{-1}$  para I. Cabe ressaltar que os melhores valores obtidos para os brancos utilizando a MIC podem estar relacionados ao uso de soluções de  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluídas.

Os limites de detecção obtidos nas determinações por ICP-MS, quando 500 mg das amostras foram decompostos por diferentes procedimentos de preparo, estão expressos na Tab. 9.

**Tabela 9** - Limites de detecção obtidos por ICP-MS após os diferentes preparos de amostras.

Procedimento de preparo da amostra	Amostra	Limite de detecção ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), 3s	
		Br	I
MIC ( $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$ )	Camarão com e sem casca	0,12	0,03
	Resíduos de casca e cabeça de camarão	1,80	0,45
Extração assistida por radiação micro-ondas ( $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$ )	Camarão com e sem casca	0,24	0,06
	Resíduos de casca e cabeça de camarão	1,92	0,48
Extração assistida por radiação micro-ondas (TMAH $0,11 \text{ mol l}^{-1}$ )	Camarão com e sem casca	0,24	0,06
	Resíduos de casca e cabeça de camarão	3,84	0,96
Extração com aquecimento em banho-maria (TMAH 25%)	Camarão com casca	5,9	0,8

Como pode ser observado na Tab. 9, os LODs tanto para Br como para I foram melhores nas decomposições por MIC, provavelmente devido a uma menor influência da matriz da amostra, resultando em menor necessidade de diluições quando comparado aos procedimentos de extração, mesmo levando em conta que as massas de amostra utilizadas nos diferentes procedimentos foram as mesmas. Cabe enfatizar que os LODs obtidos nas amostras de resíduos de casca e cabeça de camarão foram mais elevados devido a necessidade de maiores diluições ocasionadas pelas altas concentrações dos analitos, que acarretam em um pronunciado efeito de memória durante as determinações por ICP-MS.

Cabe destacar que nos procedimentos de extração existiu uma maior necessidade de diluir a amostra devido a presença da matriz. Mesmo comportamento foi observado quando os resíduos de casca e cabeça de camarão foram analisados após decomposição por MIC, onde a presença de resíduos da amostra e a concentração elevada dos analitos na solução de amostra exigiu maiores diluições da mesma a fim de se efetuar a determinação no ICP-MS.

#### 4.7 Estimativa da distribuição de Br e I em camarão

Tendo-se avaliado os teores de Br e I nas amostras de camarão com casca e camarão sem casca, pertencentes ao mesmo lote, foi feita uma estimativa da provável distribuição destes elementos no camarão inteiro. Primeiramente, foi calculada a concentração levando-se em consideração o teor de umidade determinado nas amostras (80 e 85% para as amostras de camarão com e sem casca, respectivamente), conforme apresentado na Tab. 10.

**Tabela 10** - Concentrações de Br e I nas amostras de camarão com e sem casca, determinadas por ICP-MS após decomposição por MIC, considerando o teor de umidade (n=3).

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	Br	I
Camarão com casca	36,49	2,26
Camarão sem casca	2,63	0,04

Posteriormente, foi feita uma estimativa da distribuição de Br e I, considerando-se a massa de um camarão em aproximadamente 6 g (média das massas de camarões “graúdos” e “miúdos”), e que 55% desta correspondem a massa corpórea (*vide item 4.1*). Assim, é possível estimar que, as concentrações para Br e I na massa corpórea, se situem em torno de 8,7  $\mu\text{g}$  e 0,13  $\mu\text{g}$ , respectivamente. Estes valores correspondem a aproximadamente 3,98% da concentração total de Br, e 0,97% da concentração total de I, determinadas no camarão inteiro. Assim, pode-se considerar que o percentual restante dos analitos esteja presente nos resíduos de

casca e cabeça de camarão. Entretanto, esta relação não pode ser comprovada tendo em vista que os analitos não foram determinados nos resíduos referentes a este lote. Cabe enfatizar que os valores determinados nos resíduos de casca e cabeça de camarão, apresentados no item 4.2, não puderam ser utilizados nesta avaliação, pois referem-se a um novo lote de amostra.

A diferença entre os diversos lotes de amostra utilizados pode ser enfatizada quando, no primeiro lote avaliado, a concentração de iodo em amostras de camarão sem casca foi de  $0,51 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ , enquanto que nos lotes seguintes as concentrações deste elemento foram de  $0,28 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,63 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Assim, para uma avaliação mais detalhada são necessárias análises de um número mais abrangente de lotes, permitindo verificar se existe relação entre período de aquisição de amostras, local de cultivo, entre outros fatores que podem influenciar na variação da concentração destes elementos.

Considerando os teores de Br e I nos camarões sem casca, pode-se enfatizar que estas concentrações estão abaixo dos limites de ingestão diária recomendados na dieta de adultos (Br =  $8000 \mu\text{g}$  (VAN DOKKUM *et al.*, 1989) e I =  $150 \mu\text{g}$  (WHO, 1996; ANVISA, 2011)). Entretanto, quando consideradas as concentrações obtidas para os mesmos analitos em camarões inteiros, verifica-se valores mais expressivos ( $218,9 \mu\text{g}$  para Br e  $13,6 \mu\text{g}$  para I, considerando-se um camarão com massa aproximada de 6 g), onde o consumo de cerca de 37 unidades seriam suficientes para alcançar as concentrações diárias recomendadas para Br, enquanto que para I, as recomendações diárias seriam atingidas com o consumo de apenas 11 unidades do crustáceo. Todavia, esta ingestão é pouco provável considerando-se que estes valores foram determinados incluindo os resíduos de cabeça e patas de camarão, os quais são geralmente consumidos separadamente, na forma de farinha. Além disso, é importante enfatizar que até o presente momento não foi feita uma avaliação das possíveis alterações que podem ocorrer nas concentrações destes elementos após serem submetidos a processos de cozimento.

Cabe destacar que os resultados expressos neste trabalho representam os valores médios de Br e I apenas para o lote estudado, sendo necessário que se faça uma avaliação mais abrangente de diversos lotes, considerando também variações de tamanho e de espécies.

Com base nestes resultados, destaca-se a importância deste estudo, o qual possibilita estimar informações referentes às concentrações de Br e I em camarões, favorecendo um maior controle das ingestões diárias destes analitos.

## 5 CONCLUSÃO

Dentre os procedimentos de preparo de amostras avaliados neste trabalho para a determinação de Br e I por ICP-MS em amostras de camarão, considera-se como mais adequado o procedimento de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas. Este procedimento é bastante seguro, além de proporcionar elevada frequência analítica, quando comparado aos demais procedimentos por combustão em sistema fechado, podendo ser feitas até oito combustões simultaneamente. Além disso, o tempo de decomposição por MIC é relativamente curto, sendo necessários apenas 25 minutos, incluindo a etapa de refluxo após a combustão. O procedimento de decomposição por MIC apresenta ainda as vantagens do uso de quantidades mínimas de reagentes, rapidez, segurança, eficiência de decomposição, possibilidade de escolha da solução absorvedora e da técnica de determinação.

Com relação aos resultados obtidos para Br e I após o procedimento de extração alcalina assistido por radiação micro-ondas, foi possível observar que apresentaram concordância com os resultados obtidos por MIC, apenas de forma individual, se utilizadas diferentes concentrações de soluções extratoras distintas. O mesmo acontece com a extração alcalina com aquecimento em banho-maria quando, se observadas certas condições de tempo e temperatura, proporcionam recuperações quantitativas dos analitos. Entretanto, para a utilização destes procedimentos é necessária uma etapa de centrifugação e diluições excessivas para eliminar a interferência da matriz.

Os resultados encontrados para Br e I na espécie de camarão avaliada permitiram estimar que os maiores teores destes analitos estão distribuídos nos resíduos de casca e cabeça de camarão, enquanto que na massa corpórea os teores são mínimos. Entretanto, ainda não foram realizados estudos que avaliem a permanência destes analitos na massa corpórea após as ações de preparo para o consumo. Contudo, pode-se comprovar que, mesmo em camarões cultivados em água doce, estes analitos estão presentes, ainda que em baixas concentrações.

Assim, a espécie de camarão avaliada constitui uma fonte natural de bromo e iodo, sendo estes elementos passíveis de serem determinados por ICP-MS após decomposição por MIC e, pelos demais procedimentos avaliados, se observadas as condições necessárias.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir deste estudo, novos trabalhos podem ser desenvolvidos visando determinar também as concentrações de Cl e F em amostras de camarão, avaliando-se os mesmos procedimentos de preparo de amostras utilizados neste trabalho. Além disso, outras técnicas de determinação, como cromatografia de íons e eletrodo de íons seletivos, também podem ser investigadas para a determinação dos halogênios. Ainda, estudos com relação às espécies químicas em que estes elementos se apresentam nas amostras também devem ser efetuados, bem como a avaliação da distribuição em diferentes frações destes crustáceos, como proteínas, gorduras e constituintes minerais.

Tendo em vista que informações referentes às concentrações de halogênios em camarões são relativamente escassas, enfatiza-se a importância da avaliação de diferentes espécies, origens e tamanhos, destes e de outros crustáceos, bem como o estudo da variação da concentração destes analitos após processos de cozimento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. Disponível em: < <http://www.abccam.com.br> >. Acesso em: 12 out. 2011.

AL-AMMAR, A.; REITZNEROVÁ, E.; BARNES, R. M.; Thorium and iodine memory effects in inductively-coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.370, p.479-482, 2001.

ALLAH, P.; Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry, **Analytical Chemistry**, v.63, p.1497, 1991.

ANTES, F. G. **Decomposição de coque, resíduo de vácuo e petróleo extrapesado por piroidrólise para a determinação de cloro**. 2007. 114f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

ANTES, F. G.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; Preparo de amostras de combustíveis fósseis por piroidrólise para a determinação de flúor e cloro, **Química Nova**, v.33, n.5, p.1130, 2010.

ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* (Booner, 1931) para produção de biofilme de quitosana, **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, n.5, p.480-499, 2008.

BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Trends in sample preparation using combustion techniques. In: ARRUDA, M. A. Z. **Sample preparation**. Nova Science Publishers, 2006. p.53-83.

CARTILHA SEMANA DO PEIXE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 26 set. 2011.

CASTRO, A. A.; PAGANI, G. D.; Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, n.2, p.123-129, 2004.

CHEN, J. H.; WANG, K.; JIANG, S. J.; Determination of iodine and bromine compounds in foodstuffs by CE-inductively coupled plasma MS. **Electrophoresis**, v.28, p.4227–4232, 2007.

CRESSEY, P. J.; Iodine content of New Zealand dairy products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.25-36, 2003.

DAMIN, I. C. F. **Investigação da amostragem direta para determinação de elementos traço em carne in natura e em petróleo usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2009. 112f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DAMIN, I. C. F.; SILVA, M. M.; VALE, M. G. R.; WELZ, B. Feasibility of using direct determination of cadmium and lead in fresh meat by electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes, **Spectrochimica Acta Part B**, v.62, p.1037-1045, 2007.

DUARTE, F. A.; PEREIRA, J. S. F.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.24, p.224-227, 2009.

ECKHOFF, K. M.; MAAGE, A.; Iodine content in fish and other food products from east Africa analyzed by ICP-MS. **Journal of food composition and analysis**, v.10, p.270-282, 1997.

FARROHA, S. M.; HABBOUSH, A. E.; Accuracy and sensitivity of the potentiometric determination of total sulphur in petroleum. **Analyst**, v.115, p.57-60, 1990.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Anvisa, 546 p., 1v., 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf)>. Acesso em: 17 out. 2011.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical Chemistry**, v.76, n.13, p.3526-3529, 2004.

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.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; KNAPP, G. Determination of Halogens in Coal after Digestion Using the Microwave-Induced Combustion Technique. **Analytical Chemistry**, v.80, p.1865-1870, 2008.

FUNG, Y.S.; DAO, K.L.; Oxygen bomb combustion ion chromatography for elemental analysis of heteroatoms in fuel and wastes development. **Analytica Chimica Acta**, v. 315, p. 347–355, 1995.

FUNG, Y.S.; DAO, K.L.; Elemental analysis of chemical wastes by oxygen bomb combustion ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 334, p. 51–56, 1996.

GÉLINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M. Determination of Total Iodine in Nutritional and Biological Samples by ICP-MS Following Their Combustion within an Oxygen Stream. **Analytical Chemistry**, v.70, p.1021-1025, 1998.

GENG, W.; NAKAJIMA, T.; TAKANASHI, H.; OHKI, A.; Determination of mercury in ash and soil samples by oxygen flask combustion method-cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CVAFS), **Journal of Hazardous materials**, v. 154, p. 325-330, 2008.

GHINI, R.; DOMINGUES, F.; BETTIOL, W. **Casca de camarão para o controle de Murcha de *Fusarium* em gengibre**. São Paulo: Embrapa, 2006. 3p. (Circular Técnica, 11).

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v.36, p.809-812, 2001.

HALDIMANN, A.; ALT, A.; BLANC, A.; BLONDEAU, K. Iodine content of food groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.461–471, 2005.

HALDIMANN, M.; WEGMÜLLER, R.; ZIMMERMANN, M.; Determination of iodine concentration in salt dual fortified with iron and iodine. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 96-98, 2003.

HAN, H. B.; KAISER, G.; TÖLG, G.; Decomposition of biological materials, rocks and soil with simultaneous volatilization of trace elements in pure oxygen under dynamic conditions, **Analytica Chimica Acta**, v. 134 p. 3-11, 1982.

HETZEL, B. S.; DUNN, J. T. The iodine deficiency disorders: Their nature and prevention. **Annual Review of Nutrition**, v.9, p.21-38, 1989.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. IV ed. Brasília: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008.

JOSEPH, K.; MAHLSTEDT, J.; GONNERMAN, R.; HERBERT, K; WELCKE, U. Early recognition and evaluation of the risk of hyperthyroidism in thyroid autonomy in an endemic goitre area. **Journal of molecular medicine**, v.4, p.21-37, 1980.

JULSHAM, K.; DAHL, L.; ECKHOFF, K. Determination of iodine in seafood by inductively coupled plasma/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v.84, p.1976–1983, 2001.

KNAPP, G.; Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration, **Mikrochimica Acta**, v. 2, p. 445-455, 1991.

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.

KOHLMEIER, M. **Nutrient metabolism**. Amsterdam: Academic press, 2003, 829 p.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A. A Sequência Analítica. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.1-12.

LUQUE-GARCIA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?. **TRAC Trends in Analytical Chemistry**, v.22, p.90-98, 2003.

MACDONALD, A. M. G. The Oxygen Flask Method, in: REILLEY, C. N. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, JohnWiley & Sons, 1965. p.75-116.

MAGALHÃES, C. E. C.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.184-251.

MANUAL DO CAMARÃO. Disponível em: <[www.icatubahia.com.br/anexo/ManualdoCamarao.pdf](http://www.icatubahia.com.br/anexo/ManualdoCamarao.pdf)> Acesso em: 07 out. 2011.

MARTINS, P.; POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; KEMIECIKI, G. A. Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v.470, p.195–204, 2002.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and Chitosan: versatile Polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v.67, n.11, p.938-942, 1990.

MELLO, P. A.; GIESBRECHT, C. K.; ALENCAR, M. S.; MOREIRA, E. M.; PANIZ, J. N. G.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Determination of Sulfur in Petroleum Coke Combining Closed Vessel Microwave-Induced Combustion and Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry. **Analytical Letters**, v.41, p.1623-1632, 2008.

MELLO, P. A.; PEREIRA, J. S. F.; MORAES, D. P.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Nickel, vanadium and sulfur determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry in crude oil distillation residues after microwave-induced combustion. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.24, p.911-916, 2009.

MESKO, M. F. **Combustão iniciada por microondas em sistema fechado para a decomposição de amostras biológicas**. 2004. 115f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; BARIN, J. S.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 2, p. 183-88, 2006.

MESKO, M. F. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímico e alimentos após combustão iniciada por microondas.** 2008. 156f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MESKO, M. F.; MELLO, P. A.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1125-1131, 2010.

MESKO, M. F.; HARTWIG, C. A.; BIZZI, C. A.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.307, p.123– 136, 2011.

MOREDA-PIÑEIRO, A.; ROMARÍS-HORTAS, V.; BERNEJO-BARRERA, P. A review on iodine speciation for environmental, biological and nutrition fields. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, p. 2107-2152, 2011.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v.16, p.37-45, 2006.

NÓBREGA, J. A.; GÉLINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R.; Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, p. 1243-1246, 1997.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Review: Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B**, v.61, p.465-495, 2006.

NOGUEIRA, A. R. A.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Decomposições assistidas por radiação micro-ondas. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar.** 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p.276-325.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.154-157, 2001.

PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; DUARTE, F. A.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion. **Journal of Chromatography A**, v.1213, p.249-252, 2008.

PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; MORAES, D. P.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G. FLORES, E. M. M. Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B**, v.64, p.554-558, 2009.

PEREIRA, J. S. F.; ANTES, F. G.; DIEHL, L. O.; KNORR, C. L.; MORTARI, S. R.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Microwave-induced combustion of carbon nanotubes for further halogen determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.25, p.1268–1274, 2010.

PerkinElmer-SCIEX, Elan Version 3.0, Software Guide, 1006920 A, 2003, Canadá.

PICOLOTO, R. S. **Determinação de elementos traço em solo por ICP-MS após volatilização empregando combustão iniciada por micro-ondas**. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.13, p.1101–1105, 1998.

PROGRAMA NACIONAL PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DOS DISTÚRBIOS POR DEFICIÊNCIA DE IODO. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 29 set. 2011.

RÄDLINGER, G.; HEUMANN, K. G.; Iodine Determination in Food Samples Using Inductively Coupled Plasma Isotope Dilution Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 11, p. 2221-2224, 1998.

REID, H. J.; BASHAMMAKH, A. A.; GOODALL, P. S.; LANDON, M. R.; O'COOR, C.; SHARP, B. L.; Determination of iodine and molybdenum in milk by quadrupole ICP-MS. **Talanta**, v. 75, p. 189-197, 2008.

RESOLUÇÃO - RDC nº 130, de 26 de maio de 2003. DOU de 28/05/2003. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/560356/dou-secao-1-28-05-2003-pg-48>> Acesso em: 29 set 2011.

ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1747-1752, 2011.

ROSE, M.; MILLER, P.; BAXTER, M.; APPLETON, G.; CREWS, H.; CROASDALE, M.; Bromine and iodine in 1997 UK total diet study samples. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 3, p. 361-365, 2001.

SCHRAMMEL, P.; HASSE, S.; Iodine determination in biological-materials by ICP-MS, **Mikrochimica Acta**, v. 116, p. 205-209, 1994.

SILVA, A. F.; GODOY, L. C.; FRANCO, M. L. R. S.; ASSIS, M. F.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; Avaliação sensorial e composição proximal de camarões de água doce *macrobrachium rosenbergii* defumados, **Ciência animal brasileira**, v. 11, n. 4, p. 770-774, 2010.

TAGAMI, K.; UCHIDA, S.; HIRAI, I.; TSUKADA, H.; TAKEDA, H.; Determination of chlorine, bromine and iodine in plant samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry after leaching with tetramethyl ammonium hydroxide under a mild temperature condition, **Analytica Chimica Acta**, v. 570, p. 88-92, 2006.

VAN DOKKUM, W.; DE VOS, R. H.; MUYS, TH.; WESSTRA, J.A. Minerals and trace elements in total diets in The Netherlands. **British Journal of Nutrition**, v. 61, p. 7-15, 1989.

VANHOE, H.; ALLEMEERSCH, F.; VERSIECK, J.; DAMS, R.; Effect of solvent type on the determination of total iodine in milk powder and human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry, **Analyst**, v. 118, p. 1015-1019, 1993.

VARGA, I. Iodine determination in dietary supplement products by TXRF and ICP-AES spectrometry. **Microchemical Journal**, v.85, p. 127-131, 2007.

VOBECKY, M.; BABICKY, A.; LENER, J. Effect of increased bromide intake on iodine excretion in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 55, p. 215-219, 1996.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva, 1996.

WU, S.; FENG, X.; WITTMEIER, A.; Microwave Digestion of Plant and Grain Reference Materials in Nitric Acid or a Mixture of Nitric Acid and Hydrogen Peroxide for the Determination of Multi-elements by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, **Journal of analytical atomic spectrometry** , v. 12, p. 797-806, 1997.