

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
AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE Br E I EM MEL POR
ICP-MS**

Vanize Caldeira da Costa

PELOTAS, RS

2013

Vanize Caldeira da Costa

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

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

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Foster Mesko

PELOTAS, RS

2013

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Desenvolvimento de métodos de preparo de amostra para a determinação de Br e I em mel por ICP-MS”, de autoria de Vanize Caldeira da Costa.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dra. Márcia Foster Mesko (Orientadora)

.....
Prof. Dra. Paola de Azevedo Mello - UFSM

.....
Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega - UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio Ricardo e Ana Cristina, por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida, e por serem meus exemplos de trabalho, honestidade, bondade e amor. Ao meu marido Filipe por toda a compreensão, incentivo e amor.

**"Cada pessoa deve trabalhar para o seu
aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva
por toda a humanidade."
(Marie Curie)**

AGRADECIMENTOS

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

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Márcia Foster Mesko** por todas as oportunidades, apoio, incentivo e orientação que, com certeza, ocasionaram o meu crescimento pessoal e profissional e, pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. **Joaquim de Araújo Nóbrega** pelas contribuições para este trabalho e pela participação como banca examinadora.

A Prof. Dra. **Paola de Azevedo Mello** 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 experimentos, e pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Aos integrantes do LAQIA (UFSM), em especial a **Rochele Sogari Picoloto e Sandra Meinen da Cruz**, por todo o apoio recebido na realização de análises.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, **Angélica S. dos Reis, Carla de A. Hartwig, Diogo La Rosa Novo, Filipe S. Rondan, Gilberto da Silva Coelho Junior, Helen Oliveira, Isis G. Toralles, Marcelo G. Crizel, Natanael Rodrigo X. Pires, Rodrigo M. Pereira e Thais Mazzetti** pelo apoio, amizade e colaboração prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

Agradeço ainda à minha família e amigos por toda a compreensão, apoio, incentivo e carinho, e a todos aqueles que de alguma forma me incentivaram e apoiaram durante esta importante etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Bromo e Iodo	18
2.2 Mel: Aspectos Gerais.....	20
2.3. Preparo de Amostras	23
2.3.1 Preparo de Amostra para Posterior Determinação de Halogênios.....	23
2.3.1.1 Preparo de Amostra com Soluções Alcalinas	25
2.3.1.2 Técnicas de Combustão em Sistema Fechado	26
2.3.1.2.1 Bomba de Combustão	26
2.3.1.2.2 Frasco de Combustão de Schöniger	29
2.3.1.2.3 Combustão Iniciada por Micro-ondas	31
2.3.1.3 Contribuição da Radiação Ultravioleta no Preparo de Amostras Orgânicas	34
2.4 Técnicas de Determinação de Halogênios.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Instrumentação	39
3.2 Reagentes	41
3.3 Materiais Diversos.....	43
3.4 Amostras.....	43
3.5 Determinação do Teor de Umidade	45
3.6 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado	45
3.7 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas e Ultravioleta em Sistema Fechado	46
3.8 Dissolução Alcalina com Aquecimento em Banho-Maria.....	47
3.9 Decomposição por MIC	47

3.10 Determinação dos Analitos por ICP-MS	50
3.11. Determinação do Teor de Carbono Residual.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Determinação do Teor de Umidade	53
4.2 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado	54
4.3 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas e Ultravioleta em Sistema Fechado	57
4.4 Dissolução Alcalina com Aquecimento em Banho-Maria.....	59
4.5 Decomposição por MIC	61
4.5.1 Otimização da Massa de Amostra	62
4.5.2 Programa de Irradiação com Micro-ondas	67
4.5.3 Otimização da Solução Absorvedora para Br e I	68
4.6 Comparação entre os Diferentes Procedimentos de Preparo de Amostras	75
4.7 Brancos e Limites de Detecção	76
4.8 Determinação de Br e I em Méis de Diferentes Origens	80
5. CONCLUSÃO	82
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	96

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Programa de irradiação empregado para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas.....	46
Tabela 2 - Programa de irradiação empregado na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado...	47
Tabela 3 Programa de irradiação empregado na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado....	48
Tabela 4 - Parâmetros operacionais para a determinação de Br e I por ICP-MS.....	50
Tabela 5 - Parâmetros operacionais para a determinação de C por ICP OES.....	51
Tabela 6 - Massas de celulose que devem ser empregadas para combustão de 400 a 1000 mg de mel.....	65
Tabela 7 - Determinação de Br e I em material de referência (NIST 8435), por ICP-MS, após decomposição por MIC, utilizando NH_4OH 50 e 100 mmol l^{-1} , como solução absorvedora (n=3).....	71
Tabela 8 - Recuperações de Br obtidas por ICP-MS, após a adição do RM NIST 8414 nas amostras de mel e decomposição por MIC empregando NH_4OH nas concentrações de 50, 75 e 100 mmol l^{-1}	72
Tabela 9 Limites de detecção obtidos por ICP-MS após MIC empregando como solução absorvedora NH_4OH 50 mmol l^{-1} , para 500 e 1000 mg de amostra.....	77
Tabela 10 - Concentração de Br e I nas diferentes amostras de mel avaliadas após decomposição por MIC e, subsequente determinação por ICP-MS (n=3).....	80

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Bomba de combustão (adaptado de Flores <i>et al.</i> , 2007).....	27
Figura 2 - Frasco de combustão de Schöniger (adaptado de Flores <i>et al.</i> , 2007).....	29
Figura 3 - Frasco de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas (MESKO, 2008).....	32
Figura 4 - Suporte de quartzo utilizado na MIC (adaptado de Mesko, 2004).....	33
Figura 5 - Sistema comercial para a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (FERREIRA, 2013).....	35
Figura 6 - Forno de micro-ondas comercial Multiwave 3000 [®] (a), rotor equipado com 8 frascos de quartzo utilizados para a decomposição de amostras (b), frasco de quartzo (c) e frasco de PTFE (d).....	39
Figura 7 - Dispositivo de quartzo utilizado na MIC como suporte para as amostras.....	40
Figura 8 - Lâmpada de radiação ultravioleta e discos de PTFE (a) e frasco de quartzo com a lâmpada devidamente posicionada (b).....	40
Figura 9 - Invólucros contendo a amostra e celulose microcristalina.....	45
Figura 10 - Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de mel para subsequente determinação de Br e I por ICP-MS.....	49
Figura 11 - Aspecto das soluções obtidas após 500 mg de mel terem sido preparados por dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado, utilizando NH ₄ OH 50 mmol l ⁻¹ (a), NH ₄ OH 100 mmol l ⁻¹ (b); e TMAH 0,11 mol l ⁻¹ (c).....	55

- Figura 12.-** Frasco de quartzo contendo a lâmpada UV, a amostra e a solução utilizada para a dissolução da mesma..... 57
- Figura 13 -** Aspecto das soluções obtidas após 500 mg de mel terem sido preparados por dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta em sistema fechado, utilizando NH_4OH 50 mmol l^{-1} (a), NH_4OH 100 mmol l^{-1} (b); e TMAH 0,11 mol l^{-1} (c)..... 58
- Figura 14 -** Aspecto das soluções obtidas após dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria, utilizando TMAH 25%. Condições empregadas nas dissoluções de 1 g de amostra a 60 °C: 1 ml de TMAH (30 min) (a), 1 ml de TMAH (1h) (b), 1 ml de TMAH (2 h) (c), 0,5 ml de TMAH (30 min) (d), 0,5 ml de TMAH (1 h) (e), e 0,5 ml de TMAH (2 h) (f). Condições empregadas nas dissoluções de 1 g de amostra a 90 °C: 1 ml de TMAH (30 min) (g), 1 ml de TMAH (1h) (h), 1 ml de TMAH (2 h) (i), 0,5 ml de TMAH (30 min) (j), 0,5 ml de TMAH (1 h) (k), e 0,5 ml de TMAH (1 h) (l)..... 60
- Figura 15 -** Aspecto das soluções após a decomposição de diferentes massas de mel por MIC com pressão de 20 bar de O_2 no sistema. 100 mg (a), 150 mg (b), 200 mg (c), 250 mg (d), 300 mg (e) e 350 mg (f)..... 63
- Figura 16 -** Aspecto da solução obtida após a decomposição de 400 mg de mel por MIC, com pressão de O_2 de 25 bar..... 63
- Figura 17** Aspecto da solução absorvedora e do sistema de decomposição após a decomposição de 1000 mg de mel por MIC, com 20 bar de O_2 no sistema..... 64
- Figura 18 -** Pressões atingidas após a combustão de massas de 200 a 1000 mg de mel, com pressão inicial de 20 bar de O_2 (n = 1)..... 67
- Figura 19 -** Recuperações de ■ Br e ■ I obtidas em amostras de mel, por ICP-MS, após MIC, utilizando diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e NH_4OH como solução absorvedora (massa

de amostra = 500 mg, n=3).....	69
Figura 20 - Aspecto da solução obtida após decomposição de mel por MIC utilizando NH_4OH 50 mmol l^{-1} como solução absorvedora (massa de amostra: 500 mg; pressão de O_2 : 20 bar).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC - *Association of Analytical Communities*

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

EDXRF – fluorescência de raios-X por dispersão de 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*

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

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INAA – análise instrumental por ativação neutrônica, do inglês *instrumental neutron activation analysis*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

PEAD – polietileno de alta densidade

PTFE – politetrafluoretileno

RCC – teor de carbono residual, do inglês *residual carbon content*

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

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: Desenvolvimento de métodos de preparo de amostra para a determinação de Br e I em mel por ICP-MS

Autor: Vanize Caldeira da Costa

Orientadora: Dr. Márcia Foster Mesko

Métodos envolvendo a dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria, ou assistidos por radiação micro-ondas e ultravioleta, bem como a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foram aplicados para o preparo de amostras de mel para a posterior determinação de Br e I por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Diferentes tipos e concentrações de soluções foram avaliadas, com o intuito de selecionar as soluções mais adequadas para cada procedimento estudado. Os métodos baseados na dissolução alcalina não foram adequados, tendo em vista que a concentração dos analitos na amostra estava abaixo dos limites de detecção (LODs) obtidos (LODs $\geq 700 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Br e LODs $\geq 326 \mu\text{g kg}^{-1}$ para I). Todavia, cabe ressaltar que por meio da MIC foi possível decompor até 1000 mg de amostra. Para tanto, foi necessário utilizar celulose microcristalina como um auxiliar de combustão. Neste contexto, a celulose microcristalina contribuiu para que a reação de combustão ocorresse de um modo mais controlado, evitando a projeção da amostra e, garantido, consequentemente, a decomposição da mesma. Como solução absorvedora para Br e I foi escolhido NH_4OH 50 mmol l^{-1} . Nestas condições foram obtidas recuperações para Br e I entre 98 e 104% e, concordâncias com o RM NIST 8435 superiores a 98% para ambos os elementos. Além disso, a MIC, quando comparada aos demais procedimentos avaliados, permitiu a obtenção de baixos valores para os brancos e os melhores LODs para ambos os analitos (Br: $34 \mu\text{g kg}^{-1}$; I: $6 \mu\text{g kg}^{-1}$). Assim, a MIC foi adequada para decompor amostras de mel para a posterior determinação de Br e I por ICP-MS, e possibilitou observar que a concentração de Br varia de modo significativo quando méis de diferentes origens botânicas e/ou geográficas são avaliados. Contudo, esse comportamento não foi observado para o I, cujas concentrações encontravam-se abaixo do LOD.

Palavras-chave: preparo de amostras, bromo, iodo, mel, combustão iniciada por micro-ondas.

ABSTRACT

Title: Development of method for sample preparation for further determination of Br and I in honey by ICP-MS

Author: Vanize Caldeira da Costa

Supervisor: Dr. Márcia Foster Mesko

Methods involving alkaline dissolution with heating in a water bath, or assisted by microwave and ultraviolet radiation, as well as microwave induced combustion (MIC) were applied for sample preparation of honey for further determination of bromine and iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Different types and concentrations of solutions were evaluated in order to select a suitable solution for each procedure studied. Methods based in alkaline dissolution were not suitable taking into account that the concentrations of the analytes in the sample were below of the limits of detection (LODs) obtained ($\text{LOD} \geq 700 \mu\text{g kg}^{-1}$ for Br e $\text{LOD} \geq 326 \mu\text{g kg}^{-1}$ for I). However, through the MIC was possible to decompose up to 1000 mg of sample using microcrystalline cellulose as an auxiliary of combustion. In this context, microcrystalline cellulose contributes for the combustion reaction occurs of a more controlled way, avoiding the projection of the sample, ensuring the complete decomposition of the sample. As absorbing solution for Br and I was used $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$. In these conditions recoveries for Br and I between 98 and 104% were obtained and the agreement with informed values for the RM NIST 8435 was better than 98% for both elements. Furthermore, using MIC was obtained lower values for blanks and better LODs for both analytes (Br: $34 \mu\text{g kg}^{-1}$; I: $6 \mu\text{g kg}^{-1}$) when compared with other methods evaluated. Therefore, MIC was suitable for honey digestion for subsequent determination of Br and I by ICP-MS. In addition, using this method was possible to observe that concentrations of Br varied significantly when honeys of different botanical and/or geographical origins were analyzed. However, the same behavior was not observed for I, where the concentrations were below of the LOD.

Key-words: sample preparation, bromine, iodine, honey, microwave-induced combustion.

1 INTRODUÇÃO

O bromo é um elemento que não apresenta uma função fisiológica bem estabelecida uma vez que o seu mecanismo de ação no organismo é desconhecido (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2011). Entretanto, estudos têm associado o excesso ou a carência deste elemento a transtornos que trazem malefícios ao organismo humano (KOHLMEIER, 2003). Diferentemente do Br, o iodo apresenta uma importante função fisiológica, principalmente no que diz respeito ao funcionamento da glândula tireóide. Assim, cabe salientar que a deficiência ou o excesso deste elemento no organismo também pode resultar em transtornos à saúde humana (WHO, 1996). Desta forma, faz-se necessária a determinação da concentração de ambos os elementos em alimentos, tendo em vista que estes podem estar presentes nos mesmos de forma natural, como resultado de atividades antropogênicas ou, ainda, no caso do I, devido a sua adição na forma de suplemento (ROSE *et al.*, 2001; RÄDLINGER; HEUMANN, 1998; VANHOE *et al.*, 1993). Dentre os alimentos que devem ter a concentração de Br e I monitorada cabe destacar o mel, que desde a pré-história é consumido como alimento e para fins terapêuticos (ALLSOP; MILLER, 1996; PERALTA; KOBLITZ, 2011). O mel é um produto amplamente produzido no Brasil, e o estado do Rio Grande do Sul é um dos maiores produtores do país, sendo responsável por cerca de 17% da produção nacional (IBGE, 2011). Assim, o controle da qualidade deste alimento é de grande relevância e, tendo em vista os aspectos acima mencionados, o conhecimento dos teores de Br e I podem ser considerados.

Para a determinação de Br e I em alimentos, faz-se necessário o desenvolvimento de um preparo de amostras adequado. Segundo Antes *et al.* (2010), o preparo de amostras para posterior determinação de halogênios é um desafio atual, uma vez que esses analitos são voláteis e existe uma elevada possibilidade de ocorrer contaminação durante o preparo e a análise das amostras. Nesse sentido, diversos métodos de preparo de amostra envolvendo o uso de soluções alcalinas e técnicas de combustão, têm sido propostos com o intuito de obter soluções que forneçam recuperações quantitativas para Br e I e que, obviamente, sejam adequadas às técnicas de determinação (NÓBREGA *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2004).

Quanto às formas de determinação de halogênios, vale salientar que muitas técnicas vêm sendo empregadas para este fim. No entanto, a escolha da técnica de determinação mais adequada deve estar pautada pelo tipo de amostra e analito, bem como pela sua concentração (VARGA, 2007; KNAPP, 1998). Dentre as técnicas disponíveis, cabe destacar que a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) apresenta elevada seletividade e limites de detecção adequados, sendo apropriada para a determinação de elementos em nível de traços (KNAPP *et al.*, 1998).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação de diferentes métodos de preparo de amostra para a subsequente determinação de Br e I em mel, por ICP-MS. Para tanto, métodos envolvendo a dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria ou assistidos por radiação micro-ondas e ultravioleta, bem como a combustão iniciada por micro-ondas foram investigados. Para avaliar a exatidão dos métodos foram utilizados materiais de referência e foram feitos ensaios de recuperação dos analitos. As amostras analisadas foram adquiridas no comércio local de Pelotas/RS, Santa Maria/RS e Belo Horizonte/MG. Essas incluem méis produzidos no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, que são os dois maiores produtores de mel do Brasil.

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 as suas funções fisiológicas e à necessidade de determinação da concentração dos mesmos em alimentos. Na segunda parte, são discutidos alguns aspectos gerais sobre o mel, incluindo sua contribuição nutricional, principais atividades fisiológicas, dados sobre sua constituição química, bem como sobre a produção nacional. Em uma terceira parte é feita uma breve descrição sobre os métodos de preparo de amostras empregados para a determinação de halogênios, sendo dada maior atenção aqueles utilizados 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

Bromo e iodo são halogênios que podem estar presentes nos alimentos de forma natural, devido a sua ocorrência no meio ambiente, ou como resultado das atividades antropogênicas. Quanto ao iodo, este pode ser adicionado aos alimentos ou ao sal na forma de suplemento (ROSE *et al.*, 2001; RÄDLINGER; HEUMANN, 1998; VANHOE *et al.*, 1993).

O bromo não apresenta uma função fisiológica bem estabelecida, uma vez que o seu mecanismo de ação no organismo é desconhecido (ROMARÍSHORTAS *et al.*, 2011). Entretanto, alguns estudos relataram que o mesmo pode interferir no transporte de iodo para a glândula tireóide inibindo, assim, a função da mesma. Sob a forma de bromato (BrO_3^{2-}) pode apresentar um efeito carcinogênico (VOBECKY *et al.*, 1996; DEANGELO *et al.*, 1998; DELKER *et al.*, 2006). Quanto à deficiência de bromo, vale salientar que a mesma vem sendo associada ao retardo no crescimento e à insônia (KOHLMEIER, 2003). Por outro lado, o excesso encontra-se associado a dores de cabeça, broncoespasmos, distúrbios gastrointestinais, fadiga e tolerância reduzida a exercícios (KOHLMEIER, 2003). De acordo com VAN DOKKUM *et al.* (1989) doses diárias de 8 mg dia^{-1} de bromo parecem ser adequadas para jovens adultos. Dentre os alimentos, é possível destacar os grãos, as nozes, o sal marinho, os mariscos e os pães, como importantes fontes de bromo (KOHLMEIER, 2003).

O iodo é um elemento traço essencial à saúde humana e de animais, uma vez que desempenha um papel importante nos processos metabólicos (KNAPP *et al.*, 1998; VANHOE *et al.*, 1993). Ainda, participa da síntese dos hormônios da tireóide, bem como dos intermediários desses hormônios (KNAPP *et al.*, 1998; CRESSEY, 2003). Tendo em vista que os hormônios da tireóide desempenham um papel relevante no crescimento e no desenvolvimento de humanos e animais, o iodo também passa a ser importante nesse contexto (WHO, 1996).

Os efeitos da deficiência de iodo conhecidos como, distúrbios de deficiência de iodo (IDD), podem ser observados em todas as fases de desenvolvimento. No entanto, são mais preponderantes em fetos e crianças,

por encontrarem-se em períodos de crescimento rápido. Os distúrbios de deficiência de iodo incluem o bócio endêmico, cretinismo endêmico, mortalidade infantil, infertilidade, aborto, retardo mental, problemas neuromusculares e nanismo (WHO, 1996). Em contrapartida, ingestões excessivas de iodo ocasionam hipertiroidismo e bócio endêmico (WHO, 1996). De acordo com a World Human Organization (WHO) (1996), crianças devem ingerir diariamente cerca de 90 μg de iodo, enquanto adultos e crianças a partir de 12 anos devem ingerir cerca de 150 μg dia^{-1} . Importantes fontes naturais de iodo incluem peixes marinhos e frutos do mar (ECKHOFF; MAAGE, 1997).

No Brasil, o iodo vem sendo adicionado no sal de cozinha desde a década de 50 como uma estratégia para a redução dos efeitos ocasionados pela deficiência de iodo no organismo. No entanto, a quantidade de iodo adicionada ao sal vem sendo alterada em função das mudanças no padrão de alimentação do brasileiro, uma vez que o excesso desse elemento também ocasiona distúrbios. Segundo a WHO, para populações que ingerem em torno de 10 g dia^{-1} , a faixa de iodação do sal deve estar entre 20 a 40 mg kg^{-1} . Atualmente, a faixa de iodação do sal no Brasil foi alterada por meio da Resolução RDC nº 23 de 24 de abril de 2013, passando de 20 a 60 para 15 a 45 mg kg^{-1} .

Dentro desse contexto, cabe destacar a necessidade de obtenção de informações a respeito dos teores de iodo nos alimentos para, assim, avaliar outras fontes naturais de iodo, evitando que o limite adequado de ingestão desse nutriente seja ultrapassado. Alguns trabalhos presentes na literatura tem se preocupado com a determinação de bromo e iodo em alimentos. No trabalho de Rose *et al.* (2001), Br e I foram determinados em pães, produtos cárneos, peixes, ovos, vegetais, frutas, bebidas, produtos lácteos, entre outros alimentos. A concentração de Br nos diferentes alimentos investigados encontra-se entre 0,1 e 26 mg kg^{-1} , enquanto a concentração de I encontra-se em uma faixa de concentração mais baixa (0,03 a 1,3 mg kg^{-1}). Neste trabalho, as maiores concentrações de Br foram observadas em alimentos como nozes (26 mg kg^{-1}) e peixes (6,7 mg kg^{-1}). Em contrapartida, as maiores concentrações de I foram observadas em alimentos como peixes (1,3 mg kg^{-1}), ovos (0,48 mg kg^{-1}), produtos lácteos (0,42 mg kg^{-1}) e leite (0,32 mg kg^{-1}).

Outros trabalhos, relatados na literatura, também descreveram a determinação de iodo em alimentos como sal de cozinha (OLIVEIRA; NÓBREGA; PEREIRA-FILHO, 2012), leite, fórmulas infantis (BHAGAT *et al.*, 2009), fígado bovino, amido de milho, farinha de trigo, leite em pó (MESKO *et al.*, 2010), camarão (HARTWIG, 2012) e algas marinhas (ROMARIS-HORTAS; BERMEJO-BARRERA; MOREDA-PINEIRO, 2012).

Com respeito a determinação de Br em alimentos, cabe salientar que, embora escassos, alguns trabalhos visaram a determinação deste analito em amostras de mel. As técnicas utilizadas incluem a análise instrumental por ativação neutrônica (INAA) (ISKANDER, 1995) e a espectrometria de fluorescência de dispersão de raios-X (EDXRF) (GOLOB *et al.*, 2005; KROPF *et al.*, 2010). No trabalho de Golob *et al.* (2005) o teor de Br foi determinado em diferentes tipos de mel por EDXRF, onde os valores obtidos encontram-se entre 0,7 e 15 mg kg⁻¹. Entretanto, cabe salientar que para concentrações baixas, em torno de 0,7 mg kg⁻¹ os RSDs obtidos foram elevados (em torno de 15%). Esse comportamento está relacionado à técnica utilizada, que de acordo com Kropf *et al.* (2010) não é adequada para a determinação de elementos em concentrações menores que 1 mg kg⁻¹. Outros trabalhos também avaliaram a concentração de Br em alimentos como cogumelo (DI NARDA *et al.*, 2003), pimenta, tomate (BASO-SEJAS *et al.*, 2007), camarão (HARTWIG, 2012) e algas marinhas (ROMARIS-HORTAS; BERMEJO-BARRERA; MOREDA-PINEIRO, 2012).

2.2 Mel: Aspectos Gerais

O mel é um produto conhecido desde a pré-história e é elaborado pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores (mel floral), de secreções provenientes de partes vivas das plantas (exsudados) ou de excreções de insetos sugadores presentes nas plantas (mel de melato) (PERALTA; KOBLITZ, 2011). Pinturas de cerca de 10.000 anos indicam que o mel era muito valorizado pelos humanos e que era amplamente disponível e consumido durante esse período (ALLSOP; MILLER, 1996). Com respeito ao início da atividade apícola, vale mencionar que essa se deu a 2.400 anos antes da era

cristã no Egito, onde abelhas eram criadas em colméias de barro (PEREIRA, 2003). Posteriormente, essa atividade difundiu-se entre gregos e romanos (PERALTA; KOBLITZ, 2011). Durante esse período o mel foi empregado, principalmente, como adoçante, na conservação de alimentos (ALLSOP; MILLER, 1996) e como remédio para muitas enfermidades. Algumas aplicações do mel como remédio, documentadas há muito tempo, incluem sua utilização para a cicatrização de feridas, para o tratamento de doenças nos olhos, em queimaduras, como vermífugo e para o tratamento de doenças respiratórias, gástricas e intestinais (CHEPULIS, 2008).

O Brasil, em 2006, ocupou o quinto lugar no *ranking* mundial de exportação de mel e foi considerado o 11º produtor mundial (PERALTA; KOBLITZ, 2011). Segundo pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Rio Grande do Sul é o maior produtor de mel do Brasil, sendo responsável, em 2011, por 16,8% da produção nacional de mel (cerca de 42 mil toneladas) (IBGE, 2011).

Em relação aos benefícios do mel para a saúde humana, estudos têm indicado que o mesmo pode apresentar atividade antimicrobiana, anti-inflamatória (LIU *et al.*, 2013; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008), antiviral (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008), antimutagênica (SAXENA *et al.*, 2012), antitumoral (FERNANDEZ-CABEZUDO *et al.*, 2013) e antioxidante (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008; KHALIL *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013). Essas atividades estão diretamente correlacionadas à composição química do mel.

O mel é constituído por uma mistura complexa de açúcares, na qual a frutose e glicose são os principais contribuintes (85% a 95% da matéria seca do mel) bem como, por outros constituintes minoritários, tais como, minerais, proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonóides, ácidos fenólicos e outras substâncias voláteis, responsáveis pelo aroma característico do mel (CHEPULIS, 2008; PERALTA; KOBLITZ, 2011). De um modo geral, o mel contém concentrações similares de glicose e frutose (PERALTA; KOBLITZ, 2011). Os açúcares remanescentes são praticamente constituídos por moléculas formadas por duas ou mais unidades de glicose e frutose (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007).

Variações na origem botânica e/ou geográfica do mel ocasionam algumas alterações na sua composição química e, por consequência, na sua aparência e percepção sensorial (BOGDANOV, 2008). Assim, muitos estudos têm buscado avaliar os teores de elementos majoritários e/ou minoritários com o intuito de utilizar essas informações na caracterização de méis segundo a sua origem geográfica e/ou botânica (ALDA-GARCILOPE *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2012; KROPF *et al.*, 2010; TERRAB; HERNANZ; HEREDIA, 2004). No entanto, outros estudos visam apenas o conhecimento do conteúdo mineral de um determinado mel com vistas na sua caracterização e na avaliação de sua qualidade (PONTARA *et al.*, 2012; ESCUREDO; SEIJO; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, 2011).

Contudo, é importante salientar que, embora investigações acerca do teor de halogênios como Br e I em alimentos sejam relevantes, poucos trabalhos avaliam o teor de halogênios no mel (RODRIGUEZ-OTERO, J. L. *et al.*, 1994; ISKANDER, F. Y., 1995; KROPF *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2012). Além disso, os métodos empregados, em geral, apresentam alguns inconvenientes, uma vez que, fazem o uso de ácidos concentrados, o que pode não ser adequado para a posterior determinação de halogênios (BATISTA *et al.*, 2012); utilizam técnicas que não apresentam limites de detecção que possibilitem a determinação de Br e I em nível de traços (KROPF *et al.*, 2010); envolvem a utilização de técnicas como a análise instrumental por ativação neutrônica (INAA) (ISKANDER, F. Y., 1995), que é disponível em poucos laboratórios, tendo em vista que seu custo é elevado; ou utilizam técnicas como a titulação potenciométrica que, apresentam pouca precisão quando aplicadas à determinação de elementos em nível de traços (RODRIGUEZ-OTERO *et al.*, 1994).

No Brasil, os requisitos mínimos de qualidade do mel destinado ao consumo humano são especificados pelo Ministério da Agricultura na Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 (Brasil, 2000). Internacionalmente, os critérios de qualidade do mel encontram-se compilados na Codex Alimentarius (BOGDANOV, 1999). Os parâmetros regulados por meio dessas normativas incluem, conteúdo de água, teor de açúcares, conteúdo de sólidos insolúveis, concentração de metais (As, Cd e Pb), acidez livre, atividade diastásica, teor de

hidroximetilfurfural, condutividade elétrica e concentração de alguns compostos (antimicrobianos; compostos halogenados e organoclorados; carbamatos; piretróides e organofosforados). Entretanto, não existem especificações que estabeleçam os teores máximos de Br e I em mel.

2.3. Preparo de Amostras

Com relação à determinação de metais e não metais, cabe destacar que com exceção das técnicas que permitem a análise direta de sólidos, a maior parte das técnicas de determinação requer que a amostra seja convertida em uma solução adequada (SNEDDON *et al.*, 2006). Dessa forma, faz-se necessária, previamente às análises, a aplicação de uma etapa de preparo de amostra.

O preparo de amostras é uma das etapas mais demoradas, de maior custo, e onde se cometem mais erros, os quais podem comprometer a exatidão alcançada na análise. Adicionalmente, cabe destacar que não existe um método de preparo de amostras que possa ser aplicado para diferentes tipos de matrizes, uma vez que, este depende do tipo de analito a ser determinado, da natureza da amostra, bem como da técnica de determinação empregada (KRUG; NÓBREGA, 2010).

2.3.1 Preparo de Amostra para Posterior Determinação de Halogênios

Como relatado anteriormente, devido à importância da determinação de halogênios como Br e I em alimentos, faz-se necessário o desenvolvimento de um método de preparo de amostras adequado para esse fim. Segundo Antes *et al.* (2010), o preparo de amostras para posterior determinação de halogênios é um desafio, uma vez que esses analitos são voláteis e existe uma elevada possibilidade de ocorrer contaminação durante o preparo e a análise das amostras.

Dentro desse contexto, cabe destacar que procedimentos de preparo de amostras que utilizam ácidos não são indicados para este fim, tendo em vista que, são formados compostos voláteis com os analitos, podendo, assim,

ocorrer perdas por volatilização (ANTES *et al.*, 2010). Adicionalmente, a utilização de ácidos concentrados pode ocasionar um aumento significativo dos brancos analíticos, além de requerer a realização de uma etapa de diluição, previamente à determinação, com o intuito de reduzir a concentração do ácido no meio (FLORES *et al.*, 2004).

De acordo com Nóbrega *et al.* (2006), o uso de reagentes alcalinos tem sido recomendado como uma alternativa para a preparação de amostras envolvendo um grupo apreciável de analitos em diferentes matrizes. Deste modo, este pode também constituir uma alternativa para o preparo de diferentes amostras visando à determinação de halogênios. Com respeito aos meios comumente empregados dentro deste contexto, pode-se destacar as soluções de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), aminas terciárias solúveis em água (CFA-C), bem como outras bases fortes (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Uma segunda alternativa para a decomposição das amostras visando à determinação de halogênios consiste na aplicação de técnicas baseadas na combustão. Nessas, as matrizes orgânicas são oxidadas pela ação direta do oxigênio sendo, assim, convertidas quase que na totalidade nos seus produtos de combustão (CO_2 e H_2O), o que minimiza as interferências durante a determinação dos analitos (FLORES *et al.*, 2007). Após a combustão, os analitos podem ser absorvidos em uma solução adequada a sua absorção e à técnica que será empregada para a sua determinação (MESKO, 2008).

Os métodos de decomposição que envolvem a combustão das amostras podem ser classificados em sistemas aberto, fechado ou dinâmico (KNAPP, 1991). Dentre esses, os que empregam recipientes fechados como, a bomba de combustão, o frasco de Schöniger e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), são os mais indicados quando se almeja a determinação de não metais (FLORES *et al.*, 2007).

Nesta revisão, serão abordadas com mais detalhes as técnicas de combustão em sistema fechado, em especial a MIC, bem como os métodos de preparo de amostra que utilizam soluções alcalinas. Adicionalmente, será feita uma breve descrição sobre a contribuição da radiação ultravioleta no preparo de amostras orgânicas, tendo em vista que, neste trabalho avaliou-se a dissolução alcalina sob a ação da radiação ultravioleta.

2.3.1.1 Preparo de Amostra com Soluções Alcalinas

Como mencionado anteriormente, de acordo com Nóbrega *et al.* (2006), os procedimentos de preparo de amostra que envolvem a utilização de soluções alcalinas podem ser empregados para a determinação de um grande número de analitos, o que inclui os halogênios, em uma ampla variedade de amostras. Adicionalmente, cabe destacar que o uso de meios alcalinos pode melhorar o desempenho de técnicas como a espectrometria de massa por meio da redução do efeito de memória ocasionado por alguns elementos, além de fornecer métodos relativamente simples, permitir a utilização da radiação micro-ondas e não ocasionar mudanças no estado de oxidação do(s) analito(s) (NÓBREGA *et al.*, 2006). Assim, o uso de soluções alcalinas no preparo de amostras tem se mostrado uma alternativa promissora frente a outros métodos de preparo de amostras como, os que utilizam ácidos concentrados.

O TMAH é um dos reagentes mais utilizados nos procedimentos envolvendo extração ou dissolução alcalina (NÓBREGA *et al.*, 2006). Esse reagente tem sido indicado para a solubilização de materiais biológicos contendo um teor significativo de gordura, previamente à determinação de analitos como I, Br, As, Cd e Sb por ICP OES, ICP-MS e GF AAS (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998). Dentro desse contexto, cabe salientar que um número expressivo de trabalhos relatados na literatura tem empregado o TMAH para este fim. Em geral, são empregados pequenos volumes do mesmo (≤ 1 ml) e a homogeneização é feita à temperatura ambiente ou sob aquecimento (MARTINS *et al.*, 2002; BATISTA *et al.*, 2007; CAMPILLO, *et al.*, 2010). No trabalho de BATISTA *et al.* (2007) TMAH foi empregado no preparo de amostras biológicas com vistas à determinação de elementos traço por ICP-MS. De acordo com os autores, o método proposto apresenta exatidão satisfatória, minimiza a possibilidade de perdas por volatilização e a ocorrência de contaminações e, é adequado ao ICP-MS. Essas vantagens também foram reportadas em outros trabalhos que atribuem aos métodos de preparo de amostras que utilizam TMAH características como, simplicidade e rapidez (MARTINS *et al.*, 2002; GHISI *et al.*, 2011).

No entanto, embora o TMAH apresente vantagens, devido à dificuldade envolvida na sua purificação, os brancos analíticos obtidos para Br e I após o preparo de amostra com o mesmo podem ser significativos (HARTWIG, 2012). Além disso, as soluções obtidas após o preparo de amostras orgânicas com o TMAH apresentam um teor de carbono residual (RCC) elevado, uma vez que, o mesmo não é capaz de decompor as amostras e apresenta carbono na sua constituição. Assim, sucessivas etapas de diluição devem ser realizadas previamente as determinações por ICP-MS (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Dentro desse contexto, soluções de amônia também têm sido utilizadas de um modo satisfatório para o preparo de amostras biológicas. No trabalho de VANHOE *et al.* (1993) soluções de amônia foram utilizadas no preparo de amostras de leite em pó e soro humano visando à determinação de I por ICP-MS.

Com relação ao uso de soluções alcalinas para o preparo de amostras de mel para posterior determinação de Br e I, cabe salientar que não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que relate essa aplicação.

2.3.1.2 Técnicas de Combustão em Sistema Fechado

2.3.1.2.1 Bomba de Combustão

Na bomba de combustão as amostras são decompostas na presença de excesso de oxigênio e os produtos gasosos gerados durante esse processo são absorvidos em uma solução adequada que se encontra no interior do sistema (MAGALHÃES *et al.*, 2010). Na Fig. 1 são apresentadas as principais partes que constituem a bomba de combustão, que é construída em aço.

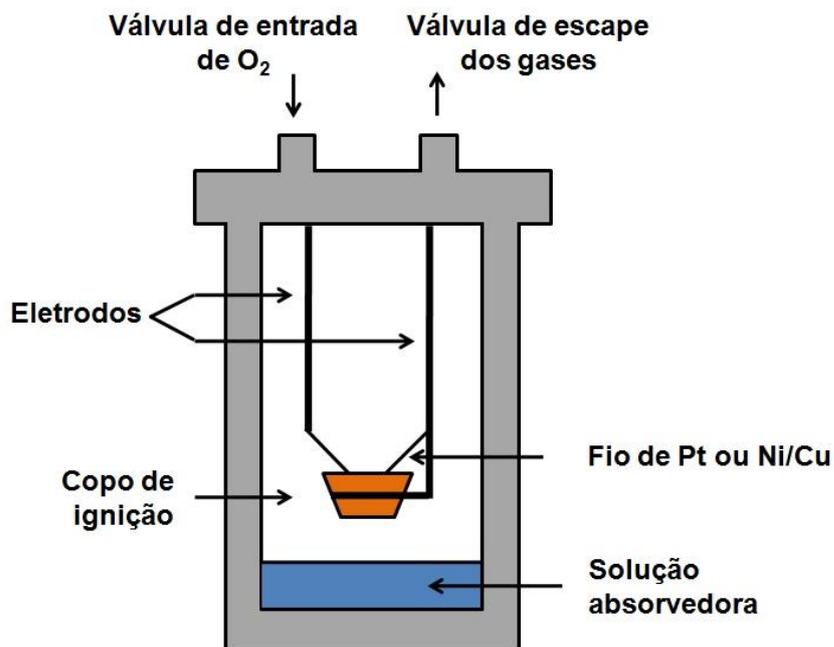


Figura 1. Bomba de combustão (adaptado de Flores *et al.*, 2007).

Para a decomposição das amostras neste sistema, as mesmas são preparadas na forma de comprimidos e posicionadas no copo de ignição. Um fio, geralmente de platina, é colocado em contato com a amostra e conectado a dois eletrodos para a subsequente ignição (FLORES *et al.*, 2007). Uma solução absorvedora, cujo volume geralmente varia de 5 a 10 ml, é utilizada na parte inferior do sistema que, após a introdução da amostra é fechado e pressurizado com oxigênio. A pressão de O_2 utilizada é da faixa de 20 a 30 atm (MAGALHÃES *et al.*, 2010). A ignição é feita pelo aquecimento do fio de platina e, assim, é dado início a reação de combustão (FLORES *et al.*, 2007). Após o resfriamento, que pode ser realizado por meio da submersão da bomba em água (SOUZA *et al.*, 2002) ou em um banho de gelo (ANDERSON, 1991; BELEVI *et al.*, 2000). Por fim, o sistema é aberto e a solução absorvedora é utilizada para a determinação dos analitos.

Dentro desse contexto, é importante salientar que, em alguns trabalhos que empregaram a bomba de combustão, foram utilizados auxiliares como amido (ARIKAWA, *et al.*, 1987), álcool (NARASAKI, 1985), óleos (NADKARNI & POND, 1983) e parafinas (SOUZA *et al.*, 2002) com o intuito de melhorar a eficiência da combustão da amostra.

A principal vantagem deste sistema encontra-se associada à massa de amostra que pode ser empregada (geralmente, maior que 0,5 g). Entretanto, esse método de combustão apresenta desvantagens que incluem a possibilidade de contaminação durante a decomposição visando à determinação de metais em nível de traços, tendo em vista que a bomba apresenta partes metálicas, dificuldades para a descontaminação e baixa frequência analítica (FLORES *et al.*, 2007).

Métodos utilizando a bomba de combustão foram desenvolvidos para muitos tipos de amostras visando à determinação, tanto de metais como, de não-metais. Em uma revisão publicada em 2007, encontram-se descritas diversas aplicações dessa técnica (FLORES *et al.*, 2007). Grande parte dos trabalhos que empregam a bomba de combustão visando a determinação de halogênios envolve a decomposição de carvão, bem como de outros combustíveis (MARTINEZ-TARAZONA & CARDIN, 1986; NADKARNI & POND, 1983; DOOLAN, 1987; FUNG & DAO, 1995; FUNG & DAO, 1996). Entretanto, no trabalho de SOUZA *et al.* (2002), amostras biológicas foram decompostas (até 500 mg) por meio da bomba de combustão para posterior determinação de I por ICP OES. Além desse halogênio, também foram determinados alguns metais (Ca, Cu, K, Mg, Na, P e Zn) e S. Neste trabalho, os autores demonstraram que a solução de CFA-C 10% (v/v), bem como a solução de HNO₃ 0,1% (v/v) são adequadas para a absorção dos elementos estudados, com exceção do I. No entanto, para a absorção de I, somente a solução de CFA-C 10% (v/v) mostrou-se adequada. Adicionalmente, cabe salientar que fez-se necessária a adição de um auxiliar de combustão (etanol ou parafina) para que as amostras de leite em pó fossem devidamente decompostas.

Outras aplicações da bomba de combustão para a subsequente determinação de halogênios incluem a decomposição de peças automotivas (CORTES-PENA *et al.*, 2002) e de resíduos de incineração (BELEVI & MÖNCH, 2000). No entanto, não foram encontrados relatos do uso deste sistema para a decomposição de mel.

2.3.1.2.2 Frasco de Combustão de Schöniger

Para a decomposição de uma amostra por meio do frasco de combustão de Schöniger (Fig. 2), a mesma deve ser envolvida em um papel com baixo teor de cinzas. Em um segundo momento, a amostra envolta no papel deve ser colocada em uma cesta de platina que se encontra fixada, normalmente, na tampa do frasco de decomposição. Assim, após ter sido adicionada a solução absorvedora e ter-se introduzido oxigênio gasoso no frasco, a amostra é, então, inserida. A ignição pode ser feita manualmente, eletricamente ou por meio de radiação no infravermelho. Após a ignição, o frasco é invertido para que a própria solução absorvedora auxilie a vedação do frasco, evitando perdas do analito por volatilização. A combustão é, geralmente, rápida e se completa entre 5 e 15 s (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Com relação à massa de amostra que pode ser empregada, cabe salientar que a mesma depende do volume do frasco e do tipo de amostra a ser utilizada (MAGALHÃES *et al.*, 2010). Entretanto, em geral, as massas de amostra empregadas não ultrapassam 100 mg quando frascos de até 1000 ml são utilizados (FLORES *et al.*, 2007).

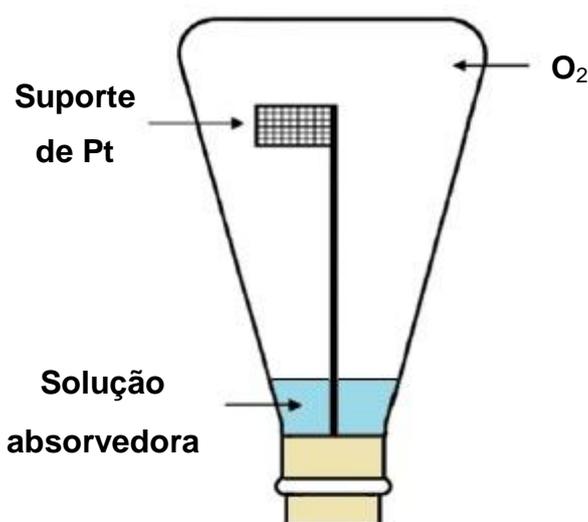


Figura 2. Frasco de combustão de Schöniger (adaptado de Flores *et al.*, 2007).

As vantagens do frasco de combustão de Schöniger incluem a velocidade com que as amostras são decompostas, a simplicidade do processo, uma vez que emprega materiais relativamente simples e baratos e, o baixo risco de perdas (MAGALHÃES *et al.*, 2010). Em contrapartida, apresenta desvantagens, tendo em vista que o uso de massas de amostra relativamente pequenas traz inconvenientes quando se deseja determinar elementos em nível de traços; possibilita a decomposição de apenas uma amostra por vez, o que compromete a frequência analítica; e mostra-se susceptível à contaminação associada ao material utilizado para envolver a amostra (MESKO, 2008; KNAPP *et al.*, 1998).

Com relação às desvantagens do frasco de combustão de Schöniger, Magalhães *et al.* (2010) são descritos ainda, a possibilidade de oxidação incompleta da amostra e de ocorrer evaporação de compostos voláteis antes da queima.

Muitos procedimentos envolvendo este método são descritos na literatura, onde, incluem o preparo de diferentes tipos de amostras, visando tanto à determinação de metais como a de não-metais. No entanto, cabe salientar que grande parte das aplicações envolve a subsequente determinação de não-metais, especialmente, de halogênios (FLORES *et al.*, 2007).

De acordo com o trabalho de FLORES *et al.* (2007), as principais aplicações do frasco de Schöniger para a subsequente determinação de I, incluem a decomposição de materiais biológicos e de compostos orgânicos, enquanto grande parte das aplicações deste método para Br incluem a decomposição de compostos orgânicos e polímeros.

Neste sentido, o trabalho desenvolvido por Knapp *et al.* (1998) constitui um exemplo de aplicação do frasco de combustão de Schöniger para a decomposição de materiais biológicos para a subsequente determinação de I. No trabalho de Knapp *et al.* (1998), 20 a 25 mg de amostras biológicas (leite em pó, plantas e tecidos) foram decompostos em um frasco de combustão com capacidade de 500 ml. A solução absorvedora utilizada nesse trabalho foi TMAH 0,5% e a determinação de iodo foi realizada por ICP-MS. As concordâncias obtidas pelos autores com os valores certificados foram

superiores a 93% indicando que o método é adequado para a determinação de I nas amostras avaliadas.

Com relação às aplicações do frasco de combustão de Schöniger, ainda cabe salientar que, embora este tenha sido aplicado a diversos tipos de amostra, não foram encontradas aplicações deste método para a decomposição de mel.

2.3.1.2.3 Combustão Iniciada por Micro-ondas

A combustão iniciada por micro-ondas (MIC), proposta por Flores *et al.* (2004), associa as vantagens da decomposição por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas, com as vantagens das técnicas de combustão em sistema fechado. Essas vantagens, incluem, baixos valores de branco, redução do tempo de preparo, uso de frascos de alta pressão, baixos valores de carbono residual, elevada massa de amostra, adequabilidade à determinação de não metais e uso de pequena quantidade de reagentes (MESKO, 2008).

Na MIC, a amostra é decomposta no interior de um frasco fechado pressurizado com oxigênio. Neste método, a ignição é promovida por meio da aplicação da radiação micro-ondas. Após a combustão os analitos são, então, absorvidos em uma solução adequada e uma etapa de refluxo pode ser aplicada por meio da continuação do programa de irradiação de micro-ondas. A aplicação de uma etapa de refluxo permite a obtenção de baixos desvios padrões relativos (RSDs) e recuperações quantitativas dos analitos (FLORES *et al.*, 2004). Para a realização do procedimento de combustão, um dispositivo de quartzo, que serve como suporte para a amostra, deve ser inserido no frasco de decomposição, de acordo com a Fig. 3.

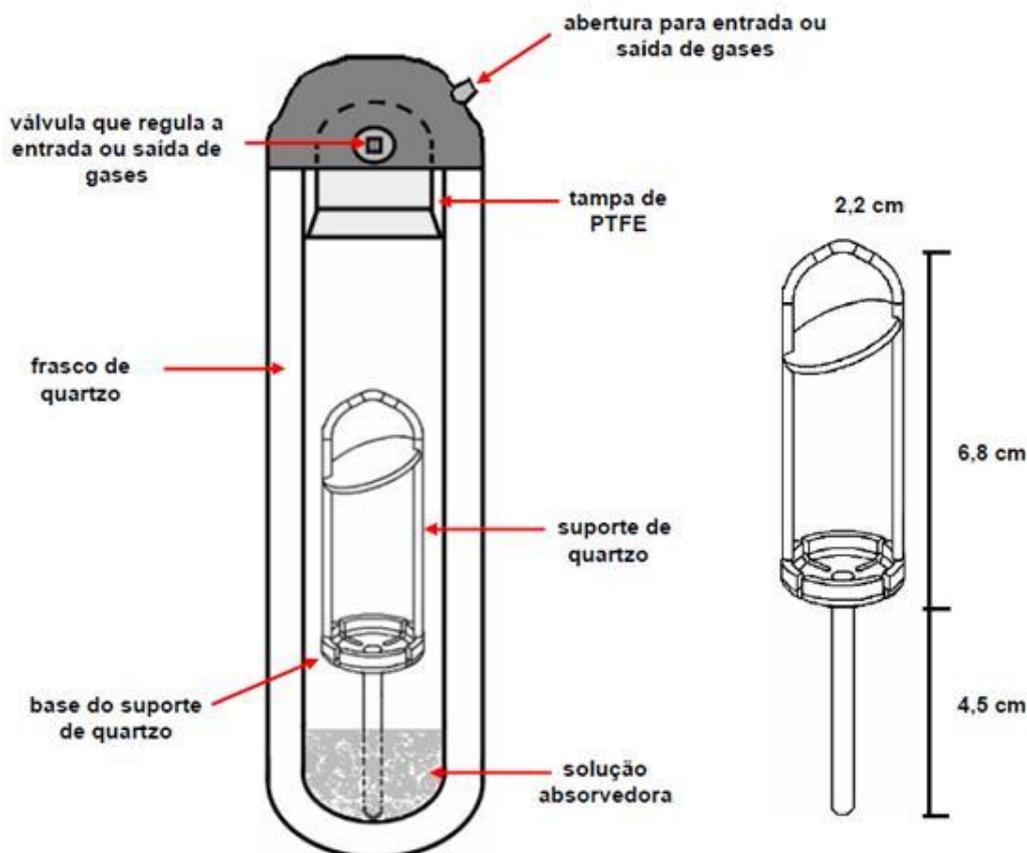


Figura 3. Frasco de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas (MESKO, 2008).

Com relação ao dispositivo de quartzo utilizado como suporte para a amostra, segundo Mesko (2008), o modelo mais adequado é o que fica suspenso na parte superior do frasco de decomposição (Fig. 4). Este apresenta na parte inferior ranhuras que permitem que ocorra um maior contato entre o oxigênio e a amostra e, na parte superior, um funil que permite a lavagem efetiva da base do suporte onde ocorre a combustão da amostra. Esse funil também tem a função de proteger a tampa do frasco de digestão da chama gerada durante a combustão (MESKO, 2008).

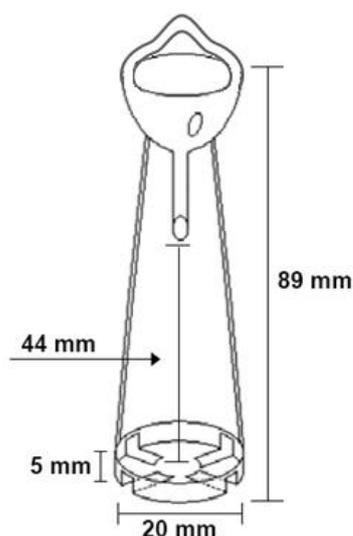


Figura 4. Suporte de quartzo utilizado na MIC (adaptado de Mesko, 2004).

Para que uma amostra sólida seja decomposta por MIC faz-se necessário que a mesma seja preparada na forma de um comprimido, o qual, em um segundo momento, é colocado sobre um disco de papel filtro, previamente posicionado sobre o suporte de quartzo, e contendo 50 μl de solução de nitrato de amônio 6 mol l^{-1} que, sob a ação da radiação micro-ondas, atua como o iniciador da combustão. Em seguida, o suporte é inserido dentro do frasco de decomposição contendo 6 ml da solução absorvedora (volume mínimo recomendado pelo fabricante do equipamento). Após o fechamento dos frascos com a tampa de PTFE, os mesmos são fixados ao rotor, pressurizados com oxigênio e levados ao forno micro-ondas, onde, serão submetidos à radiação que dará início ao processo de combustão. Após a ignição, temperaturas superiores a $1300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ geralmente são atingidas, garantindo a conversão de praticamente toda a matéria orgânica em seus produtos de combustão (FLORES *et al.*, 2004).

No caso de amostras líquidas, devido à impossibilidade de obtenção de comprimidos, estas podem ser acondicionadas no interior de invólucros produzidos a partir de filmes de polietileno (PEREIRA, 2007), para a posterior decomposição por MIC.

Outra vantagem inerente a MIC é a possibilidade do uso de soluções absorvedoras mais adequadas ao tipo de analito e à técnica de determinação. No caso da quantificação de halogênios, essa vantagem torna possível a

utilização de água ou soluções alcalinas para absorver os analitos (FLORES *et al.*, 2007), as quais são recomendadas para estes elementos, uma vez que não formam compostos voláteis com os mesmos (ANTES *et al.*, 2010).

De acordo com o que é relato na literatura, a MIC foi empregada para a subsequente determinação de halogênios em amostras com diferentes tipos de matrizes como, 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), nanotubos de carbono (PEREIRA, 2010), polímeros (MORAES *et al.*, 2010), tabaco (MÜLLER *et al.*, 2011) e ácidos húmicos (PEREIRA *et al.*, 2011). Entretanto, não existem relatos do uso da MIC para a decomposição de amostras como o mel, cuja matriz é rica em açúcares.

2.3.1.3 Contribuição da Radiação Ultravioleta no Preparo de Amostras Orgânicas

A radiação ultravioleta ($\lambda = 40$ a 400 nm) é capaz de formar compostos intermediários extremamente reativos, com uma elevada capacidade oxidante, a partir de compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996). Dessa forma, a sua aplicação no de preparo de amostras orgânicas passa a ser promissora, uma vez que a mesma pode contribuir para que o(s) analito(s) seja(m) disponibilizado(s) em solução, bem como decompor, parcialmente, a amostra, diminuindo assim o RCC.

Dentre as espécies reativas formadas pela ação da radiação ultravioleta podem ser citadas o oxigênio *singlete*, ozônio, radicais superóxidos e alquilperóxidos, peróxido de hidrogênio e íon persulfato (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996).

Alguns trabalhos relataram o emprego da radiação ultravioleta associada à radiação micro-ondas com o intuito de realizar a decomposição de amostras orgânicas em sistema fechado utilizando ácidos diluídos, e obtendo teores de carbono residual adequados à determinação de diversos elementos por ICP-MS (FLORIAN; KNAPP, 2001; LIMBECK, 2006; FERREIRA, 2013). Para tanto, no interior dos frascos de decomposição são inseridas lâmpadas de emissão

de radiação ultravioleta (Fig. 5), estas são ativadas pela radiação micro-ondas e agem de forma simultânea com a mesma. A lâmpada ultravioleta é construída em quartzo e apresenta em seu interior cerca de 1 mg de Cd, aproximadamente, 4 mbar de argônio e uma antena de molibdênio (FLORIAN; KNAPP, 2001).

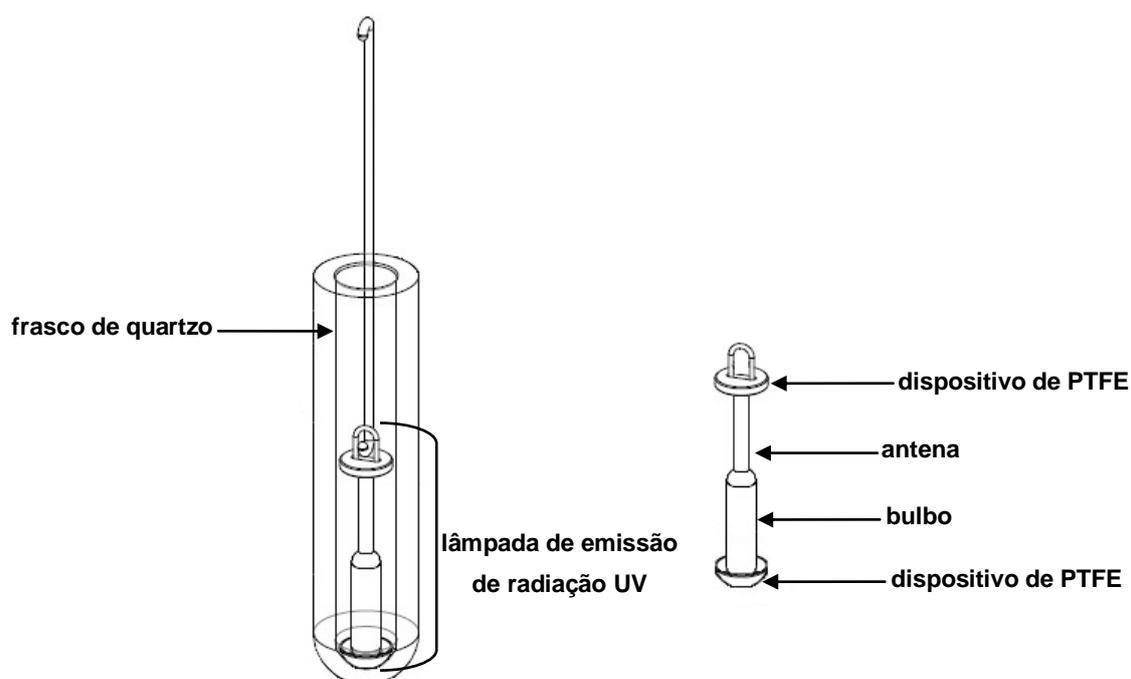


Figura 5. Sistema comercial para a decomposição por via úmida assistida por micro-ondas e ultravioleta (FERREIRA, 2013).

Embora os trabalhos que vêm sendo desenvolvidos com as lâmpadas ultravioletas estejam indicando resultados satisfatórios (FLORIAN; KNAPP, 2001; LIMBECK, 2006; FERREIRA, 2013), cabe destacar que, ainda não existem relatos na literatura de trabalhos que tenham avaliado o efeito da radiação UV em extrações ou dissoluções realizadas em meio alcalino. Provavelmente, nessa condição, a aplicação da radiação UV pode favorecer a ocorrência de transformações químicas e, com isso, contribuir para a obtenção de uma solução, onde os analitos encontram-se totalmente ou quase que na totalidade disponíveis para a análise.

2.4 Técnicas de Determinação de Halogênios

Muitas técnicas analíticas vêm sendo empregadas para a determinação de halogênios, dentre as quais se pode destacar, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a cromatografia de íons (IC), a potenciometria com eletrodo de íon seletivo (ISE), a espectrometria de fluorescência de dispersão de raios-X (EDXRF), a análise instrumental por ativação neutrônica (INAA) e os métodos titrimétricos. A escolha da técnica de determinação mais adequada, no entanto, deve estar sempre pautada no tipo de amostra, no analito a ser determinado, bem como na sua concentração (VARGA, 2007; KNAPP, 1998).

Dentre as técnicas empregadas para determinação de halogênios, a ICP-MS vem sendo amplamente utilizada devido a sua seletividade, sua capacidade multielementar e seus baixos limites de detecção (SCHRAMEL, HASSE, 1994; BETTINELLI *et al.*, 1995; KNAPP *et al.*, 1998). Entretanto, apesar de mesma apresentar uma série de vantagens, uma de suas principais limitações, quando empregada para determinação de halogênios, está relacionada à ocorrência de acentuado efeito de memória durante a determinação destes analitos, principalmente, bromo e iodo. Dentro desse contexto, a utilização de soluções alcalinas no preparo das amostras, além de evitar a volatilização dos elementos também previne possíveis efeitos de memória (VANHOE *et al.*, 1993; NÓBREGA *et al.*, 2006). Adicionalmente, cabe salientar que as soluções alcalinas também podem ser utilizadas na lavagem do sistema de introdução da amostra contribuindo, assim, para a redução do efeito de memória (MESKO *et al.*, 2010).

No entanto, a introdução direta de soluções contendo TMAH no plasma não é recomendada, tendo em vista que pode ocorrer o acúmulo de carbono na interface no espectrômetro (POZEBON, DRESSLER, CURTIUS, 1998) ocasionando, assim, interferências (BETTINELLI *et al.*, 1995).

Muitos trabalhos da literatura reportam o uso da ICP-MS para a determinação de Br e I em alimentos. No entanto, o único trabalho que reporta o uso dessa técnica para a determinação de iodo em mel não apresenta o teor

deste analito na amostra nem o limite de detecção obtido para o método proposto (BATISTA et al., 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

Os métodos de preparo de amostra avaliados para a subsequente determinação de Br e I por ICP-MS foram a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas, a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, a dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC),

Para os procedimentos de preparo de amostras envolvendo a dissolução alcalina foram estudadas diferentes soluções com o intuito de avaliar qual seria mais adequada para a dissolução das amostras e liberação dos analitos para posterior determinação por ICP-MS. Na dissolução alcalina em banho-maria também foram avaliados parâmetros como, temperatura e tempo de dissolução.

No procedimento de decomposição por MIC, foi avaliada a massa máxima de amostra que poderia ser utilizada sem o risco de um aumento excessivo de pressão durante a etapa de combustão. Adicionalmente, foram avaliadas diferentes soluções absorvedoras, com o intuito de selecionar a solução mais adequada para absorver os analitos.

Cabe ressaltar que as determinações de Br e I por ICP-MS foram realizadas 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, pois esse equipamento não está disponível para utilização na UFPel.

3.1 Instrumentação

Para o preparo das amostras através da dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas, da dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta e da MIC foi utilizado um forno de micro-ondas Multiwave 3000[®] (Anton Paar) (Fig. 6). No entanto, para o procedimento de dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas este sistema foi equipado com 8 frascos de politetrafluoretileno (PTFE), com um volume interno de 100 ml. Enquanto, para a MIC e para a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta foi usado o mesmo sistema equipado com 8 frascos de quartzo, com um volume interno de 80 ml.

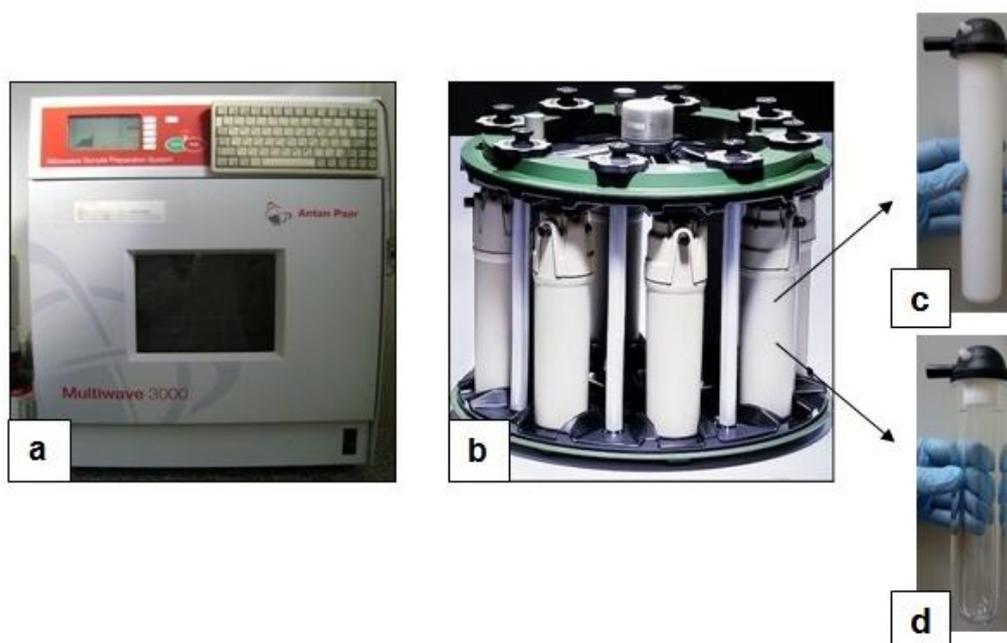


Figura 6. Forno de micro-ondas Multiwave 3000[®] (a), rotor equipado com 8 frascos de quartzo utilizados para a decomposição de amostras (b), frasco de quartzo (c) e frasco de PTFE (d).

Na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta foi utilizado no interior de cada frasco uma lâmpada de cádmio preenchida com argônio (Anton Paar) que, emite radiação ultravioleta ($\lambda = 228$) (Fig. 7). Para evitar o contato direto da lâmpada com o frasco de decomposição foi necessária a inserção de dois discos de PTFE, sendo um posicionado na parte

inferior e outro na parte superior da lâmpada, conforme pode ser observado na Fig. 7. Em contrapartida, na MIC um dispositivo de quartzo (Fig. 8) foi utilizado no interior dos frascos, servindo como suporte para as amostras, conforme proposto por Mesko (2004).

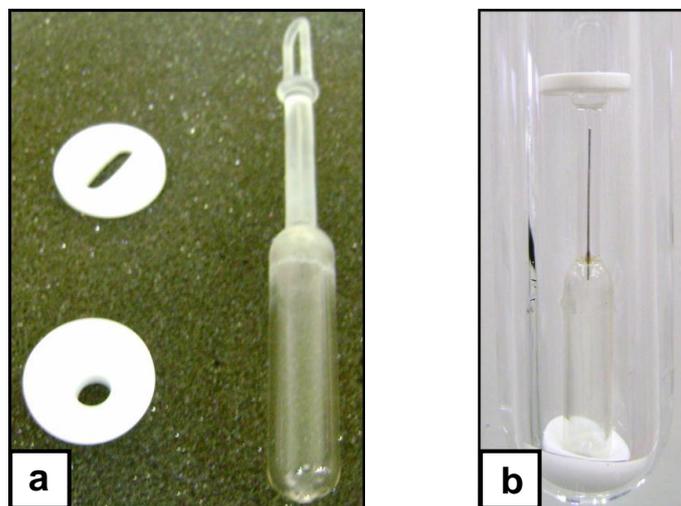


Figura 7. Lâmpada de radiação ultravioleta e discos de PTFE (a) e frasco de quartzo com a lâmpada devidamente posicionada (b).



Figura 8. Dispositivo de quartzo utilizado na MIC como suporte para as amostras.

As dissoluções alcalinas que não foram realizadas sob a radiação micro-ondas foram feitas com auxílio de um banho-maria (Thermomix[®], Modelo 18 BU, B. Braun Biotech International).

Um banho de ultrassom Unique (modelo USC – 1800 A), com frequência de 40 kHz, foi utilizado para a descontaminação do papel filtro usado como

auxiliar no processo de combustão, bem como para a descontaminação do invólucro das amostras.

As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma chapa de aquecimento IKA (modelo RH Basic 2), previamente aos procedimentos de preparo, uma vez que, a solubilização da amostra a 60 °C por 30 min fez-se necessária devido à presença de cristais na mesma.

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica Marte (modelo AY220, Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

Para a determinação de bromo ($m/z = 79$) e iodo ($m/z = 127$) por ICP-MS foi empregado um espectrômetro (Elan DRC II, PerkinElmer SCIEX) equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates), uma câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion, Inc.) e uma tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc.), com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.).

O teor de carbono residual nas soluções obtidas após a decomposição das amostras por MIC foi determinado por ICP OES, utilizando um espectrômetro com configuração axial (PerkinElmer, modelo Optima 4300 DV, Shelton, CT, USA, <http://www.perkinelmer.com>) equipado com tocha e tubo injetor de quartzo, com câmara de nebulização ciclônica e um nebulizador concêntrico.

A otimização dos parâmetros instrumentais utilizados para as determinações por ICP-MS e ICP OES foi feita de acordo com as recomendações do fabricante (PERKIN ELMER-SCIEX, 2003).

A determinação do teor de umidade foi realizada por meio de um refratômetro de Abbé (modelo Thermo Haake C10, Analytik Jena).

3.2 Reagentes

Hidróxido de amônio p.a. (Merck) e carbonato de amônio p.a. (Vetec) foram utilizados para o preparo das soluções absorvedoras utilizadas na decomposição por MIC. Adicionalmente, cabe ressaltar que o hidróxido de amônio também foi empregado para o preparo de algumas soluções utilizadas na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta.

Uma solução de hidróxido de tetrametilamônio 25% (p/p) em metanol (Sigma-Aldrich) foi utilizada nos procedimentos de dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria, dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta.

Para a MIC, foi utilizada uma solução de nitrato de amônio (6 mol l^{-1}) como iniciador de combustão. Esta solução foi preparada a partir da dissolução de NH_4NO_3 p.a. (Merck) em água.

As soluções de calibração de Br e I foram preparadas a partir da dissolução de soluções de referência contendo sais de brometo e iodeto de potássio (Merck) em hidróxido de amônio 10 mmol l^{-1} ou em carbonato de amônio 10 mmol l^{-1} .

Ácido cítrico p.a. (Vetec, www.vetecquimica.com.br, Brasil) foi diluído em água e a solução obtida, contendo 1000 mg l^{-1} de carbono, foi utilizada para o preparo das soluções de calibração (5 a 500 mg l^{-1}) empregadas para a determinação do teor de carbono residual nos digeridos obtidos após a decomposição das amostras por MIC. Para essas determinações também foi utilizada uma solução de ítrio Assurance[®] (Spex CertiPrep, $1001,5 \pm 3 \text{ mg l}^{-1}$ em HNO_3 $0,28 \text{ mol l}^{-1}$, www.spexcsp.com, EUA) como padrão interno.

Oxigênio comercial (White Martins, Brasil) 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. (Vetec) e álcool etílico absoluto (Vetec) foram utilizados para a descontaminação dos materiais utilizados neste trabalho.

Celulose microcristalina de grau farmacêutico foi utilizada na decomposição da amostra por MIC com o intuito de reduzir a velocidade da reação de combustão.

A água de elevada pureza utilizada nos procedimentos foi destilada, deionizada em coluna de troca iônica e, adicionalmente, purificada em um sistema de purificação (Megapurity, Billerica, USA).

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 h e, posteriormente, lavados com água purificada.

Os filmes de polietileno utilizados como invólucros das amostras, bem como os papéis filtro empregados na MIC, foram descontaminados através de imersão em álcool etílico 20% (v/v) por 20 min em banho de ultrassom. Posteriormente, os mesmos foram lavados com água ultrapura e secos em capela de fluxo laminar.

Para a descontaminação da celulose empregada na combustão das amostras, inicialmente, a mesma foi imersa em HNO₃ 10% (v/v) por 24 h. Em um segundo momento, a celulose foi filtrada a vácuo, lavada com água ultrapura e seca em estufa a 60 °C por 4 h.

Os frascos de quartzo e de PTFE do forno de micro-ondas, bem como os suportes para as amostras usados no sistema de combustão foram descontaminados com ácido nítrico concentrado sob aquecimento em forno de micro-ondas. Para tanto, o seguinte programa de aquecimento foi utilizado: *i)* 1400 W por 10 min e *ii)* 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). O mesmo procedimento de descontaminação foi feito também uma vez com água ultrapura, antes de proceder à decomposição ou dissolução das amostras.

As lâmpadas de emissão ultravioleta não foram descontaminadas sob radiação micro-ondas, uma vez que, neste caso, a lâmpada ficaria emitindo a radiação ultravioleta e, com isso, sofreria um desgaste. Deste modo, estas foram descontaminadas em um béquer contendo HNO₃ concentrado em uma chapa de aquecimento, a 120 °C por 20 min. Posteriormente, as lâmpadas e os suportes de PTFE foram lavados com água ultrapura e secos em uma capela de fluxo laminar.

3.4 Amostras

As amostras de mel empregadas neste trabalho foram adquiridas no comércio local de Pelotas – RS, de Santa Maria – RS e de Belo Horizonte –

MG. De acordo com as informações presentes nas embalagens, uma das amostras é proveniente de Santa Catarina – Brasil, duas são provenientes de cidades do Rio Grande do Sul (Santana do Livramento e Agudo), enquanto uma das amostras é oriunda de Minas Gerais, da cidade de Formiga. Com exceção da amostra oriunda da cidade de Formiga, que foi produzida a partir de flores de eucalipto, as demais amostras de mel apresentam uma origem floral silvestre. Dentre as amostras, uma foi escolhida aleatoriamente para a avaliação e desenvolvimento dos métodos para a determinação de Br e I e, esta foi identificada como “A”. As demais amostras foram utilizadas para avaliar a aplicabilidade do método proposto, estas foram identificadas como B,C e D.

Após a aquisição das amostras, estas foram homogeneizadas, com o auxílio de um bastão de vidro em um recipiente previamente descontaminado e, acondicionadas em recipientes de polietileno de alta densidade (PEAD).

Devido ter-se observado a presença de cristais nas amostras, previamente aos procedimentos de decomposição e dissolução, as mesmas foram novamente homogeneizadas em um banho-maria a 60 °C por 30 min. Este procedimento é recomendado pelo método oficial 920.180 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2011), o qual faz menção aos procedimentos que devem ser empregados para a homogeneização do mel.

Dois materiais de referência (RM), NIST 8435 (*Whole Milk Powder*) e NIST 8414 (*Muscle Bovine*), foram secos e utilizados para a avaliação da exatidão do procedimento proposto por MIC.

Diferentemente da maioria dos trabalhos relatados na literatura, para a decomposição das amostras, bem como dos RMs por MIC, foram preparados invólucros com um filme de polietileno (com dimensões de 8 x 8 cm, massa de aproximadamente 50 mg), sobre o qual foi pesada a amostra ou o RM, e uma quantidade significativa de celulose microcristalina. Em seguida, adicionou-se 100 µl de NH_4NO_3 (6 mol l⁻¹) e o invólucro foi fechado com o auxílio de uma pinça, selado por aquecimento e o excesso de polietileno foi removido. Imagens dos invólucros produzidos com a amostra de mel encontram-se apresentados na Figura 9 (MELLO, 2007; PEREIRA, 2007).



Figura 9. Invólucros contendo mel e celulose microcristalina.

3.5 Determinação do Teor de Umidade

A umidade das amostras de mel foi determinada segundo o método 44.1.03 (B) da *Association of Oficial Analytical Chemists* (AOAC, 2011) que, recomenda o uso da refratometria para esse fim.

Para a determinação do teor de umidade por meio do método, inicialmente, circulou-se água a 20 °C pelo refratômetro de Abbé, por tempo suficiente para equilibrar a temperatura do mesmo. Posteriormente, 3 a 4 gotas da amostra foram transferidas para o prisma do refratômetro, para que, então, fosse possível fazer a leitura do índice de refração. Com base no índice de refração observado e em uma Tabela (Anexo 1) que relaciona índices de refração com diferentes teores de umidade (AOAC, 2011) foi possível a obtenção do percentual de umidade no mel.

3.6 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado

No procedimento de dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas, inicialmente, foram transferidos 500 mg de amostra para frascos de PTFE, onde, posteriormente, foram adicionados 6 ml de solução (TMAH 0,11 mol l⁻¹, NH₄OH 50 mmol l⁻¹ ou NH₄OH 100 mmol l⁻¹). A seguir, os frascos foram fechados e submetidos ao programa de irradiação com micro-ondas apresentado na Tab. 1.

Tabela 1. Programa de irradiação empregado na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo de permanência (min)	Exaustão
1	1000	10	-	Fan 1
2	1000	-	50	Fan 1
3	0	-	20	Fan 3*

Taxa de aumento de pressão: $0,3 \text{ bar s}^{-1}$, temperatura máxima: $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão máxima: 40 bar; *etapa de resfriamento.

A temperatura máxima da extração foi limitada em $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar riscos de degradação do reagente TMAH (KNAPP *et al.*, 1998; TAGAMI *et al.*, 2006).

A solução obtida após o término do programa de irradiação foi avolumada a 25 ml com água ultrapura. As determinações dos analitos foram feitas por ICP-MS.

3.7 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas e Ultravioleta em Sistema Fechado

Neste procedimento, em um primeiro momento, foi inserido um dispositivo de PTFE no interior do frasco de quartzo. Posteriormente, foram adicionados 500 mg de amostra, 10 ml da solução responsável pela dissolução da amostra, onde, foram avaliados TMAH $0,11 \text{ mol l}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$ e $\text{NH}_4\text{OH } 100 \text{ mmol l}^{-1}$ e, por fim, a lâmpada UV contendo um segundo dispositivo de PTFE na parte superior. Em seguida, os frascos foram fechados, fixados no rotor e submetidos ao programa de aquecimento mostrado na Tab. 2.

Tabela 2. Programa de irradiação empregado na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo de permanência (min)	Exaustão
1	1000	10	-	Fan 1
2	1000	-	50	Fan 1
3	0	-	20	Fan 3*

Taxa de aumento de pressão: $0,3 \text{ bar s}^{-1}$, temperatura máxima: $90 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão máxima: 40 bar; *etapa de resfriamento.

Após o término do programa de irradiação as soluções obtidas foram avolumadas à 25 ml e os analitos foram determinados por ICP-MS.

3.8 Dissolução Alcalina com Aquecimento em Banho-Maria

Na dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria, inicialmente, foi transferido cerca de 1 g de amostra para frascos de polipropileno, posteriormente, adicionou-se 0,5 ou 1 ml de TMAH 25% (m/v) e, as amostras foram, então, submetidas ao aquecimento em banho-maria.

Outros parâmetros avaliados, além do volume de solução empregado, foram: a temperatura (60 e $90 \text{ }^\circ\text{C}$) e o tempo de dissolução (0,5; 1 e 2 h).

Após a dissolução das amostras, as mesmas foram aferidas a 10 ml e as determinações de Br e I foram feitas por ICP-MS.

3.9 Decomposição por MIC

Para a execução da decomposição por MIC, foram preparados invólucros contendo a amostra, a celulose e o NH_4NO_3 (6 mol l^{-1}), conforme foi descrito no item 3.4. A MIC foi realizada com massas de 500 e 1000 mg de amostra. No entanto, estudos foram realizados previamente com o intuito de verificar a massa máxima de amostra que poderia ser completamente decomposta sem o risco de um aumento excessivo de pressão durante a etapa de combustão.

Após a obtenção do invólucro contendo a amostra, este foi disposto na base do suporte de quartzo contendo um disco de papel filtro (15 mm de diâmetro, 12 mg) umedecido com 50 µl de NH_4NO_3 6 mol l^{-1} . Em um segundo momento, foram adicionados 6 ml da solução absorvedora no interior do frasco de quartzo e o suporte contendo a amostra foi, então, colocado no interior do mesmo com o auxílio de uma haste. Por fim, os frascos foram fechados, fixados no rotor, pressurizados com 20 bar de O_2 por 1 min e submetidos ao programa de irradiação com micro-ondas mostrado na Tab. 3.

Tabela 3. Programa de irradiação empregado para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo de permanência	Exaustão
1	1400	-	50 seg	Fan 1
2	0	-	3 min	Fan 1
3	1400	-	4 min	Fan 1
4	0	-	20 min	Fan 3*

Taxa de aumento de pressão: 0,8 bar s^{-1} , temperatura máxima: 280 °C e pressão máxima: 80 bar; *etapa de resfriamento.

Após o término do programa de irradiação as amostras foram avolumadas a 25 ml e as determinações de Br e I foram conduzidas por ICP-MS.

Outro parâmetro avaliado na MIC foi a solução absorvedora, para tanto, foram estudadas, por meio de ensaios de recuperação, soluções de carbonato de amônio e hidróxido de amônio em diferentes concentrações (25, 50, 75, 100 e 150 mmol l^{-1}). Os ensaios de recuperação foram realizados por meio da adição de 50 µl de soluções padrão de Br e I, cujas concentrações eram 300 e 45 mg l^{-1} , respectivamente, em 50 g da amostra de mel. Essas soluções foram preparadas a partir de sais de KI e KBr, previamente secos, e aferidas com água ultrapura.

As melhores condições observadas tiveram a sua exatidão avaliada por meio da decomposição de 200 mg do RM NIST 8435 por MIC e pela decomposição do RM NIST 8414 (110 mg), na presença da matriz da amostra

(500 mg). Para tanto, foi utilizado, assim como para as amostras, o filme de polietileno, como invólucro, e a celulose microcristalina em uma proporção de aproximadamente 30% em relação à massa de amostra e/ou RM empregada.

Após os parâmetros do método terem sido otimizados, as melhores condições para a decomposição das amostras visando a determinação de Br e I foram aplicadas para a decomposição de méis de outras origens geográficas e/ou botânicas.

No que diz respeito ao procedimento empregado para a execução da MIC, ainda cabe destacar que, a massa de papel filtro, a concentração e o volume de NH_4NO_3 e a pressão de O_2 utilizada foram baseados em trabalhos prévios (FLORES *et al.*, 2004; MESKO *et al.*, 2006).

Na Fig. 10 é apresentado um fluxograma com todos os procedimentos utilizados neste trabalho para o preparo de amostras de mel, para subsequente determinação de Br e I.

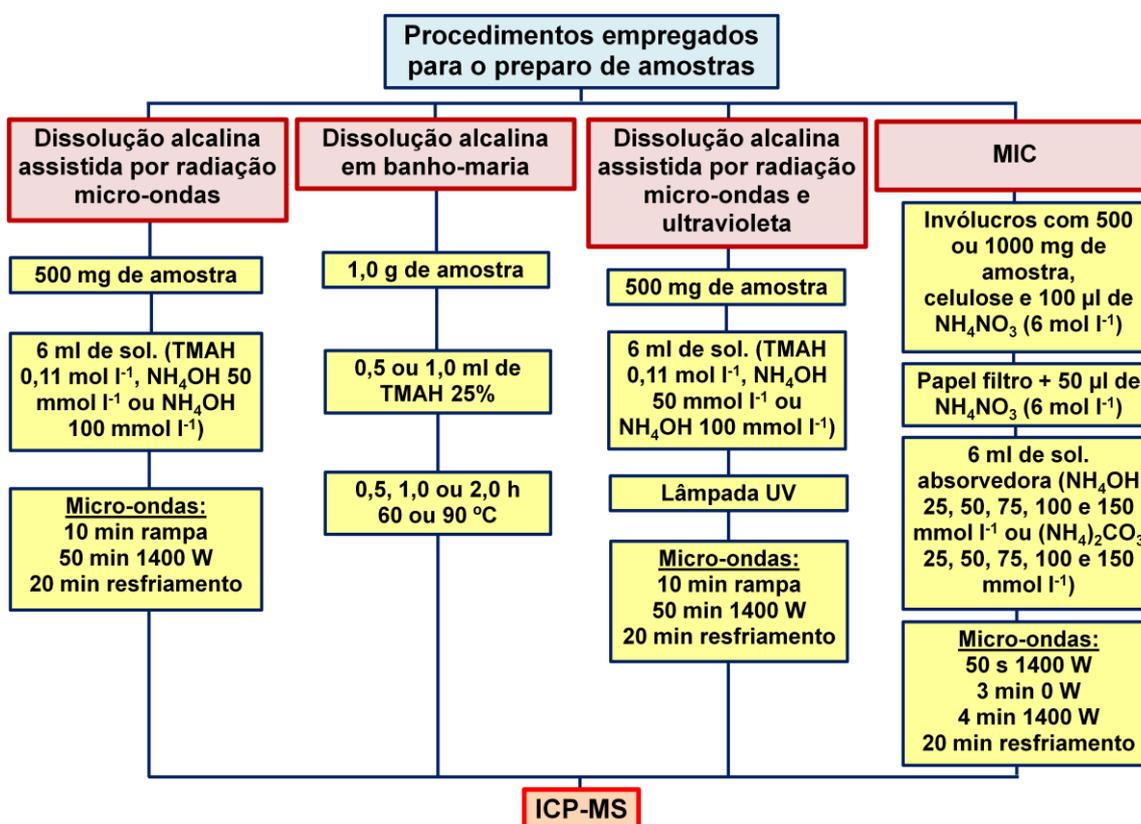


Figura 10. Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de mel para subsequente determinação de Br e I por ICP-MS.

3.10 Determinação dos Analitos por ICP-MS

As soluções obtidas após a amostra ter sido submetida aos diferentes procedimentos de preparo de amostra foram analisadas por ICP-MS para a determinação de Br e I. Os parâmetros operacionais do espectrômetro no momento das análises são apresentados na Tab. 4.

Tabela 4. Parâmetros operacionais para a determinação de Br e I por ICP-MS.

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

Com respeito à calibração, cabe destacar que, esta foi realizada por meio de soluções preparadas a partir de soluções estoques de Br e I na concentração de 10000 µg l⁻¹. As curvas utilizadas para a calibração foram de 1 a 10 µg l⁻¹ de Br e de 0,1 a 1 µg l⁻¹ de I. Estas foram preparadas em NH₄OH ou (NH₄)₂CO₃ 10 mmol l⁻¹ de acordo com a composição dos digeridos.

3.11. Determinação do Teor de Carbono Residual

A determinação do teor de carbono residual nas amostras digeridas por MIC foi feita por ICP OES. Para tanto, os digeridos, bem como as soluções de calibração foram, previamente, purgadas com argônio (Ar) por 2 min, para a remoção do CO₂ dissolvido. Foi utilizado ítrio como padrão interno, este foi adicionado às amostras e padrões a uma concentração final igual a 1 mg l⁻¹.

Os parâmetros operacionais do espectrômetro são apresentados na Tab. 5.

Tabela 5. Parâmetros operacionais para a determinação de C por ICP OES.

Parâmetros	ICP OES
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400
Vazão de argônio no tubo externo (l min^{-1})	15,0
Vazão auxiliar de argônio (l min^{-1})	0,2
Vazão de argônio do nebulizador (l min^{-1})	0,7
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	<i>Concêntrico</i>
Vista	<i>Axial</i>
Comprimento de onda C (nm)	193,091 e 247,856
Comprimento de onda Y (nm)	371,030

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as análises descritas no capítulo 3 (Materiais e Métodos), os quais possibilitaram o desenvolvimento e avaliação de diferentes procedimentos de preparo das amostras de mel para a subsequente determinação de Br e I por ICP-MS.

A discussão dos resultados foi subdividida de acordo com os diferentes procedimentos estudados. Na primeira parte, é feita uma discussão a respeito do teor de umidade da amostra analisada. 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 a respeito das vantagens e desvantagens dos métodos de preparo de amostras desenvolvidos.

4.1 Determinação do Teor de Umidade

As amostras de mel foram submetidas à determinação do teor de umidade, de acordo com descrito no item 3.5 (*Materiais e Métodos*), com o intuito de avaliar se o conteúdo de água nas amostras estava dentro do relatado na literatura e preconizado pela legislação vigente. Este cuidado foi tomado, tendo em vista que durante a etapa de decomposição das amostras por MIC, a presença de um teor elevado de água poderia ocasionar a decomposição incompleta das mesmas. Possivelmente, isso poderia ocorrer devido uma parcela significativa da energia liberada nos instantes iniciais da reação de combustão acabar sendo utilizada para a evaporação da água presente na amostra e, com isso, não ser possível alcançar a energia de ativação necessária para dar prosseguimento a reação, extinguindo, assim, o processo de combustão. Esta hipótese está baseada nos estudos feitos por MESKO (2004), onde foram investigados diferentes volumes de iniciadores de combustão e foi observado que quando um volume elevado de solução foi utilizado o início da reação de combustão não era reprodutível ou não ocorria.

O teor de umidade encontrado para o mel foi de $17,9 \pm 0,1\%$ ($n = 3$), onde se pode constatar que este se encontra dentro do limite especificado pelo Ministério da Agricultura na Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000) e com o limite estabelecido pela *Codex Alimentarius* na Normativa CODEX STAN 12-1981. Segundo essas normativas, o teor máximo de água permitido no mel é de 20% e valores superiores a estes podem indicar adulterações no mesmo.

Adicionalmente, cabe salientar que o teor de água encontrado para a amostra analisada encontra-se de acordo com valores reportados em outros trabalhos para méis florais (BERTONCELJ. J. *et al.*, 2011; FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J.M.; 2007). Além disso, também é relatado que pequenas variações são esperadas, uma vez que, a umidade do mel depende de vários fatores, tais como, estação de colheita, grau de maturidade alcançado na colmeia e fatores climáticos (FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J.M.; 2007).

4.2 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado

A dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado foi um dos métodos de preparo de amostras avaliado visando a determinação de Br e I em mel por ICP-MS. Esse sistema foi avaliado, tendo em vista que, quando se trata da determinação de halogênios em amostras biológicas, este é um dos métodos de preparo de amostras mais utilizados (MARTINS *et al.*, 2002; BATISTA *et al.*, 2007; CAMPILLO, *et al.*, 2010). Para tanto, amostras de mel foram submetidas ao procedimento de dissolução alcalina em sistema fechado e assistido por radiação micro-ondas utilizando três diferentes soluções: solução de TMAH 0,11 mol l⁻¹, cuja escolha encontra-se pautada em estudos anteriores (HARTWIG, 2011; MESKO, *et al.*, 2010), e soluções de NH₄OH 50 e 100 mmol l⁻¹, tendo em vista que existem relatos de que essas soluções apresentaram um desempenho satisfatório para a absorção de Br e I em matrizes biológicas decompostas por MIC. A dissolução foi realizada conforme o procedimento descrito no item 3.7 (*Materiais e Métodos*).

Na Fig. 11, podem ser observadas as soluções obtidas após a amostra de mel ter sido preparada por dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas, utilizando as diferentes soluções alcalinas.

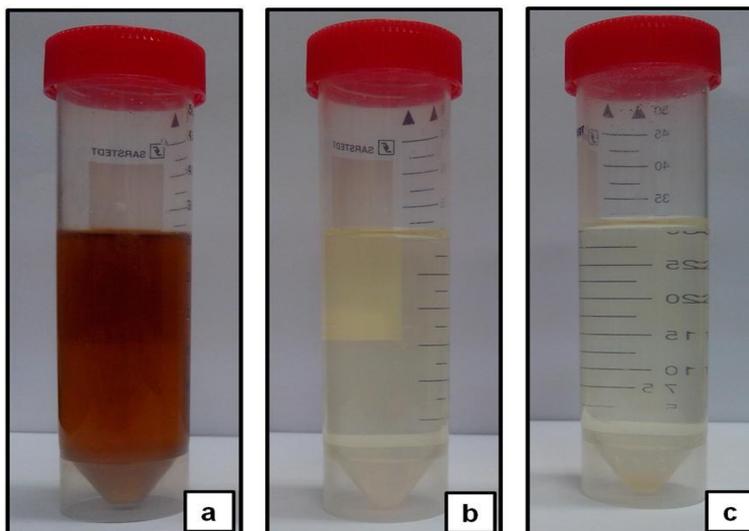


Figura 11. Aspecto das soluções obtidas após 500 mg de mel terem sido preparados por dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado, utilizando TMAH 0,11 mol l⁻¹ (a), NH₄OH 50 mmol l⁻¹ (b), e NH₄OH 100 mmol l⁻¹ (c).

Com base na Fig. 11 pode-se perceber que ao utilizar TMAH (Fig. 11a) na dissolução das amostras obteve-se uma solução com uma coloração marrom intensa. Provavelmente, isto está relacionado ao fato do TMAH ser uma base orgânica forte (NÓBREGA *et al.*, 2006) e, por isso, ocasionar um número mais expressivo de transformações químicas durante a dissolução da amostra quando comparado ao NH₄OH (Fig. 11 b e c). Em geral, o TMAH é capaz de ocasionar a cisão hidrolítica ou a metilação de algumas ligações, especialmente, ligações éster, amida e éter (NÓBREGA *et al.*, 2006).

A concentração de Br e I não pode ser determinada, por ICP-MS, nas soluções obtidas após a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas, uma vez que, as concentrações dos analitos na amostra encontravam-se abaixo dos limites de detecção obtidos para o método, quando utilizadas as diferentes soluções alcalinas.

Quanto aos limites de detecção obtidos para a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas, cabe salientar que, estes foram elevados devido as soluções obtidas conterem um elevado RCC, e, portanto, fazer-se necessária a realização de sucessivas diluições (de até 300 vezes), previamente as análises. Maiores detalhes referentes aos limites de detecção

dos métodos avaliados neste trabalho serão apresentados no item 4.7 deste capítulo.

Com relação ao teor de carbono residual, vale salientar que, este é elevado após a dissolução com soluções alcalinas, uma vez que neste método, não ocorre a decomposição da matriz da amostra, com a conversão da matéria orgânica em CO_2 e H_2O , como ocorre em outros sistemas de decomposição de amostras como as baseados nos métodos de combustão (FLORES *et al.*, 2007). Além disso, cabe destacar que, a presença de um teor elevado de carbono durante a análise por ICP-MS pode ocasionar o acúmulo de carbono na interface do equipamento, que implica na perda de sensibilidade durante a determinação, bem como interferir na ionização dos analitos no plasma (NÓBREGA *et al.*, 2006), assim, de fato, faz-se necessária a diluição das amostras.

Com relação as interferências do carbono sob a ionização dos analitos, cabe mencionar que estas, geralmente, estão relacionadas ao fato das moléculas orgânicas requererem mais energia para a sua atomização quando comparadas as moléculas de água (WEIR & BLADES, 1994), bem como a ionização de um teor elevado de carbono demandar uma parcela apreciável de energia. O consumo de energia envolvido em ambos os processos mencionados diminuem a energia disponível para a ionização do(s) analito(s) e ocasionam, por consequência, a redução da intensidade dos sinais obtidos para os mesmos. Assim, o I deveria ter seu sinal suprimido em uma larga extensão, devido apresentar uma elevada energia de ionização, no entanto, o mesmo, assim como o As, Au, Hg, Sb, Se e Pd, na presença de um elevado teor de carbono, tem a intensidade do seu sinal aumentada (GRINDLAY *et al.*, 2013). A intensidade do sinal mais elevada esta relacionada a uma maior eficiência de ionização do(s) analito(s) que, neste caso, se deve a ocorrência de reações de transferência de carga (GRINDLAY *et al.*, 2013). Nessas reações ocorre a transferência de carga entre o analito e espécie(s) de carbono ionizada(s) (C^+ , C_2^+ , CO^+ ou CO_2^+), as quais são formadas no plasma, o que culmina na ionização do analito. Esse processo somente ocorre com elementos que apresentam níveis eletrônicos iônicos com energia semelhante à energia de ionização da(s) espécie(s) de carbono produzidas.

4.3 Dissolução Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas e Ultravioleta em Sistema Fechado

A dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta em sistema fechado também foi realizada, uma vez que havia o interesse de conhecer as suas potencialidades como método de preparo de amostras para a subsequente determinação de Br e I em mel por ICP-MS.

O procedimento utilizado para a execução deste método (item 3.8 – *Materiais e Métodos*) é semelhante ao empregado para a dissolução alcalina por radiação micro-ondas em sistema fechado. A diferença entre os procedimentos reside no fato de, na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, ser empregada uma lâmpada de radiação UV no interior do frasco onde ocorre a dissolução da amostra (Fig. 12).

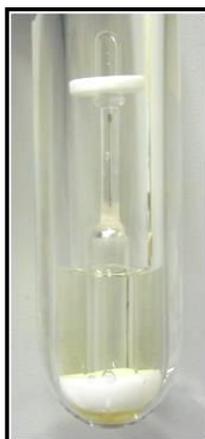


Figura 12. Frasco de quartzo contendo a lâmpada UV, a amostra e a solução utilizada para a dissolução da mesma.

Quanto às soluções empregadas, cabe destacar que, estas foram às mesmas avaliadas na dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado (TMAH $0,11 \text{ mol l}^{-1}$, NH_4OH 50 e 100 mmol l^{-1}), uma vez que, assim, o efeito da radiação UV poderia ser estudado de um modo mais efetivo, por meio da comparação entre os métodos.

A temperatura máxima foi limitada para $90 \text{ }^\circ\text{C}$ devido o TMAH se decompor sob temperaturas superiores. Para as demais soluções dissolutoras

avaliadas a temperatura também foi limitada a 90 °C devido objetivar-se a avaliação do efeito da solução dissolvente na amostra e, portanto, ser necessário que os todos os outros parâmetros fossem fixados. No entanto, cabe salientar que temperaturas superiores podem ser utilizadas para as demais soluções estudadas. Todavia, este estudo da avaliação de diferentes temperaturas de dissolução não foi feito devido as limitações encontradas durante a detecção do analito por ICP-MS, as quais serão detalhadas a seguir.

Na Fig. 13 podem ser observadas as soluções obtidas após a amostra de mel ter sido submetida à dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta em sistema fechado, utilizando as diferentes soluções (TMAH 0,11 mol l⁻¹ e NH₄OH (50 e 100 mmol l⁻¹)).

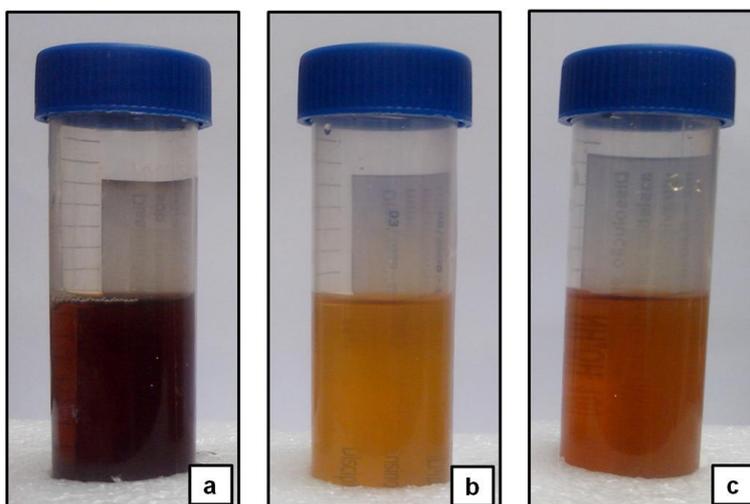


Figura 13. Aspecto das soluções obtidas após 500 mg de mel terem sido preparados por dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta em sistema fechado, utilizando TMAH 0,11 mol l⁻¹ (a), NH₄OH 50 mmol l⁻¹ (b), e NH₄OH 100 mmol l⁻¹ (c).

Com base na Fig. 13 pode-se perceber que, as soluções obtidas por meio da dissolução alcalina empregando radiação micro-ondas e ultravioleta, apresentam uma coloração marrom mais intensa que as soluções obtidas por meio da dissolução alcalina empregando somente a radiação micro-ondas (Fig. 11). Provavelmente, isso se deve ao fato de, no sistema que emprega a radiação ultravioleta, ocorrer um maior número de transformações químicas durante a dissolução da amostra. De acordo com Golimowski e Golimowska

(1996), a radiação ultravioleta é capaz de gerar espécies reativas a partir de compostos orgânicos e inorgânicos, algumas dessas espécies são oxigênio *singlet*, radicais superóxido e alquilperóxidos, ozônio, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Algumas dessas espécies como o radical hidroxila e os radicais alquilperóxidos podem ser formados, na presença da radiação UV, a partir das soluções dissolutoras avaliadas (NH₄OH e TMAH).

Quanto aos resultados, cabe destacar que, assim como, para a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas, não foi possível a quantificação do teor de Br e I no mel por ICP-MS após a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta. Isso se deve, novamente, ao fato, do teor dos analitos na amostra encontrar-se abaixo dos limites de detecção (item 4.7) obtidos para o método, quando utilizadas as diferentes soluções avaliadas.

A inviabilidade de determinar a concentração dos analitos por meio deste método impossibilitou a avaliação da potencialidade da radiação ultravioleta para o preparo de amostras de mel visando a subsequente determinação de Br e I. Entretanto, como a radiação ultravioleta é capaz de gerar espécies reativas e oxidantes, acredita-se que a mesma possa favorecer a obtenção de uma solução, onde, os analitos encontram-se totalmente ou quase que na totalidade disponíveis para a análise. Essa capacidade torna-se ainda mais relevante quando os analitos encontram-se fortemente ligados a matriz da amostra, tendo em vista que a solubilização dos mesmos passa a ser ainda mais complexa.

4.4 Dissolução Alcalina com Aquecimento em Banho-Maria

Para a realização da dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria empregou-se o procedimento descrito no item 3.9 (*Materiais e Métodos*).

Com relação ao procedimento empregado, cabe destacar que, neste foram avaliados os seguintes parâmetros: volume de TMAH utilizado (0,5 e 1 ml), temperatura de dissolução (60 e 90 °C) e tempo de dissolução (0,5; 1 e 2 h).

Nas Fig. 14 podem ser observadas as soluções obtidas após a dissolução de 1 g de amostra sob as diferentes condições avaliadas.

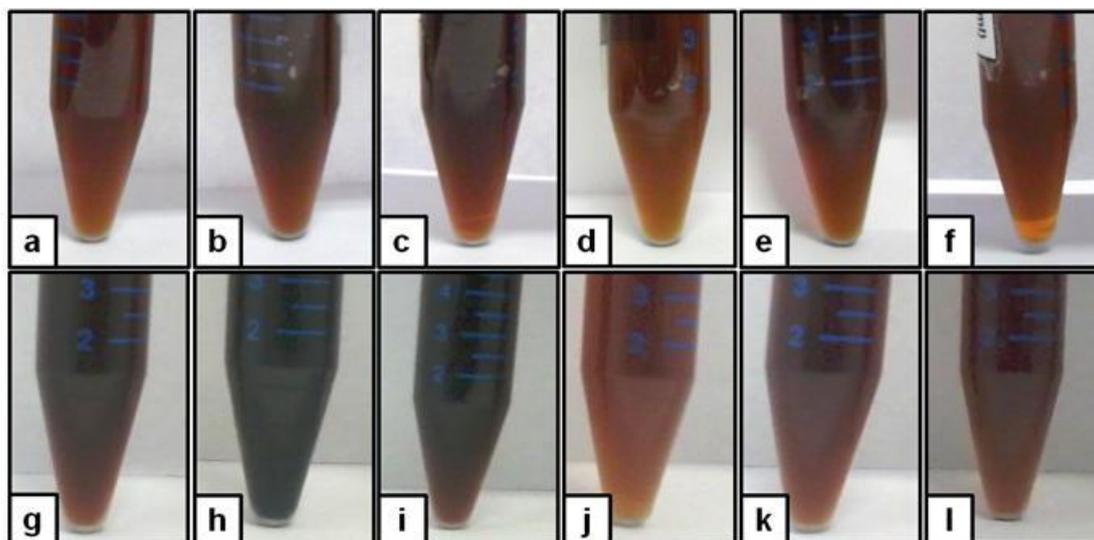


Figura 14. Aspecto das soluções obtidas após dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria, utilizando TMAH 25%. Condições empregadas nas dissoluções de 1 g de amostra a 60 °C: 1 ml de TMAH (30 min) (a), 1 ml de TMAH (1h) (b), 1 ml de TMAH (2 h) (c), 0,5 ml de TMAH (30 min) (d), 0,5 ml de TMAH (1 h) (e), e 0,5 ml de TMAH (2 h) (f). Condições empregadas nas dissoluções de 1 g de amostra a 90 °C: 1 ml de TMAH (30 min) (g), 1 ml de TMAH (1h) (h), 1 ml de TMAH (2 h) (i), 0,5 ml de TMAH (30 min) (j), 0,5 ml de TMAH (1 h) (k), e 0,5 ml de TMAH (1 h) (l).

Como pode ser observado na Fig. 14, as soluções não apresentaram uma diferença significativa quanto ao seu aspecto. No entanto, cabe ressaltar que, dentre essas soluções, as que apresentaram uma coloração mais intensa foram obtidas a partir de 1 ml de TMAH e submetidas a uma temperatura de 90 °C. Possivelmente, isso esteja correlacionado ao fato de, nessas condições, ter-se uma maior disponibilidade de TMAH e uma temperatura mais elevada e, portanto, um meio que favorece de um modo mais efetivo a ocorrência de transformações químicas.

No entanto, assim como, para os métodos de dissolução alcalina mencionados anteriormente, não foi possível obter o teor de Br e I no mel por ICP-MS após a aplicação da dissolução alcalina com aquecimento por banho-

maria. Novamente, o teor dos analitos na amostra mostrou-se menor que os limites de detecção obtidos para o método, os quais foram elevados devido a necessidade de sucessivas diluições para a introdução da amostra no ICP-MS.

4.5 Decomposição por MIC

Tendo em vista que os métodos que envolvem a dissolução alcalina não foram adequados para o preparo de amostras de mel para subsequente determinação de Br e I, avaliou-se também a MIC, uma vez que há relatos na literatura que descrevem o seu uso para a decomposição de diferentes tipos de alimentos para posterior determinação de halogênios (MESKO et al., 2010). Entretanto, cabe ressaltar que a MIC ainda não foi utilizada para a decomposição de matrizes ricas em açúcares, como o mel.

As decomposições por MIC foram realizadas conforme descrito no item 3.6 (*Materiais e Métodos*). Inicialmente, existiu a necessidade de avaliar a forma de introdução da amostra no sistema de combustão, tendo em vista que o mel é um líquido viscoso e a maior parte dos trabalhos por MIC utilizam a amostra na forma sólida. Assim, em um primeiro momento, optou-se pela utilização de cápsulas de policarbonato, uma vez que o uso de cápsulas como invólucros para amostras é reportado na literatura há algum tempo para a subsequente decomposição de diferentes tipos de amostra por meio do frasco de combustão de Schöniger que, consiste em um sistema de combustão, assim como, a MIC (FLORES et al., 2007; PEREIRA, 2007). Todavia, como o uso da cápsula limitava a massa de amostra a ser utilizada, avaliou-se a utilização de invólucros de polietileno. A utilização deste tipo de invólucro para a amostra foi baseada em um trabalho relatado na literatura que utilizou filmes de polietileno para amostras de petróleo (PEREIRA, 2007). Durante o desenvolvimento deste método também foi avaliada a massa máxima de amostra que poderia ser utilizada sem o risco de um aumento excessivo da pressão durante a etapa de combustão, bem como a solução absorvedora mais adequada para a absorção, estabilização e inserção dos analitos em ICPs por nebulização pneumática.

Nos itens 4.2.1 e 4.2.3 são apresentados os resultados referentes à otimização da massa de amostra e da solução absorvedora, respectivamente.

4.5.1 Otimização da Massa de Amostra

Como mencionado anteriormente, a massa de amostra a ser utilizada na MIC, foi um parâmetro avaliado durante o desenvolvimento do método para a decomposição de mel, visando a determinação de Br e I. A menor massa de amostra avaliada foi 100 mg, para os estudos subsequentes a massa empregada foi sendo aumentada em incrementos de 50 mg. Esse estudo foi realizado de uma forma gradual devido desconhecer-se o comportamento da reação de combustão do mel, ou seja, se a mesma poderia ocorrer de uma forma violenta ocasionando, assim, um aumento excessivo da pressão do sistema.

Durante esse estudo houve um acompanhamento do aspecto da solução obtida após a combustão, bem como da pressão atingida no sistema para cada massa de amostra avaliada, para que, então, fosse possível determinar a massa máxima de amostra que poderia ser utilizada sem um aumento excessivo da pressão e com uma completa decomposição da amostra.

Com base nesse estudo foi possível perceber que massas entre 100 e 350 mg de mel podem ser decompostas por MIC a uma pressão de O_2 de 20 bar (Fig. 15), obtendo-se soluções com aspecto límpido. Em contrapartida, observou-se que para massas a partir de 400 mg a reação de combustão não era completa. Deste modo, fez-se um estudo empregando-se 25 bar de O_2 com o intuito de avaliar se o aumento da pressão de O_2 poderia auxiliar no processo de combustão. Todavia, nesta condição ocorreu a persistência de uma solução com coloração escura (Fig.16) para a massa de 400 mg de amostra. Dessa forma, para averiguar o que ocorria durante a combustão de massas de mel acima de 350 mg, realizou-se a decomposição de 400 mg da amostra em um modo que permite a visualização do processo de combustão. Como se suspeitava, a queima não havia sido completa, devido o invólucro romper nos instantes iniciais da combustão, projetando a amostra carbonizada nas paredes do frasco e na solução absorvedora.

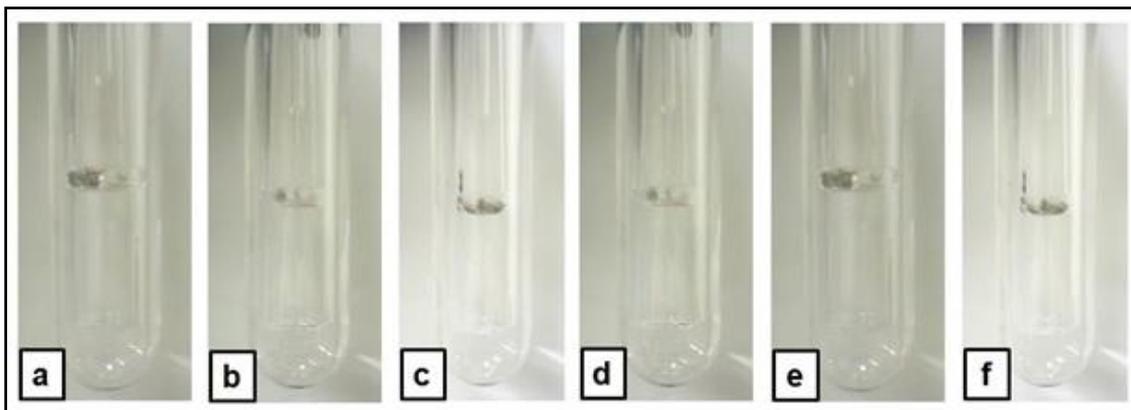


Figura 15. Aspecto da solução absorvedora e do sistema de decomposição após a decomposição de diferentes massas de mel por MIC com pressão de 20 bar de O₂ no sistema: 100 mg (a), 150 mg (b), 200 mg (c), 250 mg (d), 300 mg (e) e 350 mg (f).



Figura 16. Aspecto da solução absorvedora e do sistema de decomposição após a decomposição de 400 mg de mel por MIC, com pressão de O₂ de 25 bar.

Assim, com o intuito de poder aumentar a massa de mel a ser decomposta no sistema, possibilitando uma melhora no LOD do método e, conseqüentemente, a determinação de Br e I nas amostras de mel, avaliou-se a adição de celulose nos invólucros contendo a amostra. A adição foi feita com a intenção de avaliar se a presença da celulose poderia tornar a reação de combustão mais controlada e, com isso evitar a projeção do mel durante a queima. Este estudo foi baseado em trabalhos de outros autores que utilizaram auxiliares para melhorar a eficiência da combustão de amostras biológicas

durante a decomposição das mesmas na bomba de combustão (ARIKAWA, *et al.*, 1987; SOUZA *et al.*, 2002). Além disso, em alguns trabalhos relatados na literatura relacionados a MIC, a celulose foi empregada como um auxiliar de combustão. No entanto, a mesma não foi utilizada com o intuito de influenciar na cinética da reação de combustão, mas, com o objetivo de contribuir com a volatilização de alguns analitos presentes em amostras que possuem uma fração inorgânica elevada (PICOLOTO *et al.*, 2012).

Adicionalmente, também foi avaliada a adição de 50 ou 100 μl de NH_4NO_3 6 mol l^{-1} (mesma solução usada como iniciador de combustão) na amostra, bem como a presença de pequenos orifícios nos invólucros da amostra. Estes orifícios no filme de polietileno foram feitos para verificar se a projeção da amostra durante a combustão era reduzida.

Após essa otimização pode-se perceber que, a presença de celulose em uma proporção adequada à massa de amostra, a adição de 100 μl de NH_4NO_3 (6 mol l^{-1}) e a presença de pequenos orifícios nos invólucros, permitem a combustão completa de até 1000 mg de mel (Fig. 17). A eficiência da decomposição dessa massa de amostra foi comprovada por meio da determinação do teor de carbono nos digeridos, onde, todas as soluções analisadas apresentaram valores abaixo de 13 mg l^{-1} (limite de detecção do método).



Figura 17. Aspecto da solução absorvedora e do sistema de decomposição após a decomposição de 1000 mg de mel por MIC, com 20 bar de O_2 no sistema.

Na Tab. 6 para cada massa de amostra avaliada a partir de 400 mg encontra-se especificada a massa de celulose necessária para que a reação de combustão seja completa. No entanto, fez-se necessário ainda, a adição de 100 μl de NH_4NO_3 (6 mol l^{-1}) e que se façam pequenos orifícios nos invólucros antes da combustão da amostra.

Com relação a adição de 100 μl de NH_4NO_3 juntamente com a amostra e a celulose, acredita-se que esta solução tenha facilitado a ocorrência da ignição da amostra de uma maneira mais homogênea e, com isso, auxiliado na melhora do processo de combustão. Da mesma forma, acredita-se que a presença de orifícios no filme que envolve a amostra tenha contribuído para aumentar a superfície de contato entre a amostra e o O_2 , favorecendo assim a reação, como também reduzido a pressão interna dos invólucros evitando o rompimento repentino durante o processo de ignição e, conseqüentemente, a projeção da amostra durante a combustão.

Tabela 6. Massas de celulose utilizadas para combustão de 400 a 1000 mg de mel, utilizando 20 bar de pressão inicial de O_2 .

Massa de mel (mg)	Massa de celulose (mg)
400	50
450	100
500	150
550	150
600	150
650	200
700	200
750	250
800	250
850	300
900	350
950	400
1000	400

O teor de celulose necessário para a decomposição de massas de amostra de 400 a 1000 mg variou de 12 a 40% (m/m). Com base nos

resultados apresentados na Tab. 6 pode-se perceber que com o aumento da massa de amostra faz-se necessário utilizar a celulose em uma maior proporção. Adicionalmente, pode-se observar que os teores de celulose necessários para a decomposição de massas superiores a 850 mg foram os mais elevados (cerca de 40%).

Com o intuito de avaliar qual massa seria mais adequada para a quantificação dos analitos em mel, selecionou-se a maior massa otimizada (1000 mg), bem como a massa intermediária (500 mg). A massa de 1000 mg foi selecionada, uma vez que, a sua utilização permitiria a redução do limite de detecção do método, facilitando, assim, a detecção de elementos em um nível traço. Enquanto que a massa de 500 mg foi utilizada devido a maior facilidade de manipulação da amostra, a menor proporção amostra/celulose e a menor pressão gerada no sistema. Além disso, a decomposição das massas de mel selecionadas permitiu fazer uma avaliação dos brancos, tendo em vista que a proporção de celulose adicionada não é proporcional para estas massas de amostra (500 mg de mel – 30% de celulose e 1000 mg de mel – 40% de celulose).

Quanto às pressões atingidas ao longo da otimização, vale salientar que, as mesmas não ultrapassaram 45 bar. Deste modo, como o sistema utilizado apresenta uma pressão limite de 80 bar, foi possível realizar a decomposição de até 1000 mg de amostra de modo seguro. Além disso, esse estudo indicou que massas de mel superiores a 1000 mg ainda podem ser avaliadas na MIC, todavia, fica evidente que outros parâmetros devem ser acompanhados. Na Fig. 18 são apresentadas as pressões atingidas no sistema após a combustão de diferentes massas de mel usando 20 bar de oxigênio como pressão inicial. No entanto, é importante salientar que as pressões apresentadas na Fig. 18, para massas de amostra a partir de 400 mg, também se referem as massas de celulose que tiveram de ser adicionadas (Tab. 6) para que as decomposições ocorressem de uma forma adequada.

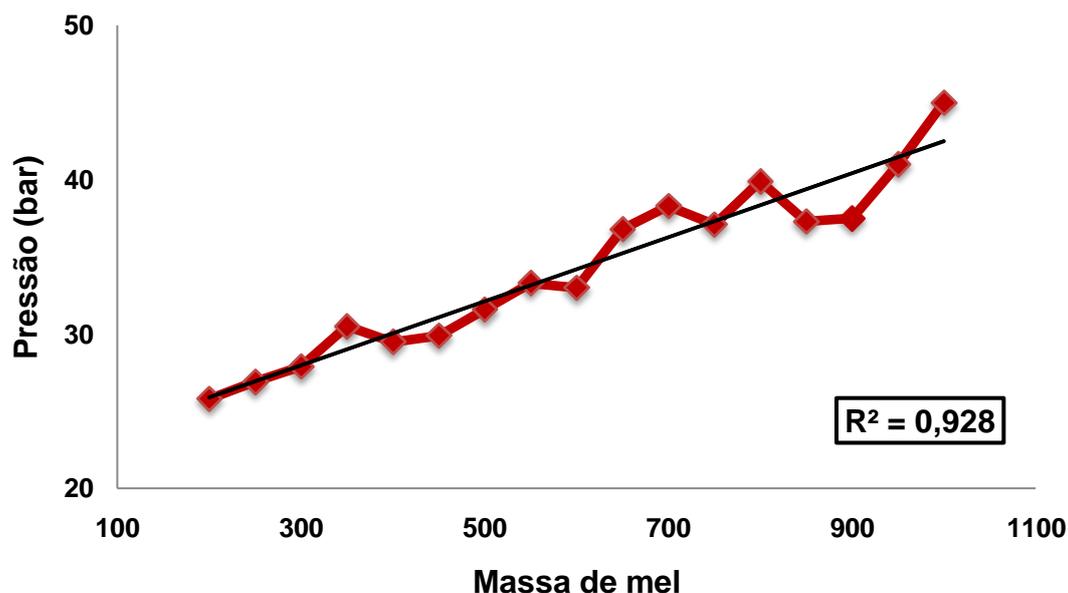


Figura 18. Pressões atingidas após a combustão de massas de 200 a 1000 mg de mel, com pressão inicial de 20 bar de O₂ (n=1).

Como pode ser observado na Fig. 18, com o aumento da massa da amostra ocorreu um incremento praticamente linear na pressão ($R^2 = 0,928$). Contudo, alguns comportamentos diferentes do esperado podem estar correlacionados a uma variação na pressão inicial do sistema, bem como a própria variação do sensor que monitora a pressão dos frascos de decomposição.

4.5.2 Programa de Irradiação com Micro-ondas

O programa de irradiação das micro-ondas utilizado, inicialmente, era constituído pelas seguintes etapas: *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, conforme proposto em trabalhos anteriores (MESKO *et al.*, 2010; HARTWIG, 2011).

No entanto, tendo em vista que a aplicação do refluxo concomitantemente a etapa de combustão ocasionava o arraste da amostra durante o processo de combustão, optou-se pela aplicação de uma etapa intermediária entre a de combustão e a de refluxo, para que, assim, a

combustão completa da amostra fosse garantida. O programa de irradiação empregado neste trabalho está apresentado no item 3.6 (*Materiais e métodos*).

Com respeito à etapa de refluxo, cabe destacar que a mesma foi utilizada, devido relatos da literatura indicarem que a sua aplicação propicia recuperações mais quantitativas, bem como menores desvios padrão relativos (RSDs) (FLORES *et al.*, 2004; MESKO *et al.*, 2010).

4.5.3 Otimização da Solução Absorvedora para Br e I

Para que fosse selecionada a solução mais adequada para a absorção de Br e I após a decomposição das amostras de mel por MIC, foram estudadas soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e NH_4OH em diferentes concentrações (25, 75, 50, 100 e 150 mmol l^{-1}). O $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e NH_4OH foram selecionados, uma vez que, para outros tipos de amostra, relatos da literatura têm apontado que essas soluções são candidatas potenciais para a absorção de Br e I após a decomposição por MIC (HARTWIG, 2011; MESKO, 2008; PEREIRA *et al.*, 2010). Assim, ensaios de recuperação foram realizados com o intuito de avaliar a solução absorvedora mais adequada, onde foram adicionadas concentrações conhecidas de soluções padrão dos analitos na amostra (item 3.9).

Na Fig. 19 são apresentadas as recuperações obtidas para Br e I na amostra de mel, após decomposição por MIC empregando NH_4OH e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 mmol l^{-1} e, subsequente determinação por ICP-MS.

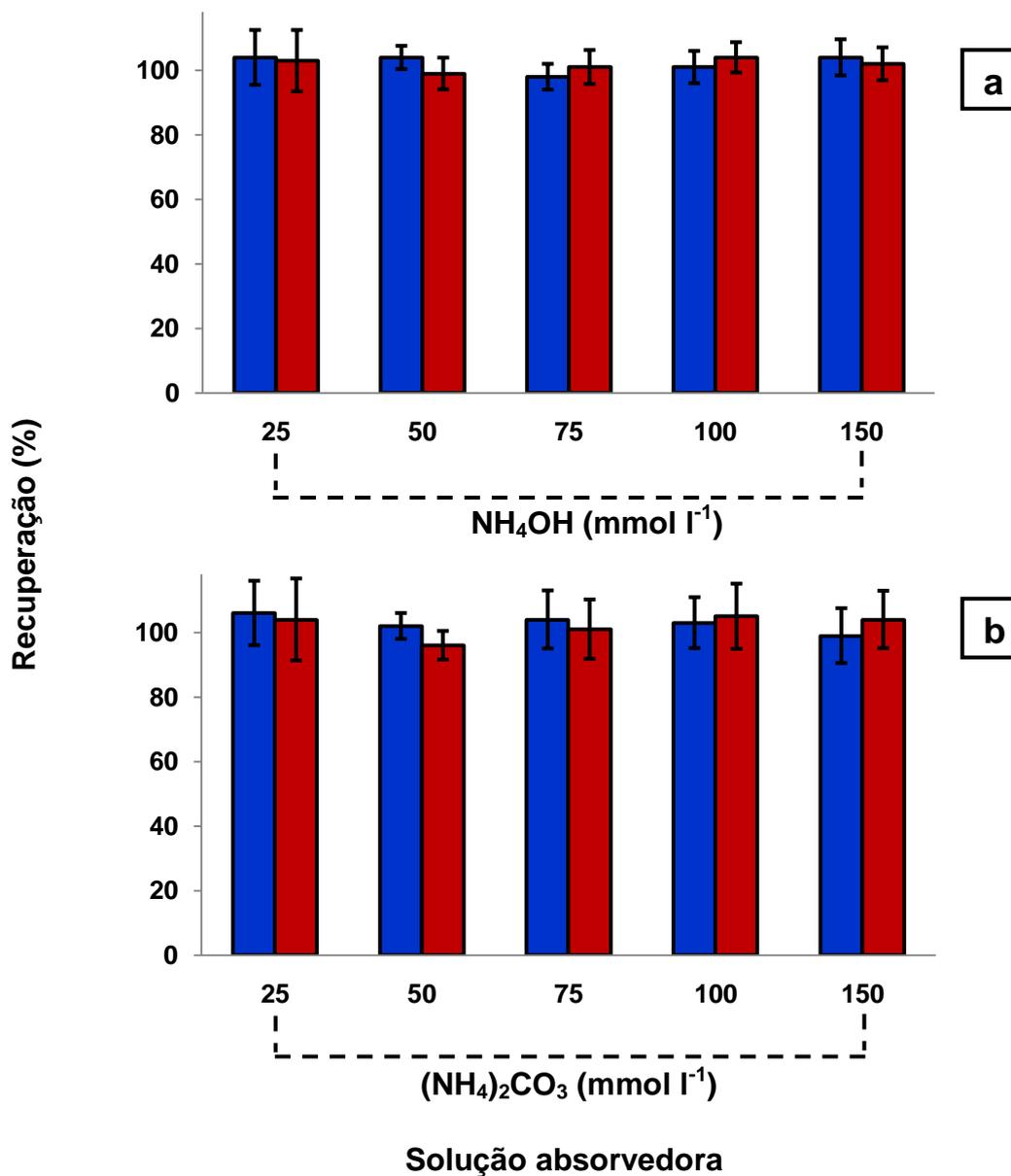


Figura 19. Recuperações para ■ Br e ■ I em amostras de mel, por ICP-MS, após MIC, utilizando diferentes concentrações de NH_4OH (a) e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (b) como solução absorvedora (massa de amostra = 500 mg, n=3).

Como pode ser observado na Fig. 19 as recuperações para Br e I foram satisfatórias para as diferentes soluções de NH_4OH estudadas. Para Br as recuperações variaram de 99 a 104% e para I de 98 a 104%. Contudo, com o uso das concentrações de 50, 75, 100 e 150 mmol l^{-1} de NH_4OH , como solução absorvedora, os RSDs para ambos os analitos mostraram-se inferiores (< 6%)

aos obtidos quando a solução de 25 mmol l⁻¹ foi utilizada. Assim, as soluções empregadas com concentrações a partir de 50 mmol l⁻¹ foram consideradas mais adequadas para a absorção de Br e I após a decomposição da amostra analisada. Entretanto, cabe salientar que embora a solução de NH₄OH 25 mmol l⁻¹ não tenha sido a mais adequada, seu comportamento mostrou-se diferente do observado em outros trabalhos relatados na literatura (PEREIRA, 2010; HARTWIG, 2011), onde, após a decomposição de amostras com outros tipos de matrizes por MIC, essa concentração da solução de NH₄OH apresentou recuperações para estes analitos inferiores a 60%. Provavelmente, isso se deve ao fato da amostra de mel analisada apresentar uma baixa concentração dos analitos, e não possuir uma matriz que após a MIC favoreça uma redução significativa do pH do meio que, em um segundo momento, poderia ocasionar a baixa recuperação dos mesmos. Os pHs para todas as soluções absorvedoras estudadas quando decompostos 500 mg de amostra ficaram em torno de 7.

Com relação às recuperações obtidas para Br e I quando utilizadas as diferentes soluções de (NH₄)₂CO₃, cabe salientar que também foram observadas recuperações satisfatórias para ambos os analitos em todas as concentrações avaliadas (96 a 105% para Br e 99 a 106% para I). Além disso, assim como para as soluções de NH₄OH, os menores RSDs (< 10%) foram obtidos quando se utilizou o (NH₄)₂CO₃ nas concentrações de 50, 75, 100 e 150 mmol l⁻¹. No entanto, os RSDs obtidos, quando (NH₄)₂CO₃ foi utilizado como solução absorvedora, foram de um modo geral, superiores aos encontrados para NH₄OH. Adicionalmente, cabe destacar que, o uso de (NH₄)₂CO₃ pode trazer inconvenientes durante a determinação por ICP-MS, uma vez que, podem ocorrer depósitos de carbono na interface do mesmo (cones e lente iônica), assim, optou-se por utilizar a solução de NH₄OH como solução absorvedora.

Desta forma, para avaliar a exatidão do procedimento de decomposição por MIC utilizando NH₄OH como solução absorvedora para subsequente determinação de Br e I por ICP-MS, foram decompostos cerca de 200 mg do RM NIST RM 8435 (*Whole Milk Powder*), conforme descrito no item 3.6

(*Materiais e Métodos*), avaliando duas concentrações da solução absorvedora, 50 e 100 mmol l⁻¹.

Com respeito ao RM utilizado cabe salientar que devido à ausência de material de referência certificado (CRM) com uma matriz semelhante a da amostra, bem como de um material de referência (RM), optou-se pela sua utilização. Embora, a sua matriz não apresente semelhança com a da amostra, o mesmo, em conjunto com os demais estudos que foram realizados ao longo desse trabalho, foi capaz de contribuir para a avaliação da exatidão do método.

Os resultados apresentados na Tab. 7, referentes à determinação de Br e I no RM por ICP-MS, após decomposição por MIC, mostram concordâncias como o valor informado para Br de 101 e 105% e para I de 98 e 106% quando as soluções de NH₄OH 50 mmol l⁻¹ e 100 mmol l⁻¹ foram usadas, respectivamente. Utilizando o teste *t* de Student é possível observar que ambas as concentrações de NH₄OH não apresentam diferenças significativas com o valor certificado para Br e I, em um nível de 95% de confiança. Dessa forma, tanto a concentração de 50 mmol l⁻¹ quanto à concentração de 100 mmol l⁻¹ da solução de NH₄OH são adequadas para a absorção de Br e I.

Tabela 7. Determinação de Br e I em material de referência NIST 8435 (*Whole milk powder*), por ICP-MS, após decomposição por MIC, utilizando NH₄OH 50 e 100 mmol l⁻¹, como solução absorvedora (resultados expressos em µg kg⁻¹ ± desvio padrão, n=3).

Solução absorvedora	Br	I
NH ₄ OH 50 mmol l ⁻¹	20,2 ± 0,2	2,25 ± 0,17
NH ₄ OH 100 mmol l ⁻¹	21,0 ± 2,4	2,43 ± 0,17

Valor informado para Br: 20 ± 10 µg g⁻¹; I: 2,30 ± 0,40 µg g⁻¹.

No entanto, tendo em vista que o RM utilizado não apresenta uma matriz semelhante a da amostra, fez-se um estudo adicional com o intuito de complementar a avaliação da exatidão do procedimento de decomposição por MIC utilizando NH₄OH como solução absorvedora. Para tanto, foi feita a decomposição por MIC de cerca de 110 mg do RM NIST 8414 (*Bovine muscle*),

que apresenta em sua composição $1,1 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de Br e $0,035 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$ de I, na presença da matriz da amostra (500 mg).

Na Tab. 8 são apresentadas as recuperações obtidas para Br, por ICP-MS, após a adição do RM NIST 8414 nas amostras de mel e decomposição por MIC empregando NH_4OH nas concentrações de 50, 75 e 100 mmol l^{-1} .

Tabela 8. Recuperações de Br obtidas por ICP-MS, após a adição do RM NIST 8414 nas amostras de mel e decomposição por MIC empregando NH_4OH nas concentrações de 50, 75 e 100 mmol l^{-1} (resultados expressos em % \pm desvio padrão, n=3).

Solução absorvedora	Recuperação
$\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$	104 ± 3
$\text{NH}_4\text{OH } 75 \text{ mmol l}^{-1}$	105 ± 4
$\text{NH}_4\text{OH } 100 \text{ mmol l}^{-1}$	102 ± 7

Com pode ser observado na Tab. 8 as recuperações para Br podem ser consideradas quantitativas para todas as concentrações de NH_4OH avaliadas, o que indica, novamente, que essas soluções são adequadas para a absorção de Br após a decomposição por MIC e subsequente determinação por ICP-MS. Entretanto, tendo em vista que, com a utilização da solução de hidróxido de amônio 50 mmol l^{-1} obteve-se o menor RSD (menor que 3%) e que, o emprego de soluções absorvedoras mais diluídas é sempre desejável quando as determinações são realizadas por ICP-MS, dentre as soluções avaliadas, a solução escolhida para absorver Br e I após a decomposição de mel por MIC foi $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$.

Quanto às recuperações para I referentes à adição do RM NIST 8414 nas amostras de mel, cabe salientar que as mesmas não puderam ser obtidas tendo em vista que, o teor de I das amostras contendo o RM encontrava-se abaixo dos limites de detecção obtidos para o método ($\sim 11 \mu\text{g kg}^{-1}$, conforme apresentado no item 4.7) quando empregadas as diferentes soluções avaliadas neste estudo.

Após a escolha da solução absorvedora mais apropriada para a absorção de Br e I, a amostra de mel foi decomposta por meio da MIC

utilizando como solução absorvedora NH_4OH 50 mmol l^{-1} , e o teor de Br e I foi, então, determinado por ICP-MS.

A concentração de Br encontrada para a amostra analisada foi $581 \pm 16 \mu\text{g kg}^{-1}$, e o RSD obtido foi menor que 3%, o que indica que o método apresenta uma boa precisão. Entretanto, não foi possível determinar a concentração de I na amostra, uma vez que esta se encontra abaixo do limite de detecção (LOD) do método desenvolvido ($11 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Na Fig. 20 é apresentada a solução que foi obtida após a decomposição de mel por MIC, utilizando NH_4OH 50 mmol l^{-1} como solução absorvedora, a mesma possui aspecto límpido e não apresenta coloração. Além disso, o teor de carbono foi determinado nesta solução e a concentração foi menor que 13 mg l^{-1} (LOD do método), o que caracteriza que a decomposição foi eficiente.

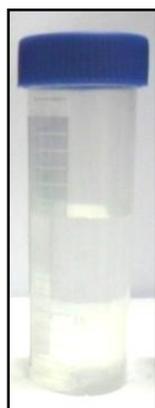


Figura 20. Aspecto da solução obtida após decomposição de mel por MIC utilizando NH_4OH 50 mmol l^{-1} como solução absorvedora (massa de amostra: $500 \text{ mg} + 150 \text{ mg}$ de celulose; pressão de O_2 : 20 bar).

Como foi mencionado no item 3.6 (*Materiais e Métodos*), também foi realizada a decomposição de 1000 mg de mel por MIC. Para tanto, fez-se necessário avaliar se a solução absorvedora utilizada na decomposição de 500 mg de mel seria adequada para a absorção de Br e I após a decomposição de 1000 mg amostra. Assim, foram realizados ensaios de recuperação utilizando 1000 mg de mel e, como solução absorvedora, NH_4OH 50 mmol l^{-1} . Esse estudo também foi realizado a partir da amostra, onde, foram adicionadas concentrações conhecidas de Br e I, conforme o procedimento descrito no item 3.9.

As recuperações obtidas para Br e I na amostra de mel após a decomposição de 1000 mg da mesma por MIC utilizando NH_4OH 50 mmol l^{-1} , como solução absorvedora, foram 106 e 104%, respectivamente. Desta forma, com base nesse resultado e, tendo em vista que a exatidão do procedimento de decomposição por MIC utilizando NH_4OH 50 mmol l^{-1} como solução absorvedora foi confirmada anteriormente, por meio da decomposição do RM NIST RM 8435 (*Whole Milk Powder*) e do RM NIST 8414 (*Muscle Bovine*), pode-se concluir que a solução de NH_4OH 50 mmol l^{-1} também é adequada para a absorção de Br e I após a decomposição de 1000 mg de amostra.

Após a avaliação da adequabilidade da solução de NH_4OH 50 mmol l^{-1} para a absorção de Br e I durante a decomposição 1000 mg de mel por MIC, fez-se a decomposição de 1000 mg de amostra utilizando essa solução absorvedora e, a concentração de Br encontrada para a amostra de mel foi $577 \pm 13 \mu\text{g kg}^{-1}$. Ao comparar a concentração encontrada após a decomposição de 1000 mg de mel com o teor encontrado após a decomposição de 500 mg de mel ($581 \pm 16 \mu\text{g kg}^{-1}$) pode-se perceber que não existe diferença significativa entre os valores com um nível de confiança de 95%, dessa forma, isso também indica, que a solução de NH_4OH 50 mmol l^{-1} é adequada para a absorção de Br após decomposição de 1000 mg de mel.

Com relação à determinação de I nos digeridos obtidos após a decomposição de 1000 mg de amostra, cabe ressaltar que embora o LOD tenha sido reduzido com o aumento da massa de amostra ($6 \mu\text{g kg}^{-1}$), o mesmo ainda não viabilizou a determinação desse analito. No entanto, para outras amostras de mel que tenham um teor de I acima do LOD obtido, será possível determinar a concentração do analito por meio do método desenvolvido de uma forma exata e precisa.

Com relação à massa de amostra empregada na MIC (1000 mg de amostra + 400 mg de celulose), cabe enfatizar que, até o momento nenhum trabalho utilizou massas tão elevadas neste sistema de decomposição, onde, geralmente, são utilizadas massas de amostra de até 500 mg. Além disso, em se tratando de amostras de mel, uma matriz rica em açúcares (CHEPULIS, 2008; PERALTA; KOBLITZ, 2011) e, por isso, de difícil decomposição, também

não existem relatos do uso de massas superiores a 500 mg para a decomposição em sistemas fechados.

4.6 Comparação entre os Diferentes Procedimentos de Preparo de Amostras

Como mencionado anteriormente, os procedimentos de preparo de amostras envolvendo a dissolução alcalina não foram adequados para a subsequente determinação de Br e I em amostras de mel por ICP-MS. Contudo, dentre os métodos avaliados, a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado, bem como a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta em sistema fechado apresentam vantagens frente à dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria. As principais vantagens incluem o fato dos métodos utilizarem a radiação micro-ondas que, reduz o tempo necessário para o aquecimento, e de empregarem um sistema fechado, evitando, assim, perdas e contaminações. No caso da dissolução assistida por radiação ultravioleta, apesar de não ter sido viável avaliar as suas potencialidades neste trabalho, com base em relatos descritos na literatura, é possível apontar como outra vantagem o fato de, em alguns casos, viabilizar o uso de soluções diluídas no preparo das amostras. Entretanto, quando comparados a MIC, estes sistemas apresentam desvantagens como, o emprego de um maior tempo para a dissolução da amostra e a necessidade de diluições excessivas previamente as determinações de Br e I por ICP-MS, uma vez que, não ocasionam a oxidação da matéria orgânica das amostras. Dentro desse contexto, é importante salientar que, a necessidade de sucessivas diluições, previamente as análises por ICP-MS, limitou a aplicação dos procedimentos envolvendo a dissolução alcalina para a subsequente determinação de Br e I em mel, tendo em vista que a concentração dos analitos nessa amostra é baixa.

Quanto a MIC, cabe salientar que a mesma ainda apresenta outras vantagens quando comparada aos demais métodos de preparo de amostra utilizados, uma vez que, esta é mais rápida, mais eficiente para a decomposição de amostras complexas, como mel, permite a escolha de soluções adequadas à técnica de determinação, bem como o uso de soluções

diluídas, o que vem ao encontro das tendências da química verde. Além disso, a mesma teve a sua exatidão confirmada para Br por meio da realização de ensaios de recuperação e pela decomposição do RM NIST 8435 e do RM NIST 8414 na presença da matriz da amostra e, para I por meio de ensaio de recuperações e da decomposição do RM NIST 8435.

A massa de amostra empregada na MIC (1000 mg de amostra + 400 mg de celulose) pode ser considerada uma grande vantagem tendo em vista que até o momento nenhum trabalho utilizou massas de amostra tão elevadas nesse sistema, onde, geralmente, são utilizados até 500 mg de amostra. Além disso, em se tratando de amostras de mel, também não existem relatos do uso de massas superiores a 500 mg para a decomposição em sistemas fechados por via úmida.

Deste modo, tendo em vista todas as vantagens da MIC frente aos demais métodos de preparo de amostra avaliados, é importante ressaltar que a mesma se mostrou mais adequada para o preparo de amostras de mel visando a determinação de Br e I por ICP-MS.

4.7 Brancos e Limites de Detecção

O cálculo dos limites de detecção dos diferentes métodos avaliados foi realizado por meio de um método sugerido pelo Inmetro que, emprega o branco da amostra para a obtenção do LOD. O método utilizado se encontra apresentado na Eq. 1, onde, \bar{x} é a média das medidas do branco da amostra; t é um fator numérico oriundo da distribuição de Student, que depende do nível de confiança exigido e do número de graus de liberdade ($n-1$), geralmente, o mesmo é igual a 3; e s é o desvio padrão de no mínimo 7 medidas do branco da amostra (INMETRO, 2010). No presente trabalho, o desvio padrão foi calculado a partir dos valores encontrados para 10 medidas do branco da amostra, uma vez que este se trata do procedimento comumente adotado.

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

Equação 1.

Após a obtenção dos LODs por meio da Eq. 1, onde, utilizou-se um t igual a 3, fez-se a conversão dos mesmos considerando as aferições, as massas de amostra empregadas em cada método e os fatores de diluição, quando necessários. Assim, os resultados obtidos para o LOD são expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Na Tab. 9 são apresentados os LODs obtidos por ICP-MS para Br e I após os diferentes métodos de preparo de amostras avaliados.

Tabela 9. Limites de detecção obtidos por ICP-MS para Br e I após os diferentes métodos de preparo de amostra avaliados.

Procedimento de preparo de amostras	Massa de amostra (mg)	Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		Br	I
Dissolução assistida por radiação micro-ondas (NH_4OH 50 mmol l^{-1})	500	700	326
Dissolução assistida por radiação micro-ondas (NH_4OH 100 mmol l^{-1})	500	799	407
Dissolução assistida por radiação micro-ondas (TMAH 0,11 mol l^{-1})	500	2947	217
Dissolução assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (NH_4OH 50 mmol l^{-1})	500	862	573
Dissolução assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (NH_4OH 100 mmol l^{-1})	500	1035	833

Procedimento de preparo de amostras	Massa de amostra (mg)	Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		Br	I
Dissolução assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (TMAH $0,11 \text{ mol l}^{-1}$)	500	4329	224
Dissolução com aquecimento em banho-maria (TMAH 25% - 1 ml)	1000	8644	1578
MIC ($\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$)	500	55	11
MIC ($\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$)	1000	34	6

Como pode ser observado na Tab. 9, o limite de detecção obtido para Br e I após a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas utilizando a solução de $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$, foi semelhante ao obtido quando $\text{NH}_4\text{OH } 100 \text{ mmol l}^{-1}$ foi utilizado. A pequena variação observada encontra-se associada a diferenças nos valores de branco, que, como esperado, foram um pouco mais altos quando se utilizou $\text{NH}_4\text{OH } 100 \text{ mmol l}^{-1}$. Quando o TMAH foi utilizado como solução dissolvente o LOD obtido para I foi menor que os LODs obtidos quando se utilizou NH_4OH , todavia, o LOD obtido para o Br foi mais elevado. Os valores de LODs observados quando o TMAH foi utilizado estão diretamente relacionados com os valores de branco obtidos, os quais foram baixos para I e elevados para Br. Isso indica que o reagente utilizado apresenta um grau de pureza adequado para I e um teor significativo de Br.

O mesmo comportamento foi observado para a dissolução alcalina assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta. Entretanto, os LODs foram sempre superiores aos da dissolução alcalina assistida por radiação micro-

ondas. Isso está relacionado ao fato da dissolução assistida por radiação ultravioleta empregar um maior volume de vidrarias e de solução dissolutora, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de contaminações e, conseqüentemente, o aumento dos valores dos brancos analíticos.

O maior LOD obtido foi da dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria, uma vez que, o uso do TMAH 25% aumenta, consideravelmente, o teor de carbono no meio fazendo-se necessária a realização de maiores diluições previamente as determinações. Além disso, devido o TMAH ser um reagente de difícil purificação, foram encontrados valores de branco elevados para Br, o que contribuiu com a obtenção de LODs elevados para este analito.

Diferentemente do que foi observado para as dissoluções alcalinas, para a MIC, foram obtidos baixos LODs tanto para Br como para I. Estes, ao serem comparados aos encontrados para a dissolução alcalina com aquecimento em banho-maria, foram cerca de 150 vezes menores quando utilizada uma massa de amostra de 500 mg na MIC e cerca 250 vezes quando utilizada uma massa de 1000 mg, para ambos os analitos. Os baixos LODs obtidos para o método proposto estão diretamente relacionados ao fato de não ter sido necessária a realização de sucessivas diluições nos digeridos previamente as análises, devido à eliminação da matriz da amostra e o uso de soluções diluídas e, também, aos brancos obtidos para ambas as massas de amostra utilizadas, os quais foram sempre inferiores a $0,250 \mu\text{g l}^{-1}$ para I e $0,950 \mu\text{g l}^{-1}$ para Br.

Com relação aos brancos obtidos para a MIC, cabe salientar que, embora se tenha utilizado celulose microcristalina em proporções diferentes quando decompostas massas de amostra de 500 e 1000 mg, os brancos encontrados, para ambas as massas, foram semelhantes. Isso, possivelmente, está associado, ao fato de, ter-se descontaminado de uma forma adequada à celulose, diminuindo, desta forma, a contribuição da mesma para os brancos analíticos obtidos para a MIC.

Com base na Tab. 9, também se pode observar que, como esperado, os LODs obtidos para a MIC quando se utilizou 1000 mg de amostra foram praticamente a metade dos obtidos quando massas 500 mg de mel foram empregadas. Todavia, é importante destacar que uma pequena variação é

observada provavelmente em virtude da discreta contribuição da massa de celulose empregada para os valores dos brancos.

4.8 Determinação de Br e I em Méis de Diferentes Origens

O método desenvolvido, que envolve a decomposição das amostras de mel por MIC com subsequente determinação dos analitos por ICP-MS, foi aplicado a méis oriundos de diferentes origens. Os méis avaliados, incluem, um mel oriundo de Santa Catarina, dois méis procedentes de cidades pertencentes ao estado do Rio Grande do Sul (Agudo e Santana do Livramento) e um mel produzido no estado de Minas Gerais em Formiga, estes foram identificados aleatoriamente como amostra A, amostra B, amostra C e amostra D. Com relação aos méis, cuja concentração de Br e I foi determinada, vale salientar que todos apresentam origem floral.

Na Tab. 10 são apresentadas as concentrações de Br e I nas diferentes amostras de mel avaliadas após a decomposição por MIC e subsequente determinação por ICP-MS.

Tabela 10. Concentração de Br e I nas diferentes amostras de mel avaliadas após decomposição por MIC e subsequente determinação por ICP-MS (n = 3).

Mel	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	Br	I
Amostra A	581 \pm 16	< 11
Amostra B	886 \pm 29	< 11
Amostra C	3836 \pm 29	< 11
Amostra D	1059 \pm 38	< 11

Com base nos resultados apresentados na Tab. 10, pode-se perceber que o teor de I em todos os méis avaliados está abaixo do LOD do método desenvolvido. Adicionalmente, ainda cabe salientar que, até o presente momento, nenhum trabalho relatado na literatura determinou a concentração de I em mel. No entanto, por meio do método proposto, foi possível determinar a concentração de Br nas amostras de mel e, de acordo com estes resultados,

a concentração de Br nessas amostras variou em uma ampla faixa de concentração (581 a 3836 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Provavelmente, isso se encontra associado a variações na origem botânica e/ou geográfica dos méis analisados (BOGDANOV, 2008).

Dentro desse contexto, tendo em vista que o teor de Br em amostras de mel pode variar em uma ampla faixa de concentração, e que este analito não apresenta função fisiológica conhecida, torna-se ainda mais relevante a determinação da sua concentração em méis de diferentes origens botânicas e/ou geográficas e, neste sentido, a MIC associada a ICP-MS apresenta-se como um método apropriado para este objetivo.

5. CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados, foi possível desenvolver um método adequado para a determinação de Br e I em mel, o qual envolve a decomposição das amostras por MIC e a determinação dos analitos por ICP-MS. Por meio do mesmo, foi possível a obtenção de baixos limites de detecção, tendo em vista que os valores de brancos obtidos foram baixos e não foi necessária a realização de sucessivas diluições previamente às análises. Os valores de brancos obtidos se devem a MIC tratar-se de um sistema fechado, empregar materiais de elevada pureza como, o quartzo e o PTFE, e ainda, permitir o uso de soluções diluídas, o que vem ao encontro das tendências da química verde. Além disso, o método proposto é rápido, apresenta exatidão e precisão satisfatórias e permite a escolha de uma solução absorvedora adequada à técnica de determinação.

Dentro desse contexto, também cabe enfatizar que, até o momento, nenhum trabalho utilizou massas tão elevadas na decomposição por MIC, onde, geralmente, são empregados 500 mg de amostra. Além disso, em se tratando de amostras de mel, que apresentam uma matriz de difícil decomposição, também não existem relatos do uso de massas superiores a 500 mg em sistemas fechados. Desta forma, o método proposto apresenta uma grande vantagem, tendo em vista que a possibilidade de utilizar massas mais elevadas permite, na maioria das vezes, a determinação de elementos que estejam em baixas concentrações. Essa vantagem encontra-se diretamente relacionada ao uso da celulose como um auxiliar de combustão, pois na ausência deste auxiliar não seria possível controlar a velocidade com que a reação de combustão se processa e, conseqüentemente, evitar a projeção da amostra.

Com relação aos métodos baseados na dissolução alcalina, vale destacar que estes não foram apropriados para a determinação de Br e I em mel devido o teor dos analitos na amostra ser muito baixo e, portanto, não ser viável a diluição das amostras previamente a determinação por ICP-MS.

Os resultados obtidos por ICP-MS após a decomposição das amostras de mel por MIC indicam que os teores de Br em méis de diferentes origens geográficas e/ou botânicas variam em uma ampla faixa de concentração, o que

torna ainda mais relevante a sua determinação em mel. No entanto, os méis analisados não se mostraram uma fonte natural de I, tendo em vista que o teor deste analito, em todas as amostras, não pode ser quantificado devido ser inferior ao limite de detecção do método desenvolvido.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Cabe enfatizar que com o desenvolvimento deste trabalho, onde, foi possível decompor massas de mel superiores as relatadas na literatura para sistemas fechados, podem ser desenvolvidos novos trabalhos visando a determinação de Cl e F em amostras de mel. Para a determinação dos analitos técnicas como, a cromatografia de íons e o eletrodo de íon seletivo, poderiam ser empregadas.

Adicionalmente a determinação de Cl e F em mel, poderiam ser desenvolvidos trabalhos, com base no método proposto, com o intuito de avaliar soluções ácidas para absorção de metais. O desenvolvimento deste estudo seria de grande valia para o controle de elementos tóxicos e essenciais nestas amostras, tendo em vista que, existe uma carência de métodos que possibilitem a determinação destes elementos em baixas concentrações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDA-GARCILOPE, C.; GALLEGO-PICÓ, A.; BRAVO-YAGÜE, J. C.; GARCINUÑO-MARTÍNEZ, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P. Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin “Miel de Granada” according to their mineral content. **Food Chemistry**, v.135, p.1785-1788, 2012.

ALLSOP, K. A.; MILLER, J. B. Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. **British Journal of Nutrition**, v.75, p.513-520, 1996.

ANDERSON, R. Sample Pretreatment and Separation. Chichester: John Wiley, 1991. p. 101-106.

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.

ARIKAWA, Y.; SASAKI, A. Extraction and isotope measurement of sulfur in biological samples. **Analytical Sciences**, v.3, p.157–160, 1987.

BASO-CEJAS, E.; BRITO, G.; DIAZ, C.; PENA-MENDEZ, E.M. Determination of inorganic bromide content in several vegetable foods. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.78, p.417-420, 2007.

BATISTA, B. L.; GROTO, D.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA JR., F. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, v.646, p.23-29, 2009.

BATISTA, B. L.; SILVA, L. R. S.; ROCHA, B. A.; RODRIGUES, J. L.; BERRETA-SILVA, A. A.; BONATES, T. O.; GOMES, V. S. D.; BARBOSA, R. M.; BARBOSA, F. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic

origin with data mining techniques. **Food Research International**, v. 49, p.209-215, 2012.

BELEVI, H.; MÖNCH, H. Simultaneous determination of fluorine, chlorine and sulfur in incinerator residues by oxidative high pressure digestion and ion chromatography. **Analisis**, v.28, p.988–994, 2000.

BERTONCELJ, J.; GOLOB, T.; KROPF, U.; KOROSEC, M. Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.1661-1671, 2011.

BETTINELLI, M.; SPEZIA, S.; BIZZARRI, G. Determination of trace elements in fuel oils by inductively coupled plasma mass spectrometry after acid mineralization of the sample in a microwave oven. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v.10, p.555-560, 1995.

BHAGAT, P. R.; ACHARYA, R.; NAIR, A.G.C.; PANDEY, A.K.; RAJURKAR, N.S.; REDDY, A.V.R. Estimation of iodine in food, food products and salt using ENAA. **Food Chemistry**, v.115, p.706-710, 2009.

BOGDANOV, S.; Honey quality methods of analysis and international regulatory standards review of the work of the international honey commission. **Witteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel unter suchung und Hygiene**, v.90, p.108–125, 1999.

BOGDANOV, S.; JURENDIC, T.; SIEBER, R.; GALLMANN, P. Honey for Nutrition and Health: A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v.27, n.6, p.677-689, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 11. 22 de maio de 2012. Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel, Ovos e Avestruz. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso: julho de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 11. 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso: julho de 2013.

CAMARGO, Ricardo C. Rodriguez de *et al.* **Produção de mel**. 21. Ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 138p.

CAMPILLO, N.; MUÑOZ-DELGADO, E.; LÓPEZ-GARCIA, I.; BAEZA-ALBARRACÍN, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Suspensions of biological tissues in alkaline medium for the determination of copper, manganese and cobalt by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v.171, p.71-79, 2010.

CHEPULIS, L. Honey: A Basic Overview. In: CHEPULIS, L. **Healing Honey: A Natural Remedy for Better Health and Wellness**. Florida: BrownWalker Press, 2008.

CORTES-PENA, M.A.; PEREZ-ARRIBAS, L.V.; LEON-GONZALEZ, M.E.; POLO-DIEZ, L.M. Determination of chlorine and bromine in automotive shredder residues by oxygen bomb and ion chromatography. **Waste Management & Research**, v.20, p.302–307, 2002.

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

DEANGELO, A. B., GEORGE, M. H., KILBURN, S. R., MOORE, T. M., WOLF, D. C. Carcinogenicity of potassium bromate administered in the drinking water to male B6C3F1 mice and F344/N rats. **Toxicologic Pathology**, v.26, p.587–594, 1998.

DELKER, D.; HATCH, G.; ALLEN, D.; CRISSMAN, B.; GEORGE, M.; GETER, D.; KILBURN, S.; MOORE, T.; NELSON, G.; ROOP, B.; SLADE, R.; SWANK, A.; WARD, W.; DEANGELO, A. Molecular biomarkers of oxidative stress associated with bromate carcinogenicity. **Toxicology**, v.221, p.158–165, 2006.

DI NARDA, F.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A.; BONTEMPELLI, G. A comparison among different instrumental approaches for bromide analysis in foodstuffs digested by a suitably modified microwave procedure. **Talanta**, v.60, p.653-662, 2003.

DOOLAN, K.J. A pyrohydrolytic method for determination of low fluorine concentrations in coal and minerals. **Analytical Chimica Acta**, v.202, p.61–73, 1987.

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.

ESCUREDO, O.; SEIJO, M. C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. Descriptive analysis of Rubus honey from the north-west of Spain. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.2329-2336, 2011.

FERNANDEZ-CABEZUDO, M. J.; EL-KHARRAG, R.; TORAB, F.; BASHIR, G.; GEORGE, J. A.; EL-TAJI, H.; AL-RAMADI, B. K. Tumor Growth and Improves Host Survival When Used in Combination with Chemotherapy in a Melanoma Mouse Model Intravenous Administration of Manuka Honey Inhibits. **Plos One**, v.8, n.2, p.1-14, 2013.

FERREIRA, L. R. **Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para o subsequente determinação de metais em macroalgas**. 2013. 148f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, v.100, p.1649-1653, 2007.

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.

FLORIAN, D.; KNAPP, G. High-Temperature, Microwave-Assisted UV Digestion: A Promising Sample Preparation Technique for Trace Element Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1515-1520, 2001.

FUNG, Y.S.; DAO, K.L. Oxygen bomb combustion ion chromatography for elemental analysis of heteroatoms in fuel and wastes development. **Analytical 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. **Analytical Chimica Acta**, v.334, p.51-56, 1996.

GHISI, M.; CHAVES, E. S.; QUADROS, D. P. C.; MARQUES, E. P.; CURTIUS, A. J.; MARQUES, A. L. B. Simple method for the determination of Cu and Fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide. **Microchemical Journal**, v.98, p. 62-65, 2011.

GOLIMOWSKI J.; GOLIMOWSKA K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 325 p. 111-133, 1996.

HARTWIG, C. A. **Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a determinação de Br e I em camarão por ICP-MS**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2011. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso: julho de 2013.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf. Acesso: outubro de 2013.

ISKANDER, F. Y. Trace and minor elements in four commercial honey brands. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.5, p.401-408, 1995.

KHALIL, M. I.; ALAM, N.; MONIRUZZAMAN, M.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. Phenolic Acid Composition and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.c921-c928, 2011.

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.

KROPF, U.; KOROSEC, M.; BERTONCELJ, J.; OGRINC, N.; NECEMER, M.; KUMP, P.; GOLOB, T. Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. **Food Chemistry**, v.121, p.839-846, 2010.

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.

LIMBECK, A. Microwave-assisted UV-digestion procedure for the accurate determination of Pd in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 575, p. 114-119, 2006.

LIU, J.; YE, Y.; LIN, T.; WANG, Y.; PENG, C. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. **Food Chemistry**, v.139, p. 938-943, 2013.

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.

MARTINEZ-TARAZONA, R.; CARDIN, J.M. The indirect determination of chlorine in coal by atomic absorption spectrophotometry. **Fuel**, v.65, p.1705–1708, 1986.

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.

MELLO, P. A. **Determinação de enxofre em petróleo pesado resíduo de vácuo e coque por ICP OES após combustão iniciada por micro-ondas em sistema fechado**. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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. **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.

MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; MESKO, M. F.; DRESSLER, V. L.; PANIZ, J. N. G.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Evaluation of sample preparation methods for elastomer digestion for further halogens determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.97, p.563–570, 2010.

MÜLLER, A. L. H.; BIZZI, C. A.; PEREIRA, J. S. F.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M. M.; MÜLLER, E. I. Bromine and Chlorine Determination

in Cigarette Tobacco using Microwave-Induced Combustion and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.9, 1649-1655, 2011.

NADKARNI, R.A.; POND, D.M. Applications of ion chromatography for determination of selected elements in coal and oil shale. **Analytical Chimica Acta**, v.146, p.261–266, 1983.

NARASAKI, H. Determination of arsenic and selenium in fat materials and petroleum products by oxygen bomb combustion and automated atomic absorption spectrometry with hydride generation. **Analytical Chemistry**, v.57, p.2481–2486, 1985.

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.

OLIVEIRA, A. A.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Avaliação de ICP OES com configuração axial ou radial para determinação de iodo em sal de cozinha. **Química Nova**, v.35, n.7, p.1299-1305, 2012.

PERALTA, E. D.; KOBLITZ, M. G. B. Mel. In: KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. 1ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

PEREIRA, J. S. F. **Determinação de cloreto por Cromatografia de Íons em petróleo extrapesado, coque e resíduo de vácuo após combustão iniciada por microondas**. 2007. 130f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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.; DUARTE, F. A.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; KNAPP, G.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Feasibility of Microwave-Induced Combustion for Digestion of Crude Oil Vacuum Distillation Residue for Chlorine Determination. **Energy Fuels**, n.23, p.6015–6019, 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.

PEREIRA, J. S. F.; MOREIRA, C. M.; ALBERS, C. N.; JACOBSEN, O. S.; FLORES, E. M. M.; Determination of total organic halogen (TOX) in humic acids after microwave-induced combustion. **Chemosphere**, v.83, p.281–286, 2011.

PICOLOTO, R. S.; WITSCHKE, H.; KNAPP, G.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Mercury determination in soil by CVG-ICP-MS after volatilization using microwave-induced combustion. **Analytical Methods**, v.4, p.630-636, 2012.

PONTARA, L. P. M.; CLEMENTE, E.; OLIVEIRA, D. M.; KWIATKOWSKI, A.; ROSA, C. I. L. F.; SAIA, V.E. Physicochemical and microbiological characterization of cassava flower honey samples produced by africanized honeybees. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p.547-552, 2012.

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.

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.

RESOLUÇÃO - RDC nº 23, de 24 de abril de 2013. DOU de 25/05/2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6b1346804f67ec20a093f59a71dcc661/RDC+23+2013.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: agosto de 2013.

RODRIGUEZ-OTERO, J.L.; PASEIRO, P.; SIMAI, J.; CEPEDA, A. Mineral content of the honeys produced in Galicia (North-west Spain). **Food Chemistry**, v.49, p.169-171, 1994.

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.

ROMARÍS–HORTAS, V.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PINEIRO, A. Development of anion-exchange/reversed-phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry methods for the speciation of bio-available iodine and bromine from edible seaweed. **Journal of Chromatography A**, v.1236, p.164-176, 2012.

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.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; MARU, G.; KAWLE, D.; SHARMA, A. Suppression of error prone pathway is responsible for antimutagenic activity of honey. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.625-633, 2012.

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

SNEDDON, J.; HARDAWAY, C.; BOBBADI, K. K.; REDDY, A.K. Sample preparation of solid samples for metal determination by atomic spectroscopy – an overview and selected recent applications. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.41, p.1-14, 2006.

SOUZA, G.B.; CARRILHO, E.N.V.M.; OLIVEIRA, C.V.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. Oxygen bomb combustion of biological samples for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v.57, p.2195–2201, 2002.

TERRAB, A.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F. J. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometric Determination of Minerals in Thyme Honeys

and Their Contribution to Geographical Discrimination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 3441-3445, 2004.

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.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v.73, n.9, p.117-124, 2008.

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.

WORWITZ, W.; LATIMER, G. W. Official Methods of Analysis of AOAC International Gaithesburg: AOAC International, 2011.

ANEXOS

Anexo 1 – Relação entre o índice de refração e o conteúdo de água de méis.

Conteúdo de água %	Índice de refração			Conteúdo de água %	Índice de refração		
	20 °C	60 °F	40 °C		20 °C	60 °F	40 °C
13,0	1,5044	1,5053	1,4998	19,0	1,4890	1,4900	1,4845
13,2	1,5038	1,5048	1,4993	19,2	1,4885	1,4895	1,4840
13,4	1,5033	1,5043	1,4988	19,4	1,4880	1,4890	1,4835
13,6	1,5028	1,5038	1,4983	19,6	1,4875	1,4885	1,4829
13,8	1,5023	1,5033	1,4978	19,8	1,4870	1,4880	1,4824
14,0	1,5018	1,5027	1,4973	20,0	1,4865	1,4875	1,4819
14,2	1,5012	1,5022	1,4968	20,2	1,4860	1,4870	1,4814
14,4	1,5007	1,5017	1,4962	20,4	1,4855	1,4865	1,4809
14,6	1,5002	1,5012	1,4957	20,6	1,4850	1,4860	1,4804
14,8	1,4997	1,5007	1,4952	20,8	1,4845	1,4855	1,4799
15,0	1,4992	1,5002	1,4947	21,0	1,4840	1,4850	1,4794
15,2	1,4987	1,4997	1,4942	21,2	1,4835	1,4845	1,4788
15,4	1,4982	1,4992	1,4937	21,4	1,4830	1,4840	1,4783
15,6	1,4976	1,4986	1,4932	21,6	1,4825	1,4835	1,4778
15,8	1,4971	1,4981	1,4927	21,8	1,4820	1,4830	1,4773
16,0	1,4966	1,4976	1,4922	22,0	1,4815	1,4825	1,4768
16,2	1,4961	1,4971	1,4916	22,2	1,4810		
16,4	1,4956	1,4966	1,4911	22,4	1,4805		
16,6	1,4951	1,4961	1,4906	22,6	1,4800		
16,8	1,4946	1,4956	1,4901	22,8	1,4795		
17,0	1,4940	1,4951	1,4896	23,0	1,4790		
17,2	1,4935	1,4946	1,4891	23,2	1,4785		
17,4	1,4930	1,4940	1,4886	23,4	1,4780		
17,6	1,4925	1,4935	1,4881	23,6	1,4775		
17,8	1,4920	1,4930	1,4876	23,8	1,4770		
18,0	1,4915	1,4925	1,4870	24,0	1,4765		
18,2	1,4910	1,4920	1,4865	24,2	1,4760		
18,4	1,4905	1,4915	1,4860	24,4	1,4755		
18,6	1,4900	1,4910	1,4855	24,6	1,4750		
18,8	1,4895	1,4905	1,4850	24,8	1,4745		
				25,0	1,4740		